

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA**

**PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE CÁLCIO NA  
HIPERREATIVIDADE INDUZIDA POR OVALBUMINA  
EM TRAQUÉIAS ISOLADAS DE RATOS**

**CARLOS TIAGO MARTINS MOURA**

**Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e  
Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal  
do Ceará como pré-requisito para obtenção do título de Mestre  
em Farmacologia**

**Orientador: Prof. Dr. Francisco Ruy Capaz**

**Fortaleza**

**2004**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**PARTICIPAÇÃO DE CANAIS IÔNICOS NA HIPERREATIVIDADE  
INDUZIDA POR OVALBUMINA EM TRAQUÉIAS ISOLADAS DE  
RATOS**

CARLOS TIAGO MARTINS MOURA

**Aprovada em 15 de outubro de 2004**

**BANCA EXAMINADORA:**

Professor Dr. Francisco Ruy Capaz  
(Orientador)

Professor Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

Professor Dr. Armênio Aguiar dos Santos

Professora Dra. Flávia Almeida Santos

Trabalho realizado do Laboratório de Farmacologia do Aparelho  
Respiratório (LAFAR)

M885p Moura, Carlos Tiago Martins

Participação de Canais iônicos na hiperreatividade induzida por ovalbumina em traquéias isoladas de ratos / Carlos Tiago Martins Moura. – Fortaleza, 2004.

119f.:il.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Ruy Capaz

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia e Farmacologia

1. Canais iônicos. 2. Hipersensibilidade Respiratória. 3. Broncoconstrição. 4. Inflamação. I. Capaz, Francisco Ruy (orientador). II. Título.

CDD 616213



Aos meus pais, Luiz e Inês, pela confiança a mim depositada desde o início.

A todos os meus parentes e amigos pela colaboração direta ou indireta.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Francisco Ruy Capaz, pela dedicação, apoio e ensinamentos durante todas as fases deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães pela inestimável colaboração na conclusão deste trabalho

Aos Professores do curso de Pós-graduação em Farmacologia, pelos ensinamentos científicos impressionantes a minha formação.

Aos colegas de Pós-graduação do Laboratório de Farmacologia do Aparelho Respiratório (LAFAR), Fernanda Carvalho Bezerra e Isabelle Marciel de Moraes, pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos estudantes de iniciação científica, Heloísa, Cristiana, Marcus Paulo, Adivânia, Ana Caroline, Cecília e Lívia pela disponibilidade em ajudar.

Aos colegas de Pós-graduação em Farmacologia em especial, Virgínia, Rondinelle, Ingrid, Raquel, Giovanna, Fabíola, Paula, Ana Paula, Francisco, Kátia, Antoniella, Hélio, Marne e Gardênia, pela agradável convivência.

A Dra. Artemísia Portela, Febe Jemima e Castro Júnior, pela disponibilidade em atender as solicitações.

As secretárias da Pós-graduação em Farmacologia, Sílvia Azevedo e Aura Rhanes, pela dedicação no atendimento.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pela presteza em nos fornecer ajuda.

Aos amigos e colegas do Serviço de Farmácia do Hospital Universitário Walter Cantídio, pelo apoio e incentivo.

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho os meus agradecimentos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1. ANATOMOFISIOLOGIA DAS VIAS AÉREAS.....	18
1.2. MÚSCULO LISO.....	20
1.3. PROCESSO ASMÁTICO.....	21
1.3.1. Definição e desenvolvimento.....	21
1.3.2. Base inflamatória da asma.....	22
1.3.3. Resposta asmatica precoce.....	24
1.3.4. Resposta asmatica tardia.....	26
1.4. Modelos animais de asma.....	30
1.5. Participação do cálcio na contração do músculo liso.....	34
1.5.1. Fontes de cálcio para contração.....	35
1.6. HIPERREATIVIDADE BRÔNQUICA.....	36
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	38
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
3.1. MATERIAIS.....	41

3.1.1. Animais.....	41
3.1.2. Drogas e soluções.....	41
3.1.3. Equipamentos.....	42
3.2. MÉTODOS.....	43
3.2.1. Sensibilização e bronco-provocação antigênicos.....	43
3.2.2. Avaliação da contratilidade da musculatura traqueal.....	44
3.2.3. Curvas concentração-efeito a para acetilcolina, serotonina e potássio.....	46
3.2.4. Curvas concentração-efeito para o cálcio.....	46
<b>3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>47</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
4.1. Efeito da sensibilização com a OVA na resposta induzida pelo potássio em traquéia isolada de rato.....	49
4.2. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta induzida pelo potássio em traquéia isolada de rato.....	49
4.3. Efeito da sensibilização à OVA na resposta contrátil induzida pela adição de Ca <sup>2+</sup> em traquéia isolada de rato mantida em solução extracelular rica em potássio, sem Ca <sup>2+</sup> e na presença de atropina..	50
4.4. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta contrátil induzida pela adição de Ca <sup>2+</sup> em traquéia isolada de rato mantida em solução extracelular rica em potássio, sem Ca <sup>2+</sup> e na presença de atropina..	51
4.5. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA imediatamente antes dos experimentos na resposta contrátil induzida pela adição de Ca <sup>2+</sup> em traquéia isolada de rato mantida em solução extracelular rica em potássio, sem Ca <sup>2+</sup> e na presença de atropina..	51

4.6. Efeito da sensibilização a ovalbumina (OVA) na resposta induzida pela acetilcolina em traquéia isolada de rato.....	52
4.7. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta induzida pela acetilcolina em traquéia isolada de rato.....	53
4.8. Efeito do ácido niflúmico na resposta induzida pela acetilcolina em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antigenicamente imediatamente antes dos experimentos com OVA..	53
4.9. Efeito da sensibilização à OVA na resposta contrátil induzida por Ca <sup>2+</sup> em traquéia isolada de rato mantida em solução zero Ca <sup>2+</sup> na presença de acetilcolina e nifedipina.....	54
4.10. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta contrátil induzida por Ca <sup>2+</sup> em traquéia isolada de rato mantida em solução zero Ca <sup>2+</sup> na presença de acetilcolina e nifedipina.....	55
4.11. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA imediatamente antes dos experimentos na resposta contrátil induzida por Ca <sup>2+</sup> em traquéia isolada de rato mantida em solução zero Ca <sup>2+</sup> na presença de acetilcolina e nifedipina.....	55
4.12. Efeito da sensibilização à OVA na resposta induzida pela serotonina em traquéia isolada de rato.....	56
4.13. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta induzida pela serotonina em traquéia isolada de rato.....	57
4.14. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta induzida pela serotonina em traquéia isolada de ratos tratados com metilsergida.....	57
4.15. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA imediatamente antes dos experimentos na resposta induzida pela serotonina em traquéia isolada de ratos tratados com metilsergida....	58

4.16. Efeito da nifedipina na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antigenicamente com OVA 24 horas antes dos experimentos.....	59
4.17. Efeito do ácido niflúmico na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antigenicamente imediatamente antes dos experimentos OVA.....	59
4.18. Efeito da sensibilização à OVA na resposta contrátil induzida por Ca <sup>2+</sup> em traquéia isolada de rato mantida em solução zero Ca <sup>2+</sup> na presença de serotonina e nifedipina.....	60
4.19. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta contrátil induzida por Ca <sup>2+</sup> em traquéia isolada de rato mantida em solução zero Ca <sup>2+</sup> na presença de serotonina e nifedipina.....	61
4.20. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta contrátil induzida por Ca <sup>2+</sup> em traquéia, mantida em solução zero Ca <sup>2+</sup> na presença de serotonina e nifedipina, isolada de ratos tratados com metilsergida...	61
4.21. Efeito da sensibilização e desafio antigênico OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos mantidas em LN sem nifedipina.....	62
4.22. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA imediatamente antes dos experimentos na resposta contrátil induzida por Ca <sup>2+</sup> em traquéia isolada de rato mantida em solução zero Ca <sup>2+</sup> na presença de serotonina e nifedipina.....	63
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>104</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
Ach	Acetilcolina
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CCE	Curva concentração-efeito
CONT	Controle
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ET-1	Endotelina 1
gF	Gramma força
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL4	Interleucina 4
IL13	Interleucina 13
KCl	Cloreto de potássio
LTs	Leucotrienos
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
MLCK	Miosina quinase de cadeia leve
n	Número de experimentos

NO	Óxido nítrico
OVA	Ovalbumina
ROC	Canal de cálcio voltagem dependente
SD0	Sensibilizado e desafiado 0h antes dos experimentos
SD24	Sensibilizado e desafiado 24h antes dos experimentos
SENS	Sensibilizado
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
VOC	Canal de cálcio operado por receptor

## RESUMO

**Participação dos canais de cálcio na hiperreatividade induzida por ovalbumina em traquéias isoladas de ratos.** *Carlos Tiago Martins Moura, Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2004.*

Com o objetivo de verificar a interferência da broncoprovocação antigênica sobre a contratilidade traqueal, ratos machos (250 -350 g) foram sensibilizados à ovalbumina (OVA) e, 13 a 14 dias depois, desafiados em intervalos de 15 minutos através da inalação do antígeno sensibilizante (OVA, 1 mg/ml, seguida de 5 mg/ml). O sacrifício dos animais foi feito imediatamente (SD0) ou 24 horas (SD24) após o desafio antigênico através de anestesia com hidrato de cloral (0,4 g/Kg). Alguns animais foram tratados com metilsergida (1 mg/Kg) 40 minutos antes do desafio. Os animais controle (CONT) inalaram apenas o veículo (NaCl 0,9 %). A traquéia foi removida e montada em cuba para órgão isolado contendo 10 ml de solução de Krebs-Henseleit modificada (mantida a  $37 \pm 0,5$  °C) e aerada com mistura carbogênica ( $O_2/CO_2$ –95:5). Foram confeccionadas curvas concentração-efeito (CCE) para cloreto de potássio (KCl), acetilcolina (ACh) ou serotonina (5-HT). Em outros experimentos foram realizadas CCE ao  $Ca^{2+}$  em preparações mantidas previamente em solução sem  $Ca^{2+}$  (contendo  $10^{-5}$  M de EDTA, nifedipina e indometacina,  $10^{-6}$  M para ambas) e estimuladas por KCl, ACh ou 5-HT. A sensibilização e o posterior desafio antigênico (SD) promoveram um significativo aumento da resposta máxima (RM) das CCE ao KCl (força em grama, *média  $\pm$  E.P.M.*: CONT =  $0,52 \pm 0,01$ ; SD24 =  $1,22 \pm 0,03$ ; n = 06; p < 0,01), à ACh (CONT =  $2,11 \pm 0,10$ ; SD24 =  $3,53 \pm 0,03$ ; n = 06; p < 0,01) ou à 5-HT (CONT =  $0,60 \pm 0,03$ ; SD24 =  $1,48 \pm 0,09$ ; n = 06; p < 0,01). As traquéias de animais sensibilizados e desafiados apresentaram aumento da RM ao  $Ca^{2+}$  apenas quando pré-contraídas com KCl (CONT =  $0,84 \pm 0,08$ ; SD24 =  $1,98 \pm 0,05$ ; n = 6; p < 0,01) ou ACh (CONT =  $0,98 \pm 0,09$ ; SD24 =  $1,54 \pm 0,15$ ; n = 6; p < 0,05). Quando o agonista utilizado foi a 5-HT esta diferença não ocorreu, sendo observada uma maior RM somente na ausência de nifedipina (CONT =  $0,81 \pm 0,06$ ; SD24 sem nifedipina =  $1,23 \pm 0,08$ ; n = 05; p < 0,01). Foram comparados os animais apenas sensibilizados e não desafiados (SENS) com os SD na presença de ácido niflúmico (AN). O AN inibiu a hiperreatividade para a 5-HT induzida pelo desafio antigênico (SENS =  $1,28 \pm 0,09$ ; SD24 + AN =  $1,01 \pm 0,08$ ; n = 05), enquanto que foi ineficaz em inibir a hiperreatividade para a ACh (SENS =  $1,44 \pm 0,01$ ; SD24 + NA =  $1,67 \pm 0,03$ ; n = 05; p < 0,01). Portanto, os resultados mostram que há envolvimento de canais de  $Ca^{2+}$ , tanto dependentes de voltagem (VOC) como operados por receptor (ROC), na hiperreatividade do músculo liso respiratório, induzida pela reapresentação do antígeno a animais previamente sensibilizados e que o desenvolvimento da hiperreatividade para a 5-HT está relacionado à abertura de canais de  $Cl^-$  ativados por  $Ca^{2+}$ .

## ABSTRACT

**Role of the calcium channels on ovalbumin-induced rat airway hyperresponsiveness.** *Carlos Tiago Martins Moura, Master's Dissertation in Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceará, 2004.*

In order to verify the interference of the antigenic challenge on tracheal contractility *in vitro*, male rats (250 -350 g) were ovalbumine (OVA)-sensitized and, 13 to 14 days later, they were challenged through the sensitizing antigen inhalation (OVA, 1 mg/ml, followed by 5 mg/ml). Animals were sacrificed immediately (SD0) or 24 hours (SD24) after the antigenic challenge through chloral hydrate anaesthesia (0,4 g/Kg). Some animals were treated with metilsergide (1 mg/Kg) 40 minutes before the challenge. Control animals (CONT) received only the vehicle (NaCl 0,9 %) by inhalation. Tracheal rings were carefully removed and mounted in a 10 ml isolated bath chamber with modified Krebs-Henseleit solution (at  $37 \pm 0,5$  °C) bubbled with a mixture of 5% of CO<sub>2</sub> in 95% of O<sub>2</sub>. Concentration-effect curves (CCE) were constructed for potassium chloride (KCl), acetylcholine (ACh) or serotonin (5-HT). In another experiments, CCE for Ca<sup>2+</sup> addition were constructed under Ca<sup>2+</sup>-free conditions (with 10<sup>-5</sup> M EDTA, nifedipine and indomethacin, 10<sup>-6</sup> M each) in the presence of KCl, ACh or 5-HT. Sensitization and subsequent antigenic challenge (SD) promoted a significant increase of the maximal response (RM) of the CCE to KCl (force in grams, *mean ± S.E.M.*: CONT =  $0,52 \pm 0,01$ ; SD24 =  $1,22 \pm 0,03$ ; n = 06; p < 0.01), ACh (CONT =  $2.11 \pm 0,10$ ; SD24 =  $3,53 \pm 0,03$ ; n = 06; p < 0.01) or to 5-HT (CONT =  $0,60 \pm 0,03$ ; SD24 =  $1,48 \pm 0,09$ ; n = 06; p < 0.01). Tracheal rings of sensitized and challenged animals showed a rise in RM for Ca<sup>2+</sup> only when they were pre-contracted with KCl (CONT =  $0,84 \pm 0,08$ ; SD24 =  $1,98 \pm 0,05$ ; n = 6; p < 0.01) or ACh (CONT =  $0,98 \pm 0,09$ ; SD24 =  $1,54 \pm 0,15$ ; n = 6; p < 0,05). When 5-HT was used as agonist this hyperresponsiveness did not occur, being observed only in the nifedipine absence (CONT =  $0.81 \pm 0,06$ ; SD24 without nifedipine =  $1,23 \pm 0,08$ ; n = 05; p < 0.01). The sensitized but not challenged animals (SENS) were compared to SD animals in the presence of niflumic acid (AN). AN inhibited the antigenic shock-induced hyperresponsiveness for 5-HT (SENS =  $1,28 \pm 0,09$ ; SD24 + AN =  $1.01 \pm 0,08$ ; n = 05), while it was ineffective in inhibit that for the ACh (SENS =  $1,44 \pm 0,01$ ; SD24 + AN =  $1,67 \pm 0,03$ ; n = 05; p < 0.01). Therefore, the results show that there is a participation of Ca<sup>2+</sup> channels, both voltage- and receptor-operated channels, in the hyperresponsiveness of the respiratory smooth muscle, induced by the representation of the antigen to previously sensitized animals and, in addition, the Cl<sup>-</sup> channels Ca<sup>2+</sup>-activated have an important role on 5-HT hyperresponsiveness development.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1. (a) Efeito da sensibilização com ovalbumina (OVA) na resposta induzida pelo potássio (KCl) em traquéias isoladas de ratos**

(b) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil induzida pelo potássio em traquéias isoladas de ratos

Figura 2. (a) Efeito da sensibilização antigênica com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pelo KCl em traquéias isoladas de ratos

**(b) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pelo KCl em traquéias isoladas de ratos**

Figura 3. Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) imediatamente antes dos experimentos na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pelo KCl em traquéias isoladas de ratos

Figura 4. (a) Efeito da sensibilização com ovalbumina (OVA) na resposta induzida pela acetilcolina em traquéias isoladas de ratos

(b) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta induzida pela acetilcolina em traquéias isoladas de ratos

Figura 5. Efeito do ácido niflúmico na resposta induzida pela acetilcolina em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antigenicamente com ovalbumina (OVA)

Figura 6. (a) Efeito da sensibilização antigênica com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela acetilcolina em traquéias isoladas de ratos

(b) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela acetilcolina em traquéias isoladas de ratos

Figura 7. Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) imediatamente antes dos experimentos na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela acetilcolina em traquéias isoladas de ratos

Figura 8. (a) Efeito da sensibilização com ovalbumina (OVA) na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos

(b) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos

Figura 9. (a) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos tratados com metilsergida

**(b) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos tratados com metilsergida**

Figura 10. (a) Efeito da nifedipina na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antigenicamente com ovalbumina (OVA)

**(b) Efeito do ácido niflúmico na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antigenicamente com ovalbumina (OVA)**

Figura 11. (a) Efeito da sensibilização antigênica com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos

**(b) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos**

**Figura 12. Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos tratados com metilsergida**

**Figura 13. Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos (LN sem nifedipina)**

**Figura 14. Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** CE50 e Resposta máxima obtidas de curvas concentrações-efeito ao potássio (KCl) realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados (SENS) e sensibilizados e desafiados (SD24).
- Tabela 2.** CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito ao cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) na presença de cloreto de potássio (KCl) e atropina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados (SENS) ou sensibilizados e desafiados 24 (SD24) ou 0hs antes dos experimentos com OVA.
- Tabela 3.** CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito a acetilcolina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados (SENS) e sensibilizados e desafiados (SD24).
- Tabela 4.** CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito ao cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) na presença de acetilcolina e nifedipina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados (SENS) ou sensibilizados e desafiados 24 (SD24) ou 0hs antes dos experimentos com OVA.
- Tabela 5.** CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito a acetilcolina na presença de ácido niflúmico, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antígenicamente com OVA (SD24AN).
- Tabela 6.** CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito a serotonina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados (SENS) e sensibilizados e desafiados (SD24).
- Tabela 7.** CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito a serotonina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antígenicamente com OVA 24hs (SD24M) ou 0h (SD0M) antes dos experimentos e tratados com metilsergida.
- Tabela 8.** CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito ao cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) na presença serotonina e nifedipina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados com OVA (SENS).
- Tabela 9.** CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito ao cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) na presença de serotonina e nifedipina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e

**desafiados antígenicamente com OVA (SD24M) e tratados com metilsergide.**

**Tabela 10. CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito a serotonina na presença de ácido niflúmico, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antígenicamente com OVA (SD24AN).**

## **1. INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. ANATOMOFISIOLOGIA DAS VIAS AÉREAS

Podemos classificar as vias aéreas quanto a sua localização em superiores e inferiores. As primeiras se iniciam nas fossas nasais prolongando-se até a laringe e porção superior da traquéia. As vias aéreas inferiores compreendem as porções inferiores da traquéia e suas ramificações, brônquios, brônquios indo até os alvéolos. A traquéia inicia-se logo abaixo da laringe, possuindo entre outras funções aquela de tubo condutor de ar aos pulmões. A traquéia apresenta duas porções uma cervical e outra torácica apresentando como característica um número variável de anéis (16 a 20) ou semi-anéis cartilagosos sobrepostos e em forma de C e ligados pela membrana cricotraqueal. A região posterior da traquéia se caracteriza por ser composta basicamente de músculo liso, o músculo liso traqueal, que tensiona as bordas da cartilagem e evita que elas se separem, uma vez que os semi-anéis cartilagosos não se fecham nesta região. Isso promove uma certa motilidade da porção posterior. A membrana cricotraqueal reveste externamente toda a traquéia e vai unindo os anéis até a carina, local onde a traquéia se divide em brônquio principal direito e esquerdo (Stephens, 1998; 2002).

As vias aéreas vão assim se subdividindo em vários ramos, tornando-se cada vez mais curtas, com diâmetro menor e mais numerosas à medida que penetram no pulmão. A traquéia é denominada de via respiratória de primeira geração, e os dois brônquios principais direito e esquerdo de segunda geração e

assim sucessivamente por 20 a 25 gerações até que o sistema tubular das vias aéreas alcance os alvéolos (Seow, 2001).

Os tecidos traqueal e bronquiolar são formados por quatro camadas (do interior para o exterior): camada mucosa (epitélio pseudo-estratificado cilíndrico-ciliado e uma lâmina própria), camada submucosa, camada muscular com peças cartilaginosas e camada adventícia. Existem ainda três tipos comuns de células no epitélio traqueobrônquico: ciliadas, caliciformes e basais (Ross *et al.*, 1993). As células ciliadas são encontradas em todo trato respiratório até os bronquíolos respiratórios e promovem o batimento ciliar, que visa eliminar a secreção e materiais estranhos a árvore brônquica. As células caliciformes estão localizadas entre as células ciliadas e têm a função de produzir muco, que vem a se somar com aquele produzido por glândulas submucosas das vias de condução. Por fim as células basais que funcionam como fonte de novas células, estando localizadas sobre a lâmina basal (Roger, 1992).

Toda a árvore respiratória se mantém úmida pela presença de uma camada de muco que reveste toda superfície epitelial. O muco é produzido e secretado pelas células caliciformes isoladas, presentes no epitélio das vias aéreas, e por glândulas submucosas. Este muco é removido pelo epitélio ciliado presente nas fossas nasais e nas vias aéreas inferiores até a zona de condução. A traquéia é revestida por uma camada mucosa especial chamada mucosa respiratória que possui epitélio estratificado ciliado (Seow, 1998).

A cada ramificação, os brônquios vão perdendo gradativamente componentes de sua parede, com isso se observa a ausência de cartilagens e de glândulas submucosas nos bronquíolos da zona de condução. Nestes bronquíolos

o epitélio e a musculatura são os principais constituintes. Já os bronquíolos respiratórios pertencentes à zona de respiração são formados por epitélio cilíndrico e cúbico. Nas porções de traquéia e brônquios não ocupadas por lâminas de cartilagem, as paredes são predominantemente formadas por músculo liso, com exceção dos brônquios respiratórios que apresentam apenas algumas fibras musculares lisas. O saco alveolar, estrutura formada por um conjunto de alvéolos, localiza-se na extremidade distal das vias aéreas da zona respiratória e é responsável pelas trocas gasosas, sendo suas paredes extremamente delgadas e compostas por três tipos de células: pneumócitos tipo I, pneumócitos tipo II e células em escova (Morrison *et al.*, 1991).

## **1.2. MÚSCULO LISO**

A estrutura das células musculares lisas e sua organização diferem em cada órgão quanto a suas dimensões, feixes, camadas, respostas aos estímulos contráteis, características de inervação e função. O músculo liso pode ser classificado de uma forma geral em duas formas principais, multiunitário e unitário, sendo esta última a classificação dada ao músculo das vias aéreas humanas. O músculo liso unitário se caracteriza pela presença de uma massa única que se contrai como um sincício, ou seja, como uma só unidade. As fibras musculares lisas, em geral, se apresentam agregadas em camadas ou feixes, estando aderidas por suas membranas celulares que contêm múltiplos pontos de adesão, estes pontos conferem a capacidade de transmitir a força contrátil de uma célula a seguinte. As membranas são acopladas por junções abertas, pelas quais pode

ocorrer a livre passagem de íons, de modo que os potenciais de ação ou mesmo o fluxo iônico possa passar por fibras adjacentes. Devido à presença destas interconexões podemos definir o músculo liso unitário como sincicial, ou músculo liso visceral, por ser encontrado também na maior parte das vísceras do organismo (Stephens *et al.*, 1993; Crimi *et al.*, 2001; Stephens *et al.*, 2003).

### **1.3. O PROCESSO ASMÁTICO**

#### **1.3.1. Definição e desenvolvimento**

A asma é uma patologia determinada pela interação de fatores genéticos e ambientais levando a um processo de inflamação crônica e complexa das vias aéreas. A asma é caracterizada por obstrução variável e reversível espontaneamente, embora não completamente em todos os pacientes, ou através de tratamento farmacológico. A hiperreatividade, definida como resposta exacerbada das vias aéreas a estímulos não alérgicos, também é observada, e envolve diversos mediadores e células inflamatórias (Barnes *et al.*, 1998).

Podemos definir de forma mais simples a asma como sendo uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, de causa não completamente elucidada, que se caracteriza por crises de tosse, sibilos, sensação de compressão torácica, dificuldade respiratória e dispinéia. O estreitamento das vias aéreas é geralmente reversível, porém em pacientes com asma crônica, a inflamação pode determinar obstrução irreversível ao fluxo aéreo. A asma pode ser diferenciada da bronquite

crônica e do enfisema pulmonar por ser reversível e pela dificuldade em caracterizar com segurança a periodicidade de seu aparecimento (Chung *et al.*, 1990).

### **1.3.2. Base inflamatória da asma**

**A limitação do fluxo aéreo, que corresponde ao principal componente da asma brônquica, apresenta como principais características fisiopatológicas: hipertrofia e contração do músculo liso, vasodilatação, hipersecreção e remodelamento brônquico. O edema é resultado da vasodilatação e congestão da microvascularização brônquica que promove o aumento na exsudação de plasma e macromoléculas para o interstício e luz das vias aéreas. Ocorre ainda infiltração de células inflamatórias nos brônquios, principalmente por eosinófilos, linfócitos, mastócitos e macrófagos com descamação do epitélio brônquio e espessamento da membrana basal reticular. A hipersecreção mucosa caracteriza-se por hipertrofia das glândulas mucosas, aumento das células caliciformes, com aumento de secreção intraluminal, e obstrução das vias aéreas por muco. Devido ao aumento da massa muscular que envolve as vias aéreas, por hipertrofia e hiperplasia muscular, temos o conseqüente encurtamento da musculatura lisa, facilitando o processo contrátil (Jiang *et al.*, 1994).**

A característica macroscópica mais importante é a hiperinsuflação pulmonar com áreas focais de atelectasias decorrentes de obstrução causada pela oclusão de brônquios e bronquíolos por muco espesso gelatinoso. A presença de muco

indica deficiência crônica no sistema secretor de muco ou no *clearance* mucociliar, ou em ambos. A secreção mucóide na realidade não possui o muco como seu único componente, sendo também encontrado em sua constituição proteínas plasmáticas, DNA, células e proteoglicanos. A mucina constitui-se, entretanto, no principal elemento formador do componente gel, sendo que em pacientes que morrem em estado de mal asmático, a mucina é intrínsecamente anormal em seu perfil biofísico, apresentando-se com alta viscosidade.

A maioria dos pacientes com asma apresenta um comprometimento mais acentuado nas pequenas vias aéreas, entre 2 e 6 mm de diâmetro. Os brônquios apresentam com freqüência hiperplasia de células caliciformes, metaplasia e hipertrofia de glândulas mucosas, ectasia de ductos glandulares e desnudamento das células ciliadas resultando em perda da função ciliar, favorecendo a presença de muco intraluminal. Dados das últimas três décadas apresentam evidências de que o pulmão distal que inclui as pequenas vias aéreas menores de 2mm de diâmetro e o parênquima pulmonar, contribui também para a patogênese da asma (Sanerkin, Evans *et al.*, 1965).

De acordo com a definição de asma, os sintomas estão associados a uma variável limitação ao fluxo aéreo, que pode ser revertida espontaneamente ou sob efeito do tratamento. Todavia, é por demais conhecido que a asma determina uma inflamação crônica das vias aéreas, com remodelamento estrutural na parede das vias aéreas que pode ser irreversíveis mesmo com o tratamento, resultando em obstrução fixa irreversível (Seow *et al.*, 1998).

O processo de injúria e reparação apresenta-se constantemente ativado, durante a inflamação crônica vista na asma. A incidência é maior em pacientes com asma não-alérgica severa, onde as alterações estruturais da parede brônquica são mais intensas. O remodelamento brônquico parece ser devido a

uma persistência dos mecanismos crônicos de reparação, que determina várias alterações estruturais, com a combinação de um aumento na ativação de fatores pró-fibrose de crescimento e um desequilíbrio entre a síntese e a degradação de matriz extracelular. Caracteriza-se por um processo de fibrogênese, com espessamento da membrana basal, edema, proliferação e congestão vascular da submucosa e lâmina própria com aumento da permeabilidade capilar.

### **1.3.3. Resposta asmática precoce**

Como já é conhecido na asma alérgica, a provocação bronquial com inalação de antígenos resulta em rápida broncoconstrição com resposta máxima em 15 a 30 minutos após o desafio e resolvida em 1 a 3 horas (Pepys *et al.*, 1975). A rápida resposta e relativamente rápida reversão sugere que o broncoespasmo é o mecanismo predominante.

O desenvolvimento da resposta asmática precoce lembra uma reação de hipersensibilidade imediata como a que ocorre em outros locais. Além disso, o grau de participação dos mastócitos nesta resposta é bastante significativa, correspondendo ao evento celular majoritário da asma precoce (Holgate *et al.*, 1986).

Imediatamente após a inalação do alérgeno, os mastócitos localizados nos pulmões e na mucosa nasal sensibilizados previamente pela IgE, são ativados pela ligação cruzada do antígeno aos receptores IgE da superfície de sua membrana celular, resultando na liberação de grânulos por difusão passiva. Para a espécie humana, e outros mamíferos o mediador mais conhecido liberado pelos

mastócitos é a histamina, que se encontra presente e participa na reação alérgica imediata, desenvolvendo vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa brônquica e intestinal, e aumento da secreção de muco, por atuar no receptor H<sub>1</sub> (Rosenthal *et al.*, 1977). Sua ação é curta, pois a histamina é rapidamente metabolizada em 1 a 2 minutos, sendo 70% metabolizada pela histamina-N-metiltransferase e 30% pela diamino-oxidase (histaminase). O pré-tratamento de pacientes asmáticos com antagonistas anti H<sub>1</sub> altamente potentes e seletivos, atenua a fase precoce da asma (Howarth & Holgate, 1985; Rafferty *et al.*, 1986).

Os mediadores liberados e produzidos durante o processo de degranulação dos mastócitos podem ser divididos em quatro grupos: moléculas pré-formadas e armazenadas nos grânulos (histamina, serotonina, fatores quimiotáticos para eosinófilos, TNF- $\alpha$ , Endotelina-1); moléculas formadas durante o processo de degranulação (superóxidos, leucotrienos, prostaglandinas, adenosina); proteínas recentemente sintetizadas, transcritas horas após a iniciação da degranulação (interleucinas, MP-1, fatores de crescimentos de colônias de macrófagos); material macromolecular derivado dos “grânulos matrix” que podem ter seus efeitos perpetuados por um período prolongado, após a degranulação (triptase, heparina, quimase, catepsina G, carboxipeptidase, peroxidase e fatores inflamatórios) (Kaliner, M.A *et al.*, 1999).

A resposta dos mediadores liberados como conseqüência do desafio alérgico pode ser inibida pelo pré-tratamento com drogas antialérgicas,

cromoglicato de sódio e agonistas adrenérgicos beta-2 como salbutamol (Church, 1982; Howarth *et al.*, 1985).

Outras células também podem participar na resposta asmática precoce como os macrófagos (Joseph *et al.*, 1981), eosinófilos (Capron *et al.*, 1981) e plaquetas (Joseph *et al.*, 1983).

#### **1.3.4. Resposta asmática tardia**

**As primeiras descrições da resposta asmática tardia datam de 1873 quando o pesquisador Blackley em uma exposição acidental de pólen no laboratório observou que os sintomas da asma podem ocorrer horas após a inalação do antígeno podendo persistir por alguns dias. Em 1970, Altounyan observou que, após a inalação do alérgeno, ocorria gradual aumento da resposta bronquial para histamina. Posteriormente, Cockcroft *et al.*, (1977), associaram o aumento da resposta bronquial apresentado para a histamina com a resposta asmática tardia.**

Em geral, os fatores que promovem a reação alérgica podem diminuir após uma resposta imediata ou avançar para uma resposta asmática tardia. Estas evidências sugerem que os níveis de anticorpos circulantes principalmente de IgE podem ser importantes, pois a resposta tardia ocorre mais provavelmente em indivíduos com alto grau de sensibilização ao alérgeno (Robertson *et al.*, 1974). A magnitude da resposta precoce e portanto o nível de reatividade das vias aéreas, parece também ser importante no desenvolvimento subsequente da resposta

tardia (Hargreave *et al.*, 1974; Cockcroft *et al.*, 1974). Pacientes asmáticos com alta reatividade nas vias aéreas tem mais probabilidade de desenvolver a resposta asmática tardia.

**Na fase de inflamação crônica da mucosa das vias aéreas, característica da reposta tardia, temos uma confluência de linfócitos T, mastócitos, eosinófilos e basófilos, associados a um estado de hiperreatividade brônquica. Esse processo de asma alérgica crônica consta com a contínua ativação de mastócitos na mucosa brônquica, como demonstrado pela presença de triptase e histamina no líquido do lavado broncoalveolar; pelas características de degranulação quando vistas pela microscopia eletrônica; e pelas evidências de síntese contínua de IL-4 e IL-5. Secretam um grande número de mediadores, capazes de explicar não só os sintomas de asma, mas todas as características patológicas presentes na parede brônquica.**

Pacientes com asma apresentam brônquios com angiogênese exacerbada, mais vasos e maior percentual de área vascular do que não asmáticos. Aqueles com asma severa apresentam um número significativamente maior de vasos do que portadores de asma leve ou moderada. Os capilares e vênulas apresentam edema de suas paredes e espessamento da membrana basal subendotelial; nas arteríolas evidenciam-se miócitos hipotróficos ou atróficos. A rede é muito rica na lâmina própria, porém restrita entre as fibras musculares lisas onde ocorre menor infiltração inflamatória (Salvato *et al.*, 2001).

Um achado típico de pacientes com asma é o recrutamento, ativação e infiltração de eosinófilos nas paredes edemaciadas dos microvasos e tecidos

perivasculares, determinando a liberação de proteínas pró-inflamatórias tóxicas. Este intenso recrutamento de células inflamatórias está associado a mudanças estruturais vasculares mais intensas. Protrusões musculares intra-arteriolas presumivelmente regulam o fluxo sanguíneo na rede capilar e/ou sinusóides. Esta função pode sofrer alterações quando ocorre o aparecimento do processo de remodelamento da asma (Salvato *et al.*, 2001).

Na asma grave a neovascularização da mucosa tem atuação importante no remodelamento brônquico, estando associada à intensa expressão tanto de selectinas endoteliais e moléculas de adesão pertencentes à superclasse das imunoglobulinas. De particular importância é a VCAM-1 (molécula de adesão à célula vascular) que está sob regulação do TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral -  $\alpha$ ), IL-4 e IL-13. Através de sua interação com a  $\beta_2$ -integrina VLA-4, o VCAM-1 torna-se o grande responsável pelo recrutamento seletivo para as vias aéreas de eosinófilos, basófilos e linfócitos T. Na asma crônica o número de microvasos na submucosa está aumentando como consequência da maior secreção de fatores de crescimento vascular, incluindo a ET-1 (endotelina-1), NO (óxido nítrico) e VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) (Salvato G, 2001).

Ocorre infiltrado inflamatório no epitélio, lâmina própria e submucosa, por eosinófilos, células plasmáticas, fibroblastos (células-chave no processo de reparo tecidual), predominando os eosinófilos que respondem por 5 a 50% do infiltrado celular. Mastócitos em número considerável são encontrados na submucosa, no epitélio e mesmo na luz brônquica, onde interagem com alérgenos inalados antes mesmo de penetrarem no epitélio. Além disso, a asma está associada a uma

baixa taxa de apoptose, a qual está em parte relacionada ao aumento da expressão do GM-CSF (fator de estimulação de colônias de macrófagos e granulócitos) que parece ter um importante papel regulador na apoptose celular (Vrugt B., Wilson S. *et al.*, 2000).

O dano estrutural do epitélio brônquio é uma das características mais descritas em estudos *post-mortem* de pacientes com asma grave. As células do epitélio colunar soltam-se de suas bases (desnudamento epitelial), provavelmente como resultado de uma apoptose prematura, com a perda da adesão intercelular. A extensão do dano epitelial relaciona-se com a gravidade da asma e com o nível de hiperresponsividade brônquica. A ocorrência de hiperplasia calciforme provavelmente representa uma resposta compensatória ao dano epitelial.

Outra anormalidade estrutural caracteriza-se pelo aumento do número de miofibroblastos cuja magnitude correlaciona-se com a espessura subepitelial (Barnes JB, *et al.*, 1998). Como os miofibroblastos representam uma fonte bem conhecida de colágeno intersticial, é plausível atribuir-lhes a responsabilidade de fibrose subepitelial. A evolução para fibrose subepitelial pode ser um dos fatores que contribui para obstrução irreversível das pequenas vias aéreas e persistência da hiperresponsividade mesmo após tratamento com corticóide. O grau de deposição subepitelial de colágeno em decorrência da proliferação de miofibroblastos e conseqüente secreção de colágeno, está relacionado à expressão das citocinas TGF- $\beta_1$  e  $\beta_2$  (fator transformador do crescimento  $\beta$ ), FGF (fator de crescimento de fibroblastos) IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina-1), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) ET-1 e IL-4. Os

miofibroblastos são também fonte de citocinas pró-inflamatórias, incluindo as células tronco necessárias para o crescimento, maturação e sobrevivência do mastócito e o GM-CSF, um potente inibidor da apoptose dos eosinófilos. Os miofibroblastos são altamente eficientes na manutenção da sobrevivência dos mastócitos e eosinófilos, ambos pela secreção de produtos solúveis e através do contato célula-célula (Naylon B, 1992). O preciso papel do TGF- $\beta$  nas vias aéreas de asmáticos ainda está por ser mais bem determinado, não havendo dúvidas entretanto, no seu envolvimento no desenvolvimento da fibrose subepitelial, onde uma relação direta entre TGF- $\beta$ 1 mRNA (Mohammed *et al.*, 1996).

Assim, o processo inflamatório parece ser fundamental para o desenvolvimento do processo em seres humanos, estando evidente que existe uma grande variedade de tipos celulares e mediadores que contribuem de forma importante para o desenvolvimento da resposta asmática tardia. Elas são responsáveis pela broncoconstrição e pelo desenvolvimento de uma hiperreatividade inespecífica cuja associação com a resposta asmática tardia ainda não está bem esclarecida (Hutson, 1989).

#### **1.4. MODELOS ANIMAIS DE ASMA**

Os estudos da fisiopatologia e mecanismos envolvidos no desenvolvimento da asma foram realizados em sua maioria a partir de modelos experimentais. É grande a diversidade modelos animais, que são utilizados visando mimetizar as alterações observadas durante o processo asmático. A imunização a um dado

antígeno e sua rerepresentação constiuem a base da maioria dos modelos (Jancar *et al.*, 1997). Assim, podemos estudar tanto *in vivo* como *in vitro* a resposta das vias aéreas à rerepresentação ao antígeno. Em modelos animais a sensibilização a um alérgeno específico acarreta o desenvolvimento de processo inflamatório similar ao encontrado em pulmões de pacientes asmáticos.

Primariamente, a resposta asmática tardia foi descrita e estudada em um modelo desenvolvido em coelhos por Champain *et al.* em 1982. Os coelhos eram, inicialmente, sensibilizados através de injeções intraperitoniais de soluções contendo proteínas isoladas de *Alternaria tenius*, em dois grupos de animais. No primeiro grupo a aplicação era realizada 24 horas após o nascimento dos animais. Neste momento ocorre a produção preferencial do anticorpo IgE para o antígeno utilizado. No segundo grupo a aplicação era efetuada 7 dias após o nascimento, levando a produção de IgE e IgG. Com a broncoprovocação dos dois grupos através da inalação do antígeno, foi observado que os coelhos que produziram preferencialmente apenas IgE desenvolveram obstrução precoce e tardia das vias aéreas. Os resultados obtidos sugeriram que imunoglobulinas IgE antígeno-específicas são necessárias para iniciar o processo de desenvolvimento da asma tardia induzida pelo antígeno e que, contrariamente, a IgG antígeno-específica não estava associada ao processo asmático tardio (Behrens *et al.*, 1984).

Outro estudo foi realizado para se analisar a resposta asmática tardia. Ratos Brown-Norway foram ativamente sensibilizados através de injeção subcutânea de ovoalbumina e, subseqüentemente, submetidos ao desafio antigênico por inalações. Os sintomas detectados foram, em alguns aspectos, semelhantes àqueles observados para pacientes humanos. Assim, no modelo

utilizado, a resposta broncoconstritora tardia ocorreu mesmo na ausência da reação de resposta anafilática imediata. Contudo, o desenvolvimento da resposta tardia não estava associada a alterações na reatividade das vias aéreas (Eidelman *et al.*, 1988). Ratos Wistar ativamente sensibilizados com ovoalbumina também constituem um modelo animal utilizado na investigação do processo asmático (Bellofiore & Marin, 1988; Watanabe & Mishima, 1990). A provocação das vias aéreas com ovoalbumina, nesta situação, leva claramente ao aparecimento das duas fases aguda e tardia (Lissen *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1993; Viana & Garcia-Leme, 1995).

Estudos histopatológicos revelaram que a imunização de camundongos através do implante de um pequeno fragmento de ovo de galinha no tecido subcutâneo produzia infiltração de eosinófilos ao nível peribrônquico, perivascular e intraepitelial do tecido pulmonar desses animais (Carvalho *et al.*, 1999).

Um modelo animal que vem sendo utilizado há alguns anos pelo seu mimetismo da asma humana, é o desenvolvido em cobaias (*Cavia porcellus*, também conhecido como 'porquinho da índia'), principalmente devido à semelhança existente entre as cobaias e os seres humanos no que tange às respostas contráteis e relaxantes a várias substâncias, ao desenvolvimento de mediadores químicos similares em respostas induzidas por antígenos (Collier & James, 1967) e as alterações histopatológicas observadas ao nível dos pulmões após o desafio antigênico (Kallos & Kallos, 1984). O modelo de indução imunológica das vias aéreas pela administração do alérgeno é freqüentemente utilizado em cobaias (Capaz *et al.*, 1993). Cobaias ativamente sensibilizadas apresentam reação anafilática que pode ser letal quando desafiadas com o

antígeno específico. Esta reação foi descrita pela primeira vez em 1910 por Auer e Lewis e estava associada a uma grave broncoconstrição (Hutson, 1989).

No modelo com cobaias descrito por Wieslander *et al.* (1985), a resposta asmática tardia foi relativamente pequena quando comparada com a magnitude da resposta asmática precoce. Neste modelo os animais foram sistematicamente sensibilizados com ovalbumina para produzirem anticorpos dos tipos IgE e IgG, e desafiados com instilação de ovalbumina associada a grânulos de sefarose. O lavado bronco-alveolar dos animais revelou aumento no número de neutrófilos e eosinófilos. Utilizando o mesmo procedimento Anderson *et al.*, (1988), revelaram importante correlação entre os níveis de IgE no soro e a obstrução bronquial observada durante a resposta asmática tardia e também com o número de eosinófilos presentes no lavado bronco-alveolar. Esses estudos demonstraram ainda que o glicocorticóides, como a budesonida, inibia a resposta asmática tardia quando administrado antes do desafio, não reduzia a infiltração celular no pulmão, mas reduzia o extravasamento dos componentes plasmáticos. Tais resultados sugeriram assim que a exsudação plasmática no pulmão pode exercer papel importante no desenvolvimento da resposta asmática tardia e que tal fato pode ocorrer como resultado da ativação de células inflamatória.

Em outro modelo descrito, cobaias foram sensibilizadas com uma mistura de extrato de *Ascaris suum* e hidróxido de alumínio, e posteriormente desafiados através da inalação deste extrato (Lijima *et al.*, 1987). Os resultados demonstraram que a quantidade de IgE antígeno-específico foi significativamente maior em animais que desenvolveram resposta tardia quando comparada à resposta obtida para os animais que exibiram somente a resposta imediata. Nos

animais que apresentaram a resposta tardia também foi observada infiltração acentuada de eosinófilos na parede das vias aéreas. Entretanto, a desvantagem desse modelo consiste no fato de a resposta asmática tardia ocorrer apenas em menos da metade dos animais estudados.

### **1.5. PARTICIPAÇÃO DO CÁLCIO NA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO**

A contração muscular é desencadeada por um aumento na concentração de cálcio livre no citoplasma, este evento pode ocorrer tanto por mecanismos eletromecânicos como farmacomecânicos. Como exemplo de fatores positivos à entrada do cálcio por mecanismos eletromecânicos, podemos citar os canais de cálcio que são ativados por despolarização da membrana, também chamados dependentes de voltagem (VOC, do inglês *voltage-operated channel*), e como fatores farmacomecânicos aqueles canais operados por receptores de membrana específicos ou intracelulares independentes do potencial de ação (ROC, do inglês *receptor-operated channel*) (Cuthbert *et al.*, 1994 ; Tansey *et al.*, 1994).

A fibra muscular lisa não possui troponina, uma das proteínas reguladoras da contração ativadas pelo cálcio que é encontrada na fibra muscular esquelética, em seu lugar a célula muscular lisa possui grande quantidade de calmodulina, uma outra proteína também controlada pela presença de cálcio livre, que ao contrário da troponina que se encontra fixada a outras proteínas contráteis, a calmodulina se apresenta na forma livre no citosol, e ao interagir com quatro moléculas de cálcio ativa pontes cruzadas miosínicas, esta ativação é feita através

de fosforilação, que por sua vez é realizada pela enzima miosina quinase, uma das enzimas ativadas pela calmodulina. As cadeias leves de cada estrutura da cabeça da miosina, chamadas cadeias reguladoras, são fosforiladas pela miosina quinase, também chamada MLCK (do inglês, *myosin light chain kinase*), adquirindo a capacidade de se fixar ao filamento de actina, promovendo o seguimento no processo de contração, após desfosforilação, pela enzima miosina fosfatase, a interação entre a actina e as cabeças da miosina deixa de existir, ocorrendo desta forma o relaxamento da fibra (Guyton, 1996).

### **1.5.1. Fontes de cálcio para contração**

Existem duas fontes principais de cálcio utilizadas pelas células musculares para a contração, as intracelulares e as extracelulares. A participação relativa de ambas as fontes difere para cada tecido ou órgão, sendo dependente do estímulo contrátil desencadeador ou das características bioquímicas das células, ou ainda, do padrão da resposta contrátil, rápida (fásica) ou mantida (tônica) do tecido muscular. Os canais de membrana, pelos quais o cálcio extracelular entra, são classificados pelo tipo de estímulo ativador, desta forma são divididos em canais dependentes de voltagem, os quais são ativados por variações definidas no potencial de ação de membrana, e canais operados por receptores, onde a ocupação de receptores de membranas por agonistas específicos leva a alterações na conformação estrutural da proteína do receptor, conferindo-lhe o estado ativado. Caso o receptor não seja o próprio canal, a sua ativação transmite o sinal através de reações intracelulares desfechando na ativação de

canais em compartimentos de armazenamento de cálcio intracelulares. O principal compartimento intracelular de armazenamento de cálcio é o retículo sarcoplasmático. Logo após a liberação de seus estoques, o retículo sarcoplasmático promove a captura não apenas do que foi liberado, como também daquele que permeou a membrana através dos canais dependentes de voltagem.

## **1.6. Hiperreatividade Brônquica**

**Uma explicação para a hiperresponsividade bronquial das vias aéreas do processo asmático seria a existência de um “mecanismo nervoso anormal” até meados do século passado. Atualmente, foi demonstrado em experimentos laboratoriais e estudos clínicos que a hiperresponsividade bronquial poderia ser consequência da resposta inflamatória das vias aéreas (Barnes, 1989). Este aumento da resposta contrátil da musculatura das vias aéreas para diversos estímulos é comumente descrito e definido como hiperreatividade inespecífica (Marthan, 1994).**

**As principais características são consequências do aumento da expressão de múltiplas proteínas que estão envolvidas em uma complexa cascata inflamatória. Dentre as proteínas inflamatórias incluem citocinas, quimiocinas, enzimas que produzem mediadores inflamatórios, receptores para mediadores inflamatórios e adesão de moléculas (Fernandes *et al.*, 2003). Desta forma, várias células são ativadas gerando um processo caótico cíclico, com substâncias ativando e reativando outras células,**

**mesmo quando a causa desencadeante já tenha sido removida (Chung et al., 1990).**

Vale salientar que o aumento da expressão da maioria das proteínas inflamatórias é resultado de um aumento na transcrição genética, sendo que vários destes genes não são expressos em células normais sob condições habituais. Mudanças na transcrição de genes são reguladas por fatores de transcrição. Nas doenças inflamatórias, os fatores de transcrição ativados por estímulos inflamatório (alérgenos, vírus, oxidantes e citocinas) acionam genes, determinando aumento da síntese de proteínas inflamatórias e outras proteínas e enzimas envolvidas na ativação celular.

Vale salientar que os mecanismos fisiopatológicos da hiperreatividade, assim como a natureza dos fatores que alteram as respostas celulares envolvidas no processo asmático continua incompletamente esclarecido. Desta forma se torna válido o esforço em pesquisas nessa área, não só no intuito de compreender a complexa e nebulosa rede bioquímica envolvida na hiperreatividade e na fase tardia ou inflamatória do processo asmático, como tentar propor mecanismos ou alvos terapêuticos para a introdução de novos agentes farmacológicos a terapêutica da asma, ou ainda, sugerir novas ações farmacológicas para fármacos já conhecidos na prática clínica.

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo Geral

- Avaliar a possível participação de canais iônicos na hiperreatividade induzida por ovalbumina em traquéias isoladas de ratos Wistar.

### Objetivos Específicos

- Detectar a participação de canais de cálcio na hiperreatividade induzida pela sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina na resposta contrátil de traquéias isoladas de ratos ao potássio, acetilcolina e serotonina.
- Verificar a ocorrência de taquifilaxia na contratilidade de traquéias isoladas de ratos, após o desafio antigênico com ovalbumina em traquéias isoladas de ratos.
- Evidenciar a eventual participação de canais de cloreto no mecanismo de hiperreatividade induzida pela sensibilização e desafio antigênico na resposta contrátil de traqueias isoladas de ratos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIAIS**

##### **3.1.1. Animais**

Os experimentos foram realizados utilizando-se ratos (*Rattus norvegicus*) adultos, machos da variedade Wistar, pesando entre 250 e 350 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina desta mesma Universidade. Os animais foram divididos em grupos de 6 por gaiola, e mantidos durante uma semana no Biotério do Laboratório de Farmacologia do Aparelho Respiratório em períodos reversos de claro/escuro de 12 horas para ambientação e aclimatação. Aos animais foram fornecidos água e ração *ad libitum*.

##### **3.1.2. Drogas e Soluções**

- Cloreto de Cálcio (Quimibras Ind. Químicas S.A.).
- Cloreto de Potássio (Merck S.A. Ind. Químicas).
- Hidrato de Cloral (Cromato Produtos Químicos)
- Hidróxido de Alumínio (Sanofi Winthrop Farmacêutica Ltda.).
- Ovoalbumina (Sigma Chemical Co.).
- Serotonina (Sigma Chemical Co.).
- Acetilcolina (Sigma Chemical Co.).

- Atropina (Sigma Chemical Co.).
- EDTA (Sigma Chemical Co.).
- Nifedipina (Sigma Chemical Co.).
- Solução Fisiológica 0,9% (NaCl 9g/l)
- Solução de Krebs-Henseleit (mmol/l): NaCl 118,0; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; Glicose 11,0
- Solução de Krebs-Henseleit modificada sem cálcio (mmol/l): NaCl 122,4; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; Glicose 11,0

### 3.1.3. Equipamentos

- Balança para pesagem de animais (Filizola, ID-1500).
- Balança analítica (A&D Comp.,50004)
- Bomba de aquecimento e circulação de água com temperatura controlável (Haake)
- Cronógrafo (Citizen Watch Co.)
- Nebulizador ultrassônico (ICEL,US-1000)
- Sistema de aquisição de dados acoplado a um microcomputador com programa para “display” gráficos (desenvolvidos em nosso laboratório)
- Transdutor isométrico Narco Biosystems Co., modelo F-60).

### 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Sensibilização e bronco-provocação antigênica

A sensibilização ao antígeno (ovalbumina) foi realizada ativamente através da administração, por via intraperitoneal, de solução contendo 1 µg/ml de ovoalbumina (OVA) e 1 mg/ml de Al(OH)<sub>3</sub>, em solução salina (NaCl 0,9%) sendo injetados 0,66 ml por animal. Este procedimento ocorreu no “dia zero”, 13 a 14 dias antes da realização dos experimentos, e este grupo de animais foi definido como sensibilizados.

Alguns grupos de animais sensibilizados foram submetidos, imediatamente após o término do período de sensibilização, a bronco-provocação antigênica. A bronco-provocação ocorreu zero ou 24 horas antes dos experimentos. Para tal, os animais foram colocados em uma caixa acrílica medindo 20 x 30 x 21 cm, que continha dois orifícios para a circulação de ar, um dos quais era acoplado um nebulizador ultrassônico e expostos a nebulização de OVA durante 30 minutos. Este período de 30 minutos foi dividido em duas sessões seqüenciais de 15 minutos cada. Na primeira sessão foi utilizada OVA na concentração de 1 mg/ml e na segunda sessão de 5 mg/ml, estes animais receberam a definição de desafiados. Alguns grupos de animais desafiados, receberam injeções intraperitoneais de solução de metilsergida (1 mg/ml) na dose de 1mg/kg 40 minutos antes da broncoprovocação.

Os animais controle receberam no momento da sensibilização injeções intraperitoneais de solução salina, e aqueles que serviram de controle para os grupos desafiados, além de injeções de solução salina no momento da sensibilização, foram submetidos também 13 a 14 dias após, a duas inalações

sucessivas de solução salina de 15 minutos cada, totalizando 30 minutos, no momento do desafio dos animais teste.

### **3.2.2. Avaliação da contratilidade da musculatura traqueal**

Os animais foram inicialmente anestesiados pela administração intraperitoneal de hidrato de cloral (400 mg/Kg), que foi escolhido por causar menos efeitos sobre as vias aéreas e menos estresse no animal, e a seguir, foram colocados na posição de decúbito dorsal para a excisão da traquéia. Após a remoção da traqueia os animais foram sacrificados por exsanguinação, através de secção da artéria aorta abdominal. A região cervico-torácica anterior foi aberta cirurgicamente e a traquéia foi então, removida cuidadosamente e levada a uma placa de petri contendo solução de Krebs-Henseleit aerada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) onde foi também cuidadosamente removido o tecido conectivo. Segmentos das traquéias, com aproximadamente 0,5 cm de comprimento foram então montados sob a forma de anéis em cubas para órgãos isolados com capacidade de 10 ml contendo solução de Krebs-Henseleit aerada com mistura carbogênica e foram mantidas à temperatura de  $36,5 \pm 0,2$  °C. A tensão inicial aplicada à traquéia foi de 1 gF e mantida neste nível por um período de 50 minutos para que se atingisse o equilíbrio do sistema. Neste período a tensão era ajustada a 1 gF, a cada 15 minutos, sendo também o líquido nutritivo trocado.

As contrações isométricas foram registradas por intermédio de um transdutor de força, acoplado a uma placa de aquisição de dados analógico-digital.

Os dados provenientes do transdutor e adquiridos  a placa eram transferidos e registrados em um microcomputador, que permitia a obtenção, em gramas de tensão, da força gerada na contração desenvolvida pela preparação. O registro das contrações musculares foi realizado através de programa específico de aquisição e armazenamento de dados referente a força desenvolvida pela preparação, sendo este *software* inteiramente desenvolvido em nosso laboratório.

Em cada sessão experimental foram montadas duas preparações ao mesmo tempo, uma com traquéias oriundas de animais do grupo controle, e outra com traquéias provenientes de animais do grupo experimental. A ordem em que as traquéias eram montadas para o ensaio era alternada em cada sessão, ou seja, caso na sessão anterior houvesse sido montada inicialmente uma traquéia controle e uma experimental, nesta sessão a ordem era invertida, a traquéia do grupo experimental era montada primeiro. Este procedimento proporcionava também alternância dos sistemas utilizados para registro das contrações (cuba para órgão isolado + transdutor + canal do “software” utilizado), pois sempre se iniciava a montagem pelo sistema e canal A e a seguir pelo B. Assim se em uma sessão o sistema “A” registrava o grupo experimental e o “B” o controle, na sessão seguinte ocorria à inversão registrando o “B” o experimental e “A” o controle. A intenção destes procedimentos era fazer com que as condições experimentais (líquido de incubação, solução dos agonistas e antagonista utilizadas etc.) fossem as mesmas para os dois grupos. A alternância dos sistemas prevenia, eventuais diferenças entre os dois sistemas de registro, apesar de a calibração mostrar perfeita equivalência entre os dois canais.

### 3.2.3. Curvas concentração-efeito para a acetilcolina, serotonina e potássio

As curvas concentração-efeito (CCE) foram obtidas utilizando-se o método cumulativo (Van Rossum, Van den Brink, 1963) caso o tecido se apresentasse absolutamente quiescente por um período de 60 segundos após a administração de um dado agonista, consideramos a resposta contrátil igual a zero. No entanto, quando a resposta era detectada visualmente, tanto pelo traçado ascendente da linha de registro, como pelo valor numérico da tensão desenvolvida (gramas de tensão) aguardava-se tempo suficiente para que se formasse um “plateau” o que levava aproximadamente 90 segundos. As concentrações eram adicionadas sucessivamente e, em seguida à formação do “plateau”, acrescidas de um fator igual a 3 (equivalente a meia unidade em escala logarítmica). Todas as traquéias isoladas foram utilizadas em apenas uma sessão experimental. Ao final dos experimentos as traquéias foram pesadas e seus pesos comparados com a resposta desenvolvida (dados não mostrados).

### 3.2.4. Curvas concentração-efeito para o cálcio

Após o período de equilíbrio de 50 minutos, em solução de Krebs-Henseleit tal como descrito acima, o líquido nutritivo foi trocado por solução de Krebs-Henseleit modificada sem cálcio e com EDTA ( $10^{-5}$  M), nifedipina ( $10^{-6}$  M), atropina ( $10^{-6}$  M) e indometacina ( $10^{-5}$  M) minutos após a troca do líquido de incubação foi obtida a resposta contrátil inicial induzida pela acetilcolina ( $10^{-4}$  M), ou pela serotonina ( $10^{-5}$  M) ou pelo KCl (60 mM). Após a estabilização da resposta com a

formação do “plateau” foi adicionado  $\text{CaCl}_2$  em concentrações crescentes (acrescidas de um fator 3,  $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  M) obtendo-se assim a CCE ao cálcio. Nos experimentos nos quais o KCl foi agonista utilizado para a resposta contráctil inicial não foi usada nifedipina.

### **3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A comparação estatística entre as médias foi realizada através do teste “t” de Student, e quando necessário (três ou mais grupos) com a análise de variância de Fischer-Snedecor. Os *softwares* Microcal Oringin v.5.0 e Graph Pad Prism v.3.0 foram utilizados para aplicação dos testes estatísticos. Os resultados foram expressos sob a forma de média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As CE50 obtidas foram comparadas através da média geométrica dos experimentos individuais para um intervalo de confiança (I.C.) de 95%. Probabilidades iguais ou inferiores a 5% ( $p < 0.05$ ) foram aceitas como indicativas de diferença significativa entre os grupos.

## **4. RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeito da sensibilização com a OVA na resposta induzida pelo potássio em traquéia isolada de rato

As CCE, obtidas para o potássio, com traquéias isoladas de ratos controles e sensibilizados à OVA são apresentadas na figura 01a. A tabela 01 apresenta os respectivos valores das  $CE_{50}$  e RM. A aplicação cumulativa de KCl ( $10^{-3}$  a  $10^{-1}$  M) na solução extracelular produziu, de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), desenvolvimento de força contrátil cuja resposta máxima foi atingida na concentração de 100 mM, tanto nos animais controle como nos animais sensibilizados. Podemos observar que não houve alteração significativa nem na RM nem na  $CE_{50}$  obtidas em traquéias de animais sensibilizados, em relação à RM e à  $CE_{50}$ , respectivamente, das traquéias do grupo controle.

### 4.2. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta induzida pelo potássio em traquéia isolada de rato

As CCE, obtidas para o potássio 24 horas após o desafio antigênico, em traquéias isoladas de ratos controle ou sensibilizados e desafiados com OVA (SD24), são apresentadas na figura 01b. A tabela 01 apresenta os respectivos valores das  $CE_{50}$  e RM. A aplicação cumulativa de potássio ( $10^{-3}$

a  $10^{-1}$  M) produziu, de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), desenvolvimento de contração tanto nos animais controle como nos animais SD24. A força máxima foi atingida em ambos os grupos com 100 mM de potássio. Podemos observar que houve aumento significativo ( $p < 0,01$ , teste "t" de Student) de 139,21% na RM obtida em traquéias de animais SD24, em relação à RM das CCE obtidas com traquéias do grupo controle. A comparação estatística revelou alteração significativa entre os valores de  $CE_{50}$ .

#### **4.3. Efeito da sensibilização à OVA na resposta contrátil induzida pela adição de $Ca^{2+}$ em traquéia isolada de rato mantida em solução extracelular rica em potássio, sem $Ca^{2+}$ e na presença de atropina**

As CCE, obtidas pela adição de cálcio ( $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  M), após contração induzida por KCl (60 mM), em traquéias isoladas de ratos controles e sensibilizados com OVA são apresentadas na figura 02a. A tabela 02 apresenta os valores das  $CE_{50}$  e RM. A adição de  $Ca^{2+}$ , na solução extracelular sem cálcio e com EDTA, na presença de alto potássio e atropina ( $10^{-6}$  M), de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), produziu contrações cuja RM foi atingida na concentração de 10 mM. Podemos observar que não houve alteração significativa na RM nas CCE obtidas em traquéia de animais sensibilizados, em relação à RM das CCE obtidas com traquéia do grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativa na comparação entre os valores de  $CE_{50}$ .

**4.4. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta contrátil induzida pela adição de  $\text{Ca}^{2+}$  em traquéia isolada de rato mantida em solução extracelular rica em potássio, sem  $\text{Ca}^{2+}$  e na presença de atropina**

As CCE, obtidas pela adição de cálcio ( $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  M), após contração induzida por KCl (60 mM) 24 horas após o desafio antigênico, em traquéia isolada de ratos controle ou sensibilizados e desafiados com OVA (SD24) são apresentadas na figura 02b. A tabela 02 apresenta os valores das  $\text{CE}_{50}$  e RM. A adição de  $\text{Ca}^{2+}$ , na solução extracelular sem cálcio e com EDTA, na presença de alto potássio e atropina ( $10^{-6}$  M), de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), produziu contrações cuja RM foi atingida na concentração de 10 mM. Podemos observar que houve aumento significativo ( $p < 0,01$ , teste “t” de Student) de 135,71% na RM obtida em traquéia de animais sensibilizados, em relação à RM obtida com traquéia do grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativa na comparação entre os valores de  $\text{CE}_{50}$ .

**4.5. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA imediatamente antes dos experimentos na resposta contrátil induzida pela adição de  $\text{Ca}^{2+}$  em traquéia isolada de rato mantida em solução extracelular rica em potássio, sem  $\text{Ca}^{2+}$  e na presença de atropina**

As CCE, obtidas pela adição de cálcio ( $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  M), após contração induzida por KCl (60 mM) imediatamente após o desafio antigênico, em traquéia isolada de ratos controles ou sensibilizados e desafiados com OVA (SD0) são apresentadas na figura 03. A tabela 03 apresenta os valores das  $CE_{50}$  e RM. A adição de  $Ca^{2+}$ , na solução extracelular sem cálcio e com EDTA, na presença de alto potássio e atropina ( $10^{-6}$  M), de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), produziu contrações cuja RM foi atingida na concentração de 10 mM. Podemos observar que houve aumento significativo ( $p < 0,01$ , teste “t” de Student) de 103,57% na RM obtida em traquéia de animais sensibilizados, em relação à RM das CCE obtidas com traquéia do grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativa na comparação entre os valores de  $CE_{50}$ .

#### 4.6. Efeito da sensibilização a ovalbumina (OVA) na resposta induzida pela acetilcolina em traquéia isolada de rato

As curvas concentração-efeito (CCE), obtidas para a acetilcolina, com traquéia isoladas de ratos controles e sensibilizados à OVA são apresentadas na figura 04a. A tabela 04 apresenta os valores das concentrações efetivas 50% ( $CE_{50}$ ) e respostas máximas (RM) para estes experimentos. A aplicação cumulativa de acetilcolina ( $10^{-8}$  a  $10^{-3}$  M) produziu, de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), desenvolvimento de força contrátil cuja resposta máxima foi atingida na concentração de 1 mM, tanto nos animais controle como nos animais

sensibilizados. Podemos observar que houve aumento significativo ( $p < 0,01$ , teste T de Student) de 16,81% na RM, em relação à RM obtida no grupo controle, embora não tenha havido alteração significativa da  $CE_{50}$ .

**4.7. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta induzida pela acetilcolina em traquéia isolada de rato**

As CCE, obtidas para a acetilcolina 24 horas após o desafio antigênico, em traquéias isoladas de ratos controle ou sensibilizados e desafiados com OVA (SD24), são apresentadas na figura 04b. A tabela 04 apresenta os respectivos valores das  $CE_{50}$  e RM. A aplicação cumulativa de acetilcolina ( $10^{-8}$  a  $10^{-3}$  M) produziu, de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), desenvolvimento de força contrátil tanto nos animais controle como nos animais SD24. A força máxima foi atingida em ambos os grupos com 1 mM de acetilcolina. Podemos observar que houve aumento significativo ( $p < 0,01$ , teste "t" de Student) de 67,29% na RM obtida em traquéias de animais SD24, em relação à RM das CCE obtidas com traquéias do grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativa na comparação entre os valores de  $CE_{50}$ .

**4.8. Efeito do ácido niflúmico na resposta induzida pela acetilcolina em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antigenicamente imediatamente antes dos experimentos com OVA**

As CCE, obtidas para a acetilcolina 24 horas após o desafio antigênico na presença de ácido niflúmico ( $10^{-1}$  M), em traquéia isolada de ratos sensibilizados (controle) ou sensibilizados e desafiados com OVA são apresentadas na figura 05. A tabela 05 apresenta os valores das  $CE_{50}$  e respostas máximas (RM). A aplicação cumulativa de acetilcolina ( $10^{-8}$  a  $10^{-3}$  M) produziu, de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), desenvolvimento de força contrátil tanto nos animais controle como nos animais SD24AN. Podemos observar que o ácido niflúmico não alterou a hiperreatividade induzida por OVA na resposta obtida para a acetilcolina. As CCE obtidas com traquéias isoladas de animais do grupo teste apresentaram aumento significativo ( $p < 0,01$ , teste "t" de Student) de 16,78% na RM das CCE obtidas em traquéias de animais sensibilizados e desafiados, em relação à RM das CCE obtidas com o grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração estatisticamente significativa nos valores de  $CE_{50}$ .

#### **4.9. Efeito da sensibilização à OVA na resposta contrátil induzida por $Ca^{2+}$ em traquéia isolada de rato mantida em solução zero $Ca^{2+}$ na presença de acetilcolina e nifedipina**

As CCE, obtidas pela adição de cálcio ( $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  M), após contração induzida por acetilcolina ( $10^{-4}$  M), em traquéias isoladas de ratos controles e sensibilizados com OVA são apresentadas na figura 06a. A tabela 06 apresenta os valores das  $CE_{50}$  e RM. A adição de  $Ca^{2+}$ , na solução extracelular sem cálcio e

com EDTA, na presença de acetilcolina e nifedipina ( $10^{-6}$  M), de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), produziu contrações cuja RM foi atingida na concentração de 10 mM. Podemos observar que não houve alteração significativa da RM nas CCE obtidas em traquéia de animais sensibilizados, em relação à RM das CCE obtidas com traquéia do grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativa na comparação entre os valores de  $CE_{50}$ .

#### **4.10. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta contrátil induzida por $Ca^{2+}$ em traquéia isolada de rato mantida em solução zero $Ca^{2+}$ na presença de acetilcolina e nifedipina**

As CCE, médias obtidas pela adição de cálcio ( $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  M), após contração induzida por acetilcolina ( $10^{-4}$  M) 24 horas após o desafio antigênico, em traquéias isoladas de ratos controle ou sensibilizados e desafiados com OVA (SD24) são apresentadas na figura 06b. A tabela 06 apresenta os valores das  $CE_{50}$  e RM. A adição de  $Ca^{2+}$ , na solução extracelular sem cálcio e com EDTA, na presença de acetilcolina e nifedipina ( $10^{-6}$  M), de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), produziu contrações com RM na concentração de 10 mM. Podemos observar que houve aumento significativo ( $p < 0,05$ , teste "t" de Student) de 57,14% na RM obtida em traquéia de animais sensibilizados, em relação à RM das CCE

obtidas com traquéia do grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativa na comparação entre os valores de  $CE_{50}$ .

#### **4.11. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA imediatamente antes dos experimentos na resposta contrátil induzida por $Ca^{2+}$ em traquéia isolada de rato mantida em solução zero $Ca^{2+}$ na presença de acetilcolina e nifedipina**

As CCE, obtidas pela adição de cálcio ( $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  M), após contração induzida por acetilcolina ( $10^{-4}$  M) imediatamente após o desafio antigênico, em traquéia isolada de ratos controle ou sensibilizados e desafiados com OVA (SD0) são apresentadas na figura 07. A tabela 07 apresenta os valores das  $CE_{50}$  e RM. A adição de  $Ca^{2+}$ , na solução extracelular sem cálcio e com EDTA, na presença de acetilcolina e nifedipina ( $10^{-6}$  M), de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), produziu contrações com RM na concentração de 10 mM. Podemos observar que houve redução significativa ( $p < 0,05$ , teste “t” de Student) de 48,06% na RM nas CCE obtidas em traquéia de animais sensibilizados, em relação à RM das CCE obtidas com traquéia do grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativa na comparação entre os valores de  $CE_{50}$ .

#### **4.12. Efeito da sensibilização à OVA na resposta induzida pela serotonina em traquéia isolada de rato**

As CCE, obtidas para a serotonina, com traquéias isoladas de ratos controles e sensibilizados à OVA são apresentadas na figura 08a. A tabela 08 apresenta os respectivos valores das  $CE_{50}$  e RM. A aplicação cumulativa de serotonina ( $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  M) diretamente na cuba de superperfusão produziu, de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), desenvolvimento de contração cuja resposta máxima foi atingida na concentração de 0,1 mM, tanto nos animais controle como nos animais sensibilizados. Podemos observar que houve aumento significativo ( $p < 0,01$ , teste “t” de Student) de 17,82% na RM, em relação à RM obtida no grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativa na comparação entre os valores de  $CE_{50}$ .

#### 4.13. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta induzida pela serotonina em traquéia isolada de rato

As CCE, obtidas para a serotonina 24 horas após o desafio antigênico, em traquéia isolada de ratos controle ou sensibilizados e desafiados com OVA (SD24), são apresentadas na figura 08b. A tabela 08 apresenta os respectivos valores das  $CE_{50}$  e RM. A aplicação cumulativa de serotonina ( $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  M) produziu, de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), desenvolvimento de força contrátil tanto nos animais controle como nos animais SD24. A força máxima foi atingida em ambos os grupos com 0,1 mM de serotonina. Podemos observar que houve aumento significativo ( $p < 0,01$ , teste “t” de Student) de 146,66% na RM obtida em

**traquéias de animais SD24, em relação à RM das CCE obtidas com traquéias do grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativa na comparação entre os valores de CE<sub>50</sub>.**

#### **4.14. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta induzida pela serotonina em traquéia isolada de ratos tratados com metilsergida**

As CCE, obtidas para a serotonina 24 horas após o desafio, em traquéias isoladas de ratos controle ou sensibilizados e desafiados com OVA tratados com metilsergida (SD24M) 40 minutos antes do desafio são apresentadas na figura 09a. A tabela 09 apresenta os valores das CE<sub>50</sub> e RM. A aplicação cumulativa de serotonina ( $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  M) produziu, de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), desenvolvimento de força contrátil tanto nos animais controle como nos animais SD24M. O aumento de 38,46% na RM obtida em traquéia de animais SD24M, em relação à RM obtida no grupo controle não foi significativo. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativa na comparação entre os valores de CE<sub>50</sub>.

#### **4.15. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA imediatamente antes dos experimentos na resposta induzida pela serotonina em traquéia isolada de ratos tratados com metilsergida**

As CCE, obtidas para a serotonina imediatamente após o desafio, em traquéias isoladas de ratos apenas sensibilizados (controle) e os sensibilizados e desafiados com OVA tratados com metilsergida (SD0M) 40 minutos antes do desafio são apresentadas na figura 09b. A tabela 09 apresenta os valores das  $CE_{50}$  e RM. Podemos observar que houve redução significativa ( $p < 0,01$ , teste “*t*” de Student) na RM obtida em traquéia de animais SD0M, em relação à RM obtida com traquéia do grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativa na comparação entre os valores de  $CE_{50}$ .

#### **4.16. Efeito da nifedipina na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antígenicamente com OVA 24 horas antes dos experimentos**

As CCE, obtidas para a serotonina 24 horas após o desafio antigênico, em traquéia isolada de ratos sensibilizados (controle) ou sensibilizados e desafiados com OVA (SD24N) são apresentadas na figura 10a. A tabela 10 apresenta os valores das  $CE_{50}$  e RM. A aplicação cumulativa de serotonina ( $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  M) produziu, de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), desenvolvimento de força contrátil tanto nos animais controle como nos animais SD24N. Podemos observar que houve redução significativa ( $p < 0,01$ , teste “*t*” de Student) de 48,58% na RM das CCE obtidas em traquéias de animais desafiados, em relação à RM das CCE obtida com o grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração estatisticamente significativa na comparação das  $CE_{50}$ .

#### **4.17. Efeito do ácido niflúmico na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antígenicamente imediatamente antes dos experimentos OVA**

As CCE, obtidas para a serotonina 24 horas após o desafio antigênico na presença de ácido niflúmico ( $10^{-1}$  M), em traquéia isolada de ratos sensibilizados (controle) ou sensibilizados e desafiados com OVA (SD24AN) são apresentadas na figura 10b. A aplicação cumulativa de serotonina ( $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  M) produziu, de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), desenvolvimento de força contrátil tanto nos animais controle como nos animais SD24AN. A tabela 10 apresenta os valores das  $CE_{50}$  e RM. Podemos observar que houve redução de 21,10% embora não significativa na RM das CCE obtidas em traquéia de animais desafiados, em relação às RM das CCE obtidas com o grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativamente estatística na comparação das  $CE_{50}$ .

#### **4.18. Efeito da sensibilização à OVA na resposta contrátil induzida por $Ca^{2+}$ em traquéia isolada de rato mantida em solução zero $Ca^{2+}$ na presença de serotonina e nifedipina**

As CCE, obtidas pela adição de cálcio ( $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  M), após contração induzida por serotonina ( $10^{-4}$  M), em traquéias isoladas de ratos controles e sensibilizados com OVA são apresentadas na figura 11a. A tabela 11 apresenta os valores das  $CE_{50}$  e RM. A adição de  $Ca^{2+}$ , na solução extracelular sem cálcio e

com EDTA, na presença de serotonina e nifedipina ( $10^{-6}$  M), de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), produziu contrações cuja RM foi atingida na concentração de 10 mM. Podemos observar que não houve alteração significativa da RM nas CCE obtidas em traquéia de animais sensibilizados, em relação à RM das CCE obtidas com traquéia do grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativa na comparação entre os valores de  $CE_{50}$ .

#### **4.19. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta contrátil induzida por $Ca^{2+}$ em traquéia isolada de rato mantida em solução zero $Ca^{2+}$ na presença de serotonina e nifedipina**

As CCE, obtidas pela adição de cálcio ( $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  M), após contração induzida por serotonina ( $10^{-4}$  M) 24 horas após o desafio, com traquéia isolada de ratos controle ou sensibilizados e desafiados com OVA (SD24) são apresentadas na figura 11b. A tabela 11 apresenta os valores das  $CE_{50}$  e RM. A adição de  $Ca^{2+}$ , na solução extracelular sem cálcio e com EDTA, na presença de serotonina e nifedipina ( $10^{-6}$  M), de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), produziu contrações com RM na concentração de 10 mM. Podemos observar que não houve alteração significativa na RM obtida em traquéia de animais sensibilizados, em relação à RM das CCE obtidas com traquéias do grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativa na comparação entre os valores de  $CE_{50}$ .

**4.20. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta contrátil induzida por  $\text{Ca}^{2+}$  em traquéia, mantida em solução zero  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de serotonina e nifedipina, isolada de ratos tratados com metilsergida**

As CCE, obtidas pela adição de cálcio ( $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  M), após contração induzida por serotonina ( $10^{-4}$  M) 24 horas após o desafio, em traquéia isolada de ratos tratados com metilsergida (1 mg/Kg) controles ou sensibilizados e desafiados com ovalbumina OVA (SD24M) são apresentadas na figura 12. A tabela 12 apresenta os valores das  $\text{CE}_{50}$  e RM. A adição de  $\text{Ca}^{2+}$ , na solução extracelular sem cálcio e com EDTA, na presença de serotonina, nifedipina ( $10^{-6}$  M), de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), produziu contrações com RM na concentração de 10 mM. Podemos observar que houve aumento de 40,47%, embora não significativo na RM nas CCE obtidas em traquéia de animais desafiados, em relação à RM das CCE obtidas com traquéias do grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativa nos valores de  $\text{CE}_{50}$ .

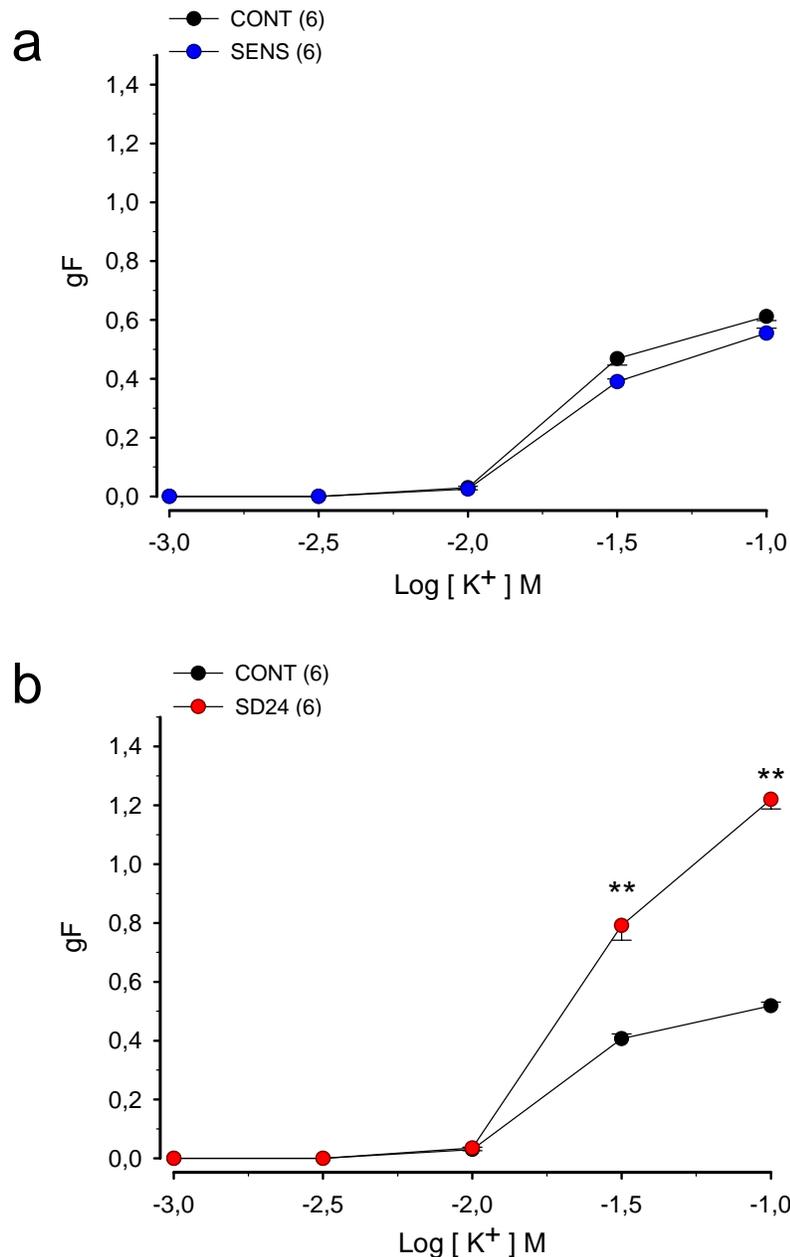
**4.21. Efeito da sensibilização e desafio antigênico OVA 24 horas antes dos experimentos na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos mantidas em LN sem nifedipina**

As CCE, obtidas para a serotonina 24 horas após o desafio, em traquéia isolada de ratos sensibilizados (controle) e sensibilizado e desafiado com OVA são apresentadas na figura 13. A tabela 13 apresenta os valores das  $CE_{50}$  e respostas máximas (RM). A aplicação cumulativa de serotonina ( $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  M) produziu, de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), desenvolvimento de força contrátil tanto nos animais controle como nos animais SD24. Podemos observar que houve aumento significativo ( $p < 0,01$ , teste "t" de Student) de 51,85% na RM da CCE obtida em traquéia de animais desafiados, em relação à RM obtida com o grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração de  $CE_{50}$ .

#### **4.22. Efeito da sensibilização e do desafio antigênico com OVA imediatamente antes dos experimentos na resposta contrátil induzida por $Ca^{2+}$ em traquéia isolada de rato mantida em solução zero $Ca^{2+}$ na presença de serotonina e nifedipina**

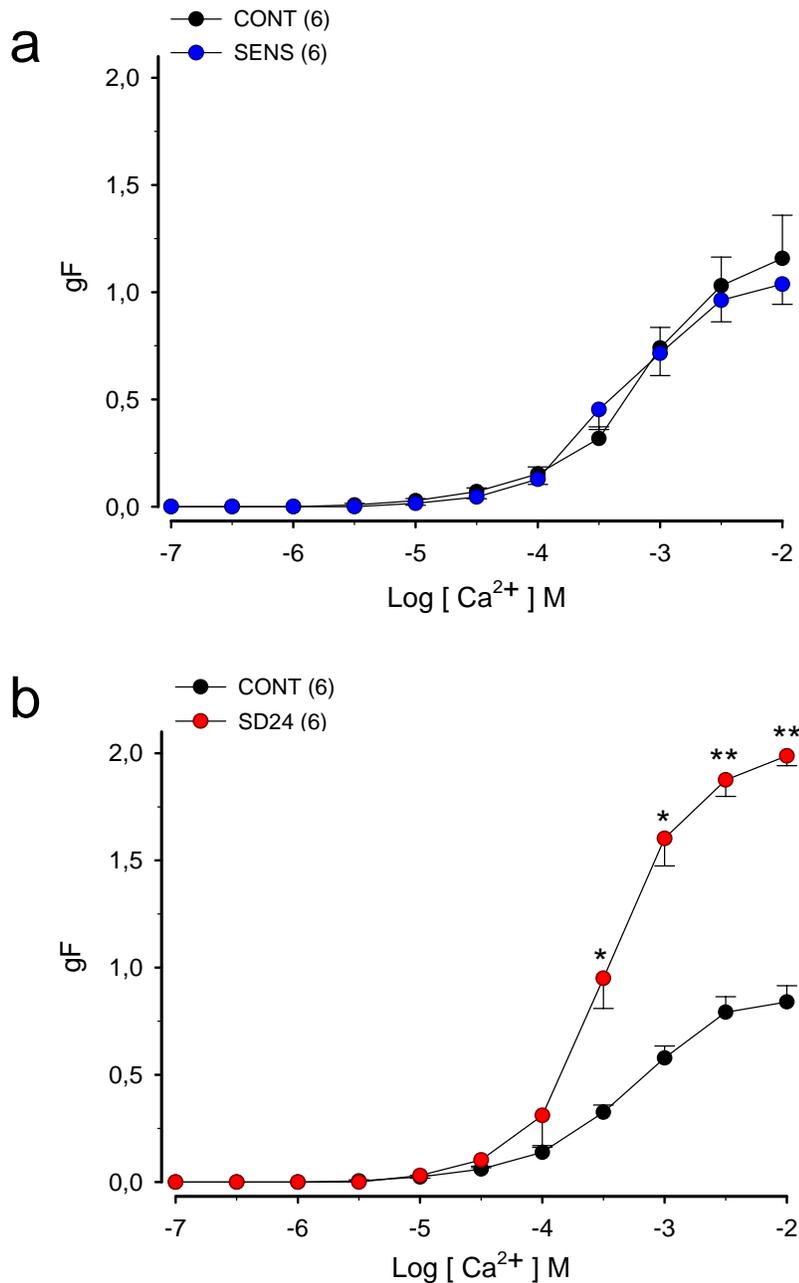
As CCE, obtidas pela adição de cálcio ( $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  M), após contração induzida por serotonina ( $10^{-4}$ M) imediatamente após o desafio antigênico, em traquéia isolada de ratos apenas sensibilizados (controles) ou sensibilizados e desafiados com ovalbumina (SD0) são apresentadas na figura 14. A tabela 14 apresenta os valores das  $CE_{50}$  e RM. A adição de  $Ca^{2+}$ , na solução extracelular sem cálcio e com EDTA, na presença de serotonina e nifedipina ( $10^{-6}$  M), de maneira dependente de concentração ( $p < 0,001$ , ANOVA), produziu contrações com RM na concentração de 10 mM. Podemos observar que houve redução

significativa ( $p < 0,05$ , teste "t" de Student) de 66,66% da RM obtida em traquéia de animais sensibilizados, em relação à RM obtida com traquéia do grupo controle. Nota-se ainda que não ocorreu alteração significativa na comparação entre os valores de  $CE_{50}$ .



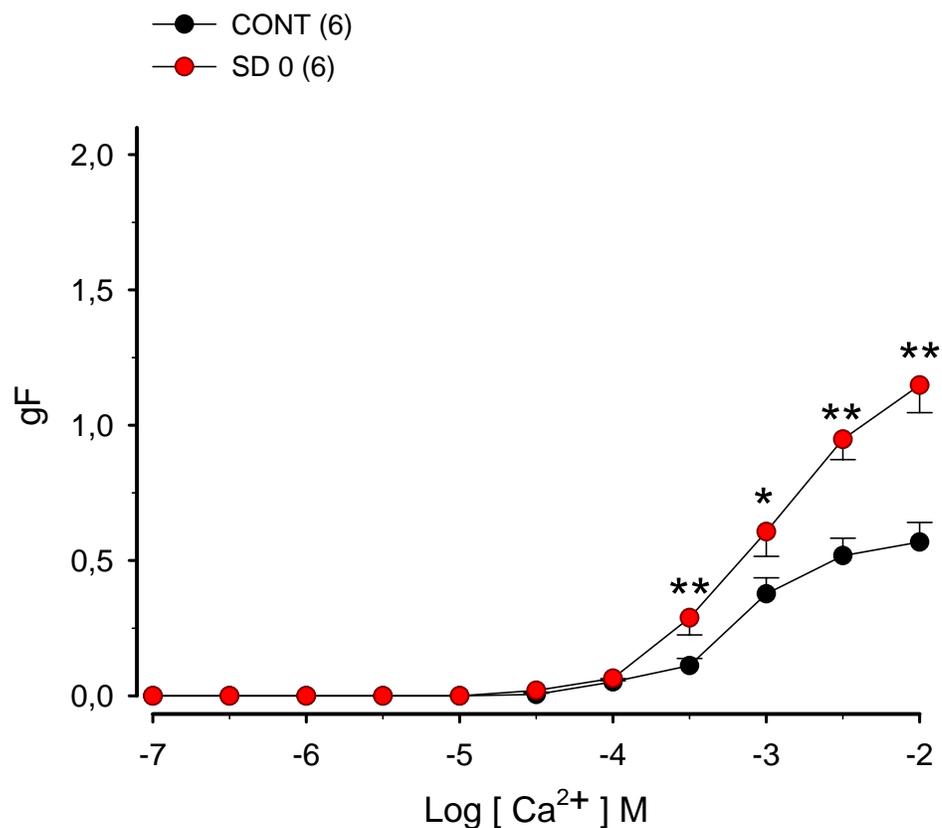
**Figura 01. (a) Efeito da sensibilização com ovalbumina (OVA) na resposta induzida pelo potássio (KCl) em traquéias isoladas de ratos.** Os animais sensibilizados e desafiados (SENS) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0,66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). A resposta contrátil foi obtida através da adição de potássio (KCl) (10<sup>-3</sup> -10<sup>-1</sup> M) ao líquido nutritivo. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M.

**(b) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil induzida pelo potássio em traquéias isoladas de ratos.** Os animais sensibilizados e desafiados (SD24) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0,66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml. A resposta contrátil foi obtida através da adição de potássio (KCl) (10<sup>-3</sup> -10<sup>-1</sup> M) ao líquido nutritivo. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M. \*\*p<0,01.

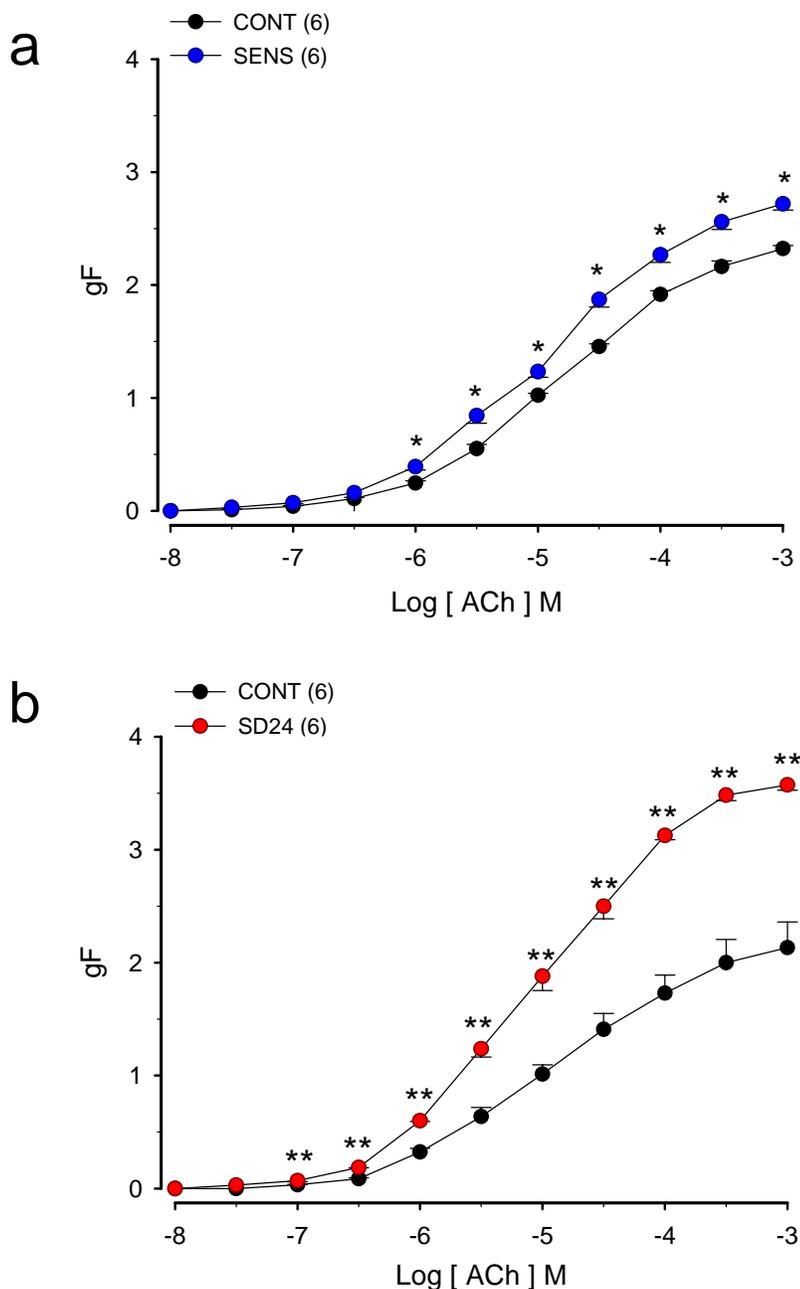


**Figura 02. (a) Efeito da sensibilização antigênica com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pelo KCl em traquéias isoladas de ratos.** Os animais sensibilizados (SENS) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). A resposta contrátil foi obtida através da adição de KCl (60mM) por três vezes intercaladas pela troca do líquido nutritivo (LN) e após a estabilização da resposta à ultima adição de KCl, era adicionado CaCl<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup> M – 10<sup>-2</sup> M) ao LN. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M

**(b) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pelo KCl em traquéias isoladas de ratos.** Os animais sensibilizados e desafiados (SD24) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml. A resposta contrátil foi obtida através da adição de KCl (60mM) por três vezes intercaladas pela troca do líquido nutritivo (LN) e após a estabilização da resposta à ultima adição de KCl, era adicionado CaCl<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup> M – 10<sup>-2</sup> M) ao LN. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M.\*p<0,05.

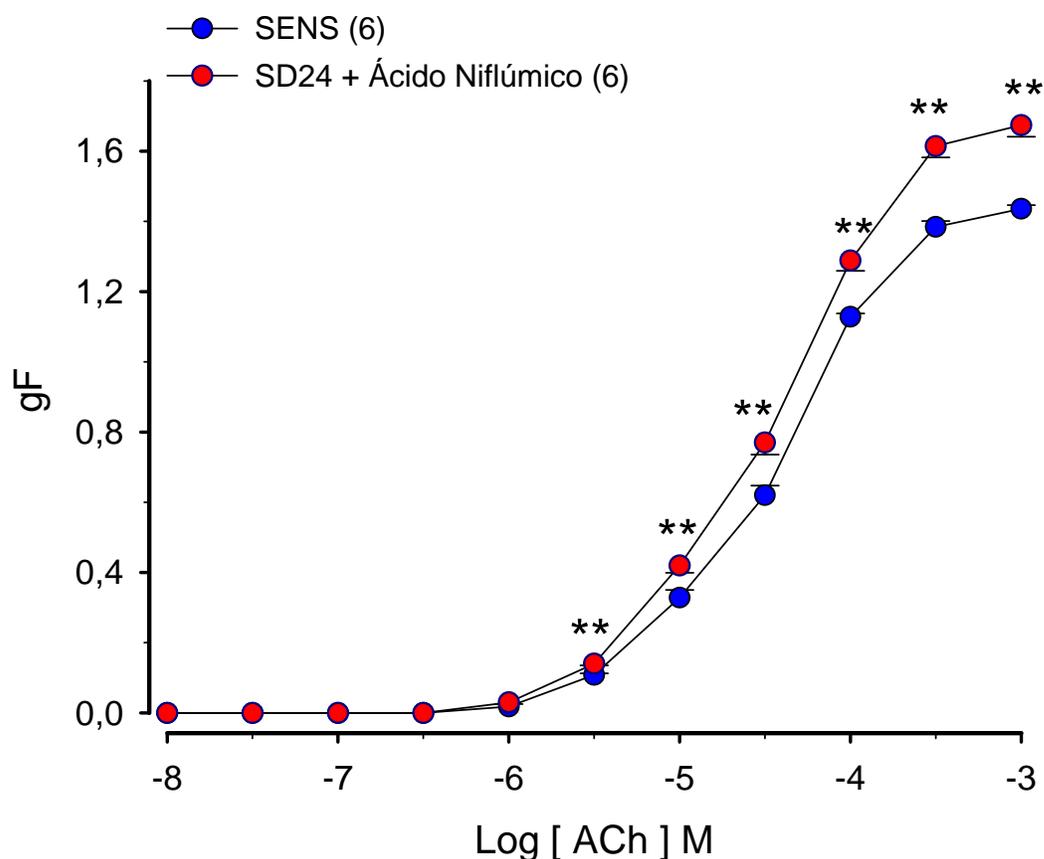


**Figura 03. Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) imediatamente antes dos experimentos na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pelo KCl em traquéias isoladas de ratos.** Os animais sensibilizados e desafiados (SD0) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu imediatamente antes dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml. A resposta contrátil foi obtida através da adição de KCl (60mM) por três vezes intercaladas pela troca do líquido nutritivo (LN) e após a estabilização da resposta à última adição de Ach, era adicionado CaCl<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup> M – 10<sup>-2</sup> M) ao LN. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M. \*p<0,05 e \*\*p<0,01.

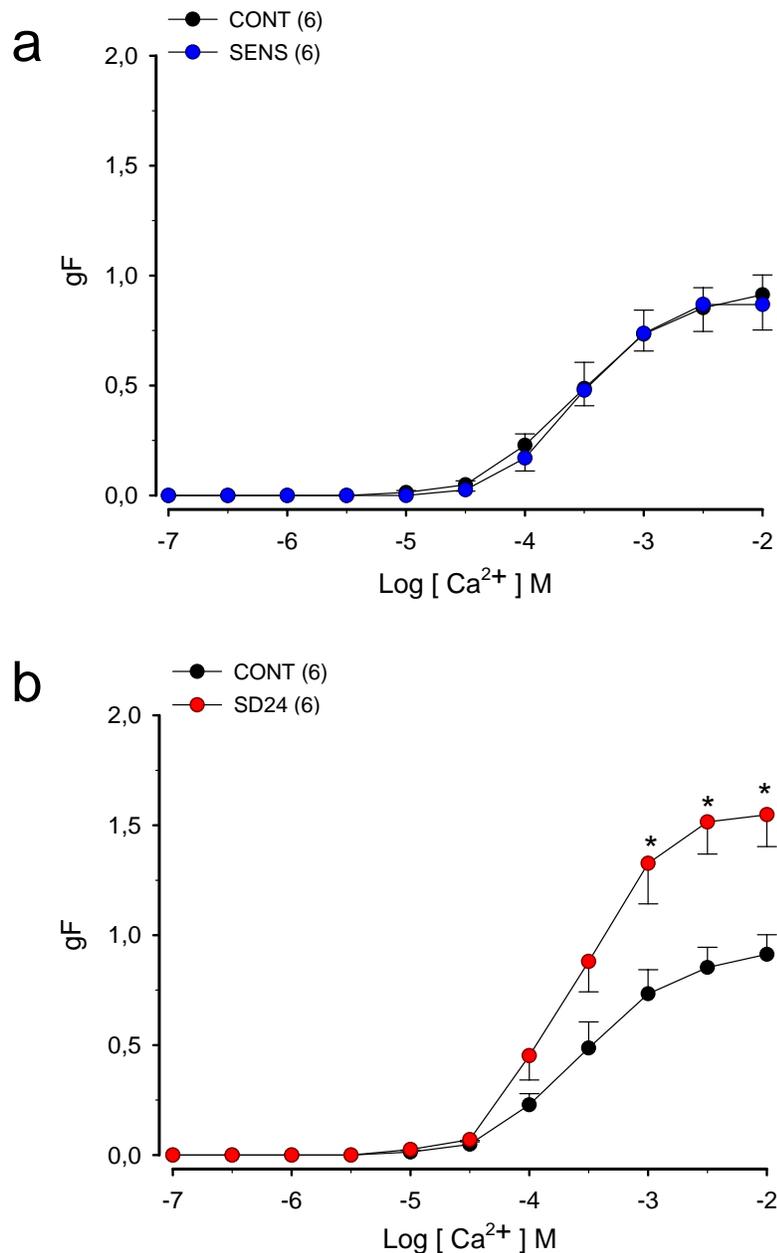


**Figura 04. (a) Efeito da sensibilização com ovalbumina (OVA) na resposta induzida pela acetilcolina em traquéias isoladas de ratos.** Os animais sensibilizados e desafiados (SENS) foram injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml).. A resposta contrátil foi obtida através da adição de acetilcolina (ACh) (10<sup>-8</sup> -10<sup>-3</sup> M) ao líquido nutritivo. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M.\*p<0,05.

**(b) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta induzida pela acetilcolina em traquéias isoladas de ratos.** Os animais sensibilizados e desafiados (SD24) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml. A resposta contrátil foi obtida através da adição de acetilcolina (ACh) (10<sup>-8</sup> -10<sup>-3</sup> M) ao líquido nutritivo. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M.\*\*p<0,01

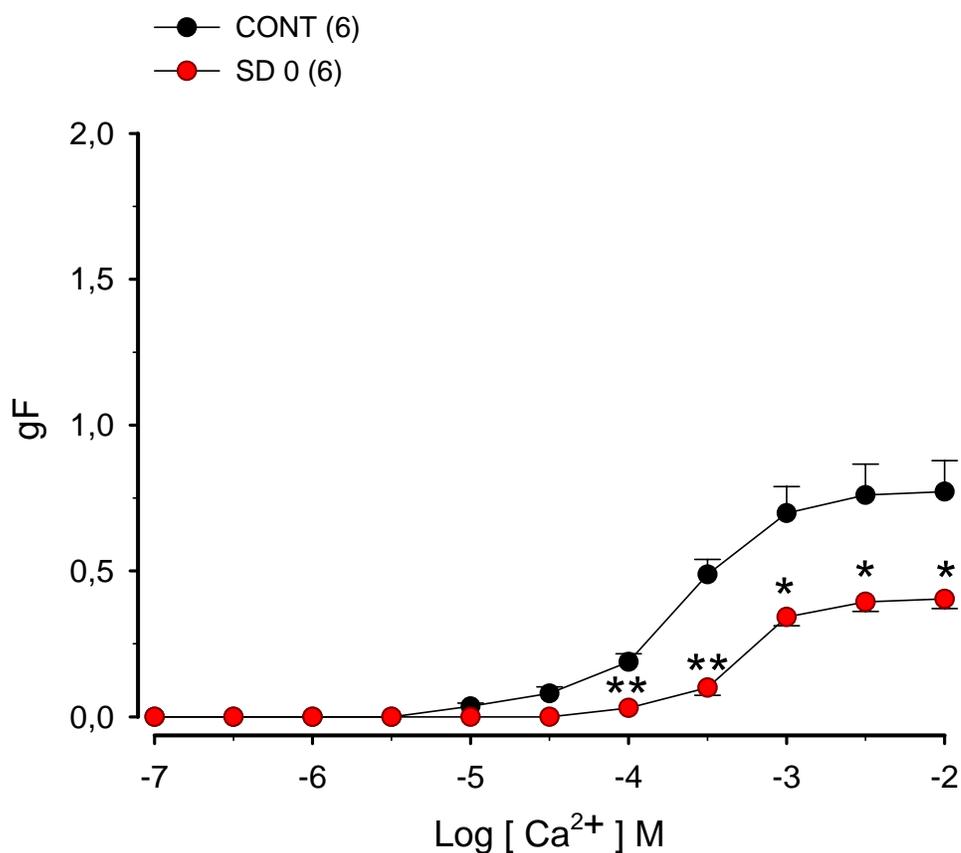


**Figura 05. Efeito do ácido niflúmico na resposta induzida pela acetilcolina em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antígenicamente com ovalbumina (OVA).** Os animais sensibilizados e desafiados (SD24+Ácido Niflúmico) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antígeno ocorreu dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml, os animais controle (SENS) foram apenas sensibilizados. A resposta contrátil foi obtida através da adição de acetilcolina (ACh) (10<sup>-8</sup> -10<sup>-3</sup> M) ao líquido nutritivo após a adição de ácido niflúmico (10<sup>-4</sup>M). O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M. \*\*p<0,01.

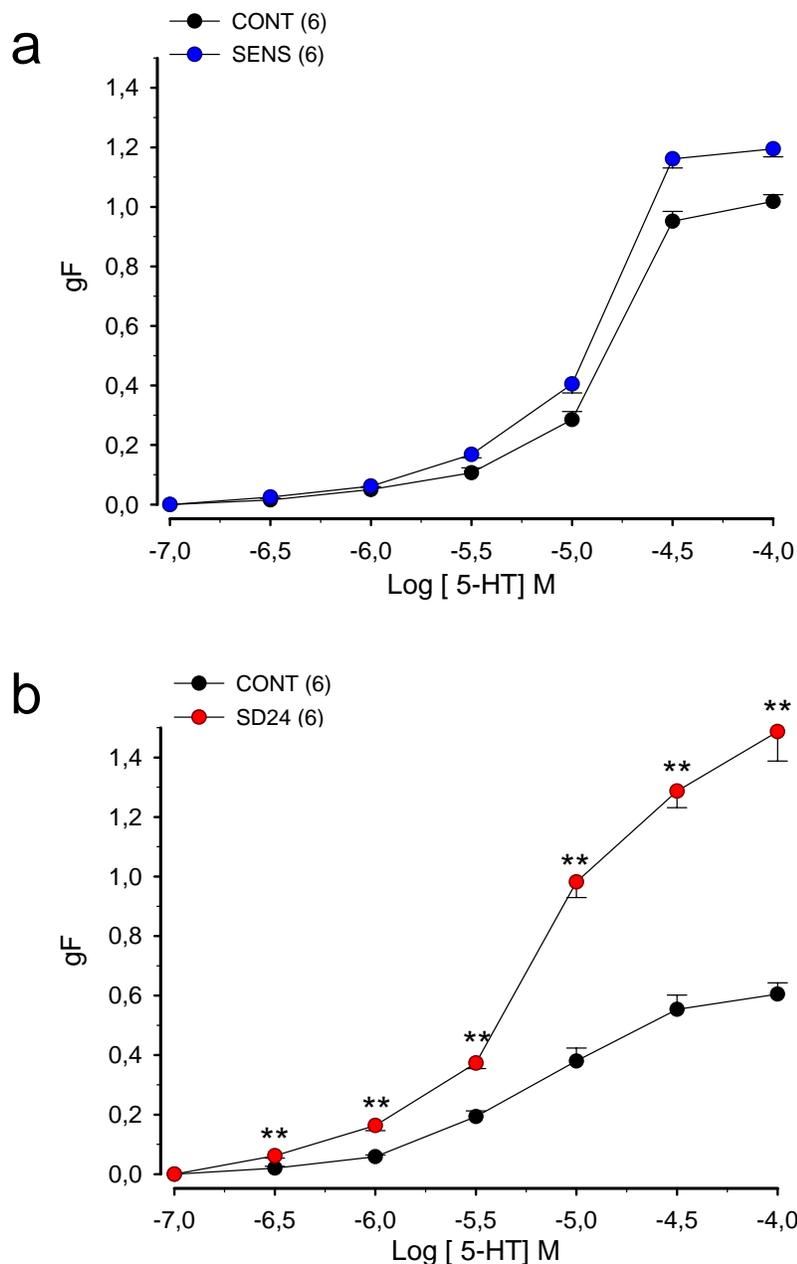


**Figura 06. (a) Efeito da sensibilização antigênica com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela acetilcolina em traquéias isoladas de ratos.** Os animais sensibilizados (SENS) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). A resposta contrátil foi obtida através da adição de acetilcolina (Ach) (10<sup>-4</sup> M) por três vezes intercaladas pela troca do líquido nutritivo (LN) e após a estabilização da resposta à última adição de Ach, era adicionado CaCl<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup> M – 10<sup>-2</sup> M) ao LN. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M.

**(b) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela acetilcolina em traquéias isoladas de ratos.** Os animais sensibilizados e desafiados (SD24) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml. A resposta contrátil foi obtida através da adição de acetilcolina (Ach) (10<sup>-4</sup> M) por três vezes intercaladas pela troca do líquido nutritivo (LN) e após a estabilização da resposta à última adição de Ach, era adicionado CaCl<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup> M – 10<sup>-2</sup> M) ao LN. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M.\*p<0,05.

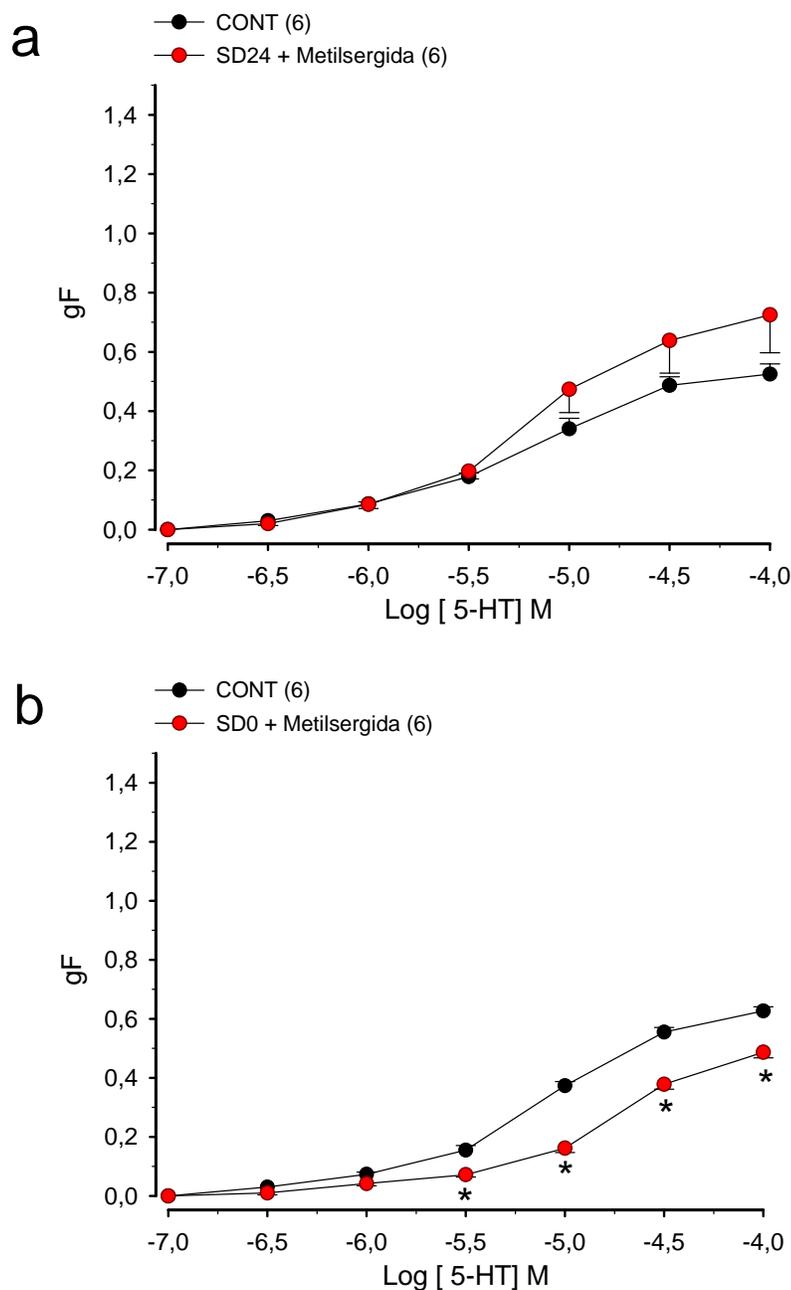


**Figura 07. Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) imediatamente antes dos experimentos na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela acetilcolina em traquéias isoladas de ratos.** Os animais sensibilizados e desafiados (SD0) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu imediatamente antes dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml. A resposta contrátil foi obtida através da adição de acetilcolina (Ach) (10<sup>-4</sup> M) por três vezes intercaladas pela troca do líquido nutritivo (LN) e após a estabilização da resposta à ultima adição de Ach, era adicionado CaCl<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup> M – 10<sup>-2</sup> M) ao LN. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M.\*p<0,05 e \*\*p<0,01.



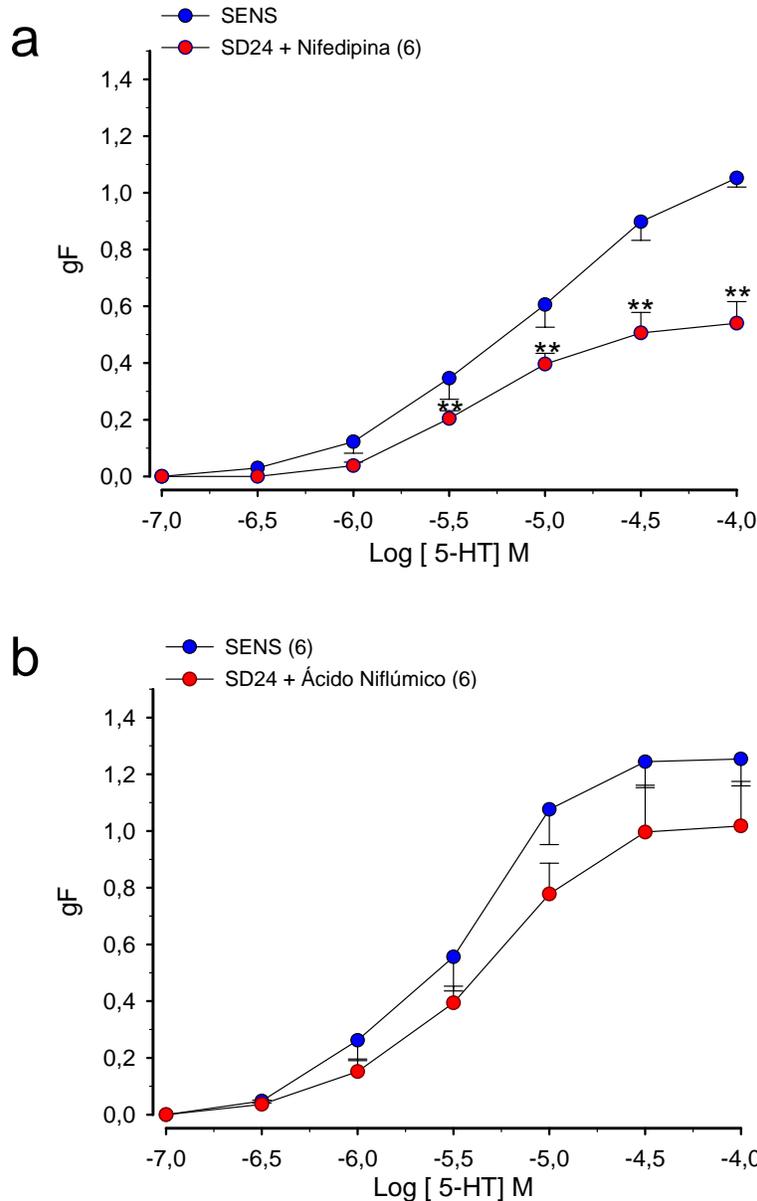
**Figura 08. (a) Efeito da sensibilização com ovalbumina (OVA) na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos.** Os animais sensibilizados (SENS) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml).. A resposta contrátil foi obtida através da adição de serotonina (5-HT) (10<sup>-8</sup> -10<sup>-3</sup> M) ao líquido nutritivo. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M.\*\*p<0,01

**(b) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos.** Os animais sensibilizados e desafiados (SD24) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml. A resposta contrátil foi obtida através da adição de serotonina (5-HT) (10<sup>-7</sup> -10<sup>-4</sup> M) ao líquido nutritivo. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M.\*\*p<0,01



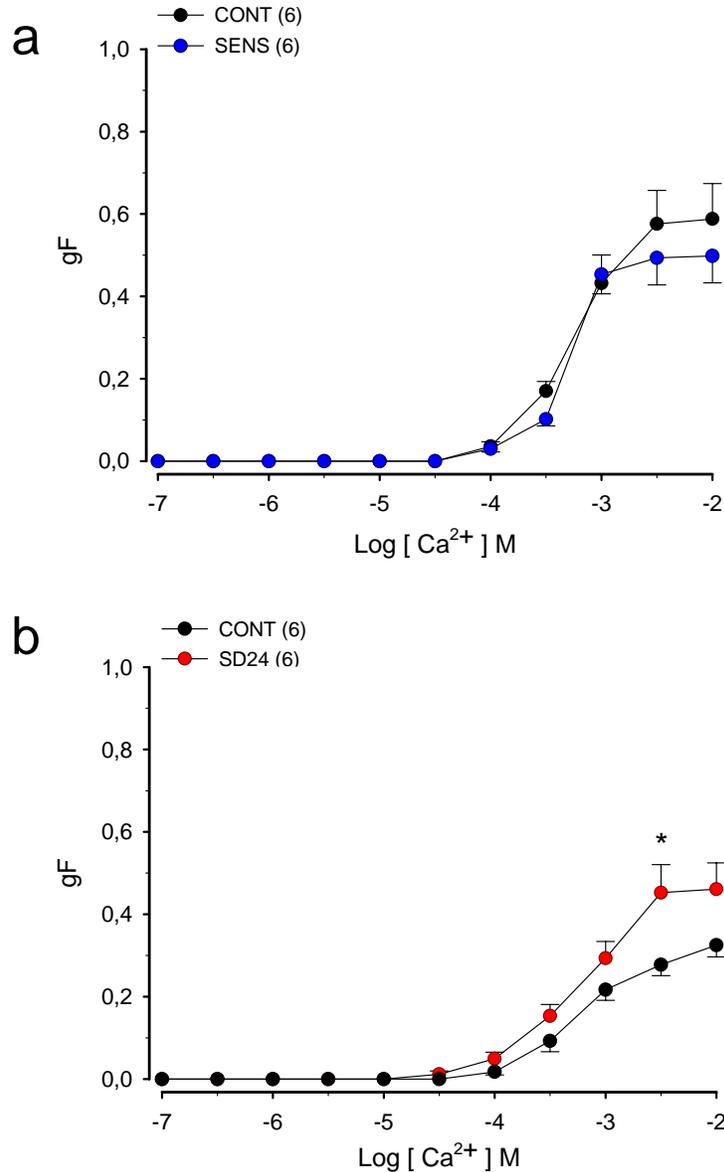
**Figura 09. (a) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos tratados com metisergida.** Os animais sensibilizados e desafiados (SD24+Metisergida) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml, 40 minutos antes do desafio os animais receberam injeção de solução de metisergide (1mg/kg). O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M.

**(b) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos tratados com metisergida.** Os animais sensibilizados e desafiados (SD0+Metisergida) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu imediatamente antes dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml, 40 minutos antes do desafio os animais receberam injeção de solução de metisergide (1mg/kg). A resposta contrátil foi obtida através da adição de serotonina (5-HT) (10<sup>-7</sup> -10<sup>-4</sup> M) ao líquido nutritivo. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M. \*p<0,05



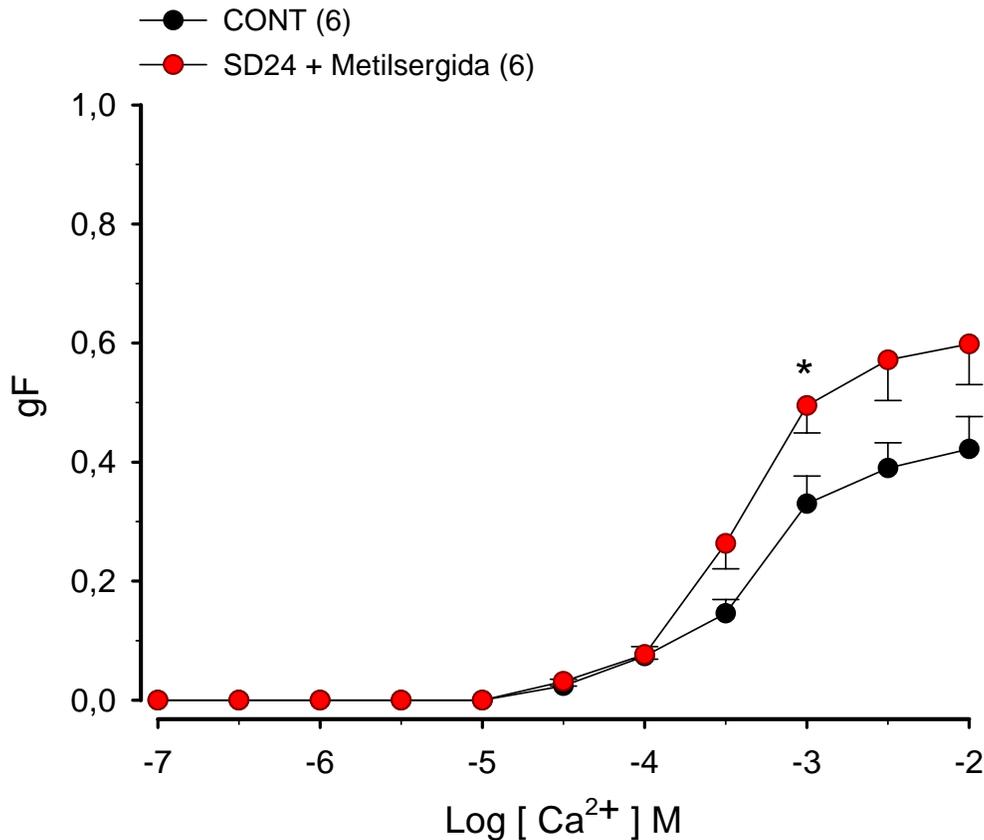
**Figura 10. (a) Efeito da nifedipina na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antígenicamente com ovalbumina (OVA).** Os animais sensibilizados e desafiados (SD24+Nifedipina) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antígeno ocorreu dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml, os animais controle (SENS) foram apenas sensibilizados. A resposta contrátil foi obtida através da adição de serotonina (5-HT) (10<sup>-7</sup> -10<sup>-4</sup> M) ao líquido nutritivo após a adição de nifedipina (10<sup>-6</sup>M). O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M. \*\*p<0,01.

**(b) Efeito do ácido niflúmico na resposta induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antígenicamente com ovalbumina (OVA).** Os animais sensibilizados e desafiados (SD24+Ácido Niflúmico) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antígeno ocorreu dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml, os animais controle (SENS) foram apenas sensibilizados. A resposta contrátil foi obtida através da adição de serotonina (5-HT) (10<sup>-7</sup> -10<sup>-4</sup> M) ao líquido nutritivo após a adição de ácido niflúmico (10<sup>-4</sup>M). O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M.

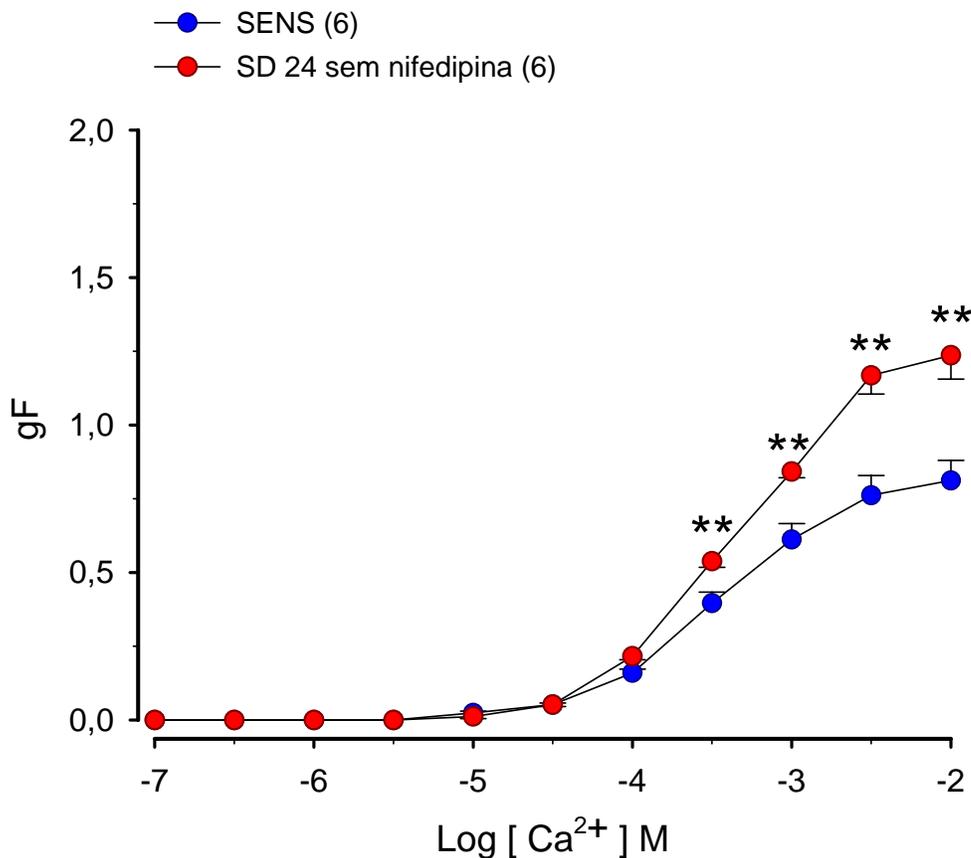


**Figura 11. (a) Efeito da sensibilização antigênica com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos.** Os animais sensibilizados (SENS) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). A resposta contrátil foi obtida através da adição de serotonina (5-HT) (10<sup>-4</sup> M) por três vezes intercaladas pela troca do líquido nutritivo (LN) e após a estabilização da resposta à última adição de 5-HT, era adicionado CaCl<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup> M – 10<sup>-2</sup> M) ao LN. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M.

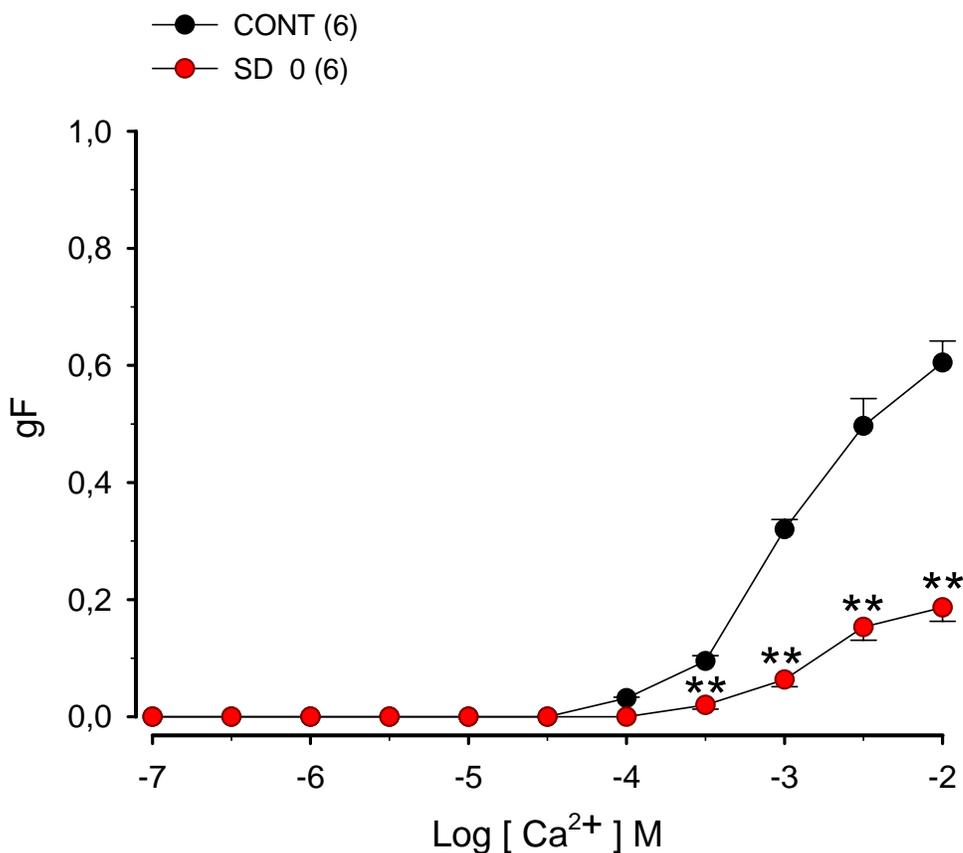
**(b) Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos.** Os animais sensibilizados e desafiados (SD24) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml. A resposta contrátil foi obtida através da adição de serotonina (5-HT) (10<sup>-4</sup> M) por três vezes intercaladas pela troca do líquido nutritivo (LN) e após a estabilização da resposta à última adição de 5-HT, era adicionado CaCl<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup> M – 10<sup>-2</sup> M) ao LN. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M. \*p<0,05.



**Figura 12. Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos tratados com metilsergida.** Os animais sensibilizados e desafiados (SD24+Metilsergida) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml, 40 minutos antes do desafio os animais receberam injeção de solução de metilsergide (1mg/kg). A resposta contrátil foi obtida através da adição de serotonina (5-HT) (10<sup>-4</sup> M) por três vezes intercaladas pela troca do líquido nutritivo (LN) e após a estabilização da resposta à ultima adição de 5-HT, era adicionado CaCl<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup> M – 10<sup>-2</sup> M) ao LN. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M.\*p<0,05.



**Figura 13. Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos (LN sem nifedipina).** Os animais sensibilizados e desafiados (SD24 sem nifedipina) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0,66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml, os animais controle (SENS) foram apenas sensibilizados. A resposta contrátil foi obtida através da adição de serotonina (5-HT) (10<sup>-4</sup> M) por três vezes intercaladas pela troca do líquido nutritivo (LN) e após a estabilização da resposta à última adição de 5-HT, era adicionado CaCl<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup> M – 10<sup>-2</sup> M) ao LN. Para estes experimentos o LN não continha nifedipina. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M. \*\*p<0,01.



**Figura 14. Efeito da sensibilização e desafio antigênico com ovalbumina (OVA) na resposta contrátil ao cálcio que teve sua entrada induzida pela serotonina em traquéias isoladas de ratos.** Os animais sensibilizados e desafiados (SD0) foram injetados 13 a 14 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1mg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu imediatamente antes dos experimentos e consistiu em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml. A resposta contrátil foi obtida através da adição de serotonina (5-HT) (10<sup>-4</sup> M) por três vezes intercaladas pela troca do líquido nutritivo (LN) e após a estabilização da resposta à ultima adição de 5-HT, era adicionado CaCl<sub>2</sub> (10<sup>-7</sup> M – 10<sup>-2</sup> M) ao LN. O número de experimentos está indicado entre parênteses. As barras verticais representam os E.P.M.\*p<0,05 e \*\*p<0,01.

**Tabela CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito ao potássio (KCl) realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados (SENS) e sensibilizados e desafiados (SD24).**

GRUP	CE50 x 10 <sup>-5</sup> M	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) <sup>▲</sup>	N
Controle	2,09 (2.01 –	0,55 (0.0	6
SENS	1,92 (1.72 –	0,61 (0.0	
Controle	1,85 (1.74 –	0,51 (0.0	6
SD24	2,29 (2.09 –	1,22 <sup>*</sup> <sup>*</sup>	

<sup>φ</sup> Os valores representam a média geométrica das concentrações molares que produziram respostas iguais a 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com intervalo de confiança de 95%.

<sup>▲</sup> Média aritmética ± erro padrão da média das Respostas Máximas em gF de tensão

<sup>\*</sup> Animais que receberam solução salina (NaCl 0,9%).

<sup>θ</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1μg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos consistindo em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml

<sup>\*\*</sup> p<0,01 em relação grupo Controle. Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

<sup>♦</sup> Número de

**Tabela CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito ao cálcio (CaCl<sub>2</sub>) na presença de cloreto de potássio (KCl) e atropina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados (SENS) ou sensibilizados e desafiados (SD24) 24hs antes dos experimentos com OVA.**

GRUP	CE50 x 10 <sup>-4</sup> M	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) <sup>^</sup>	N
Controle	4.28 (2.71 -	1,15 (0.2	6
SENS	4.75 (2.28 -	1,04 (0.09)	
Controle	4.38 (2.71-	0,84 (0.0	6
SD24	3.21 (2.43 -	1,98 * *	

<sup>φ</sup> Os valores representam a média geométrica das concentrações molares que produziram respostas iguais a 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com intervalo de confiança de 95%.

<sup>^</sup> Média aritmética ± erro padrão da média das Respostas Máximas em gF de tensão

<sup>\*</sup> Animais que receberam solução salina (NaCl 0,9%).

<sup>θ</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos consistindo em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml

<sup>σ</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub>

<sup>\*\*</sup> p<0,01 em relação grupo Controle. Teste "t" de Student para amostras não pareadas.

<sup>\*</sup> p<0,05 em relação grupo Controle. Teste "t" de Student para amostras não pareadas.

<sup>♦</sup> Número de

**Tabela CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito ao cálcio (CaCl<sub>2</sub>) na presença de cloreto de potássio (KCl) e atropina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados (SD0) imediatamente antes dos experimentos com OVA.**

GRUP	CE50 x 10 <sup>-4</sup> M	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) <sup>^</sup>	N
Controle	6.75 (6.09 –	0,56 (0.0	6
SD0	8.96 (4.68 –	1,14 * *	

<sup>φ</sup> Os valores representam a média geométrica das concentrações molares que produziram respostas iguais a 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com intervalo de confiança de 95%.

<sup>^</sup> Média aritmética ± erro padrão da média das Respostas Máximas em gF de tensão

<sup>\*</sup> Animais que receberam solução salina (NaCl 0,9%).

<sup>θ</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos consistindo em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml

<sup>σ</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub>

<sup>\*\*</sup> p<0,01 em relação grupo Controle. Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

<sup>\*</sup> p<0,05 em relação grupo Controle. Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

<sup>♦</sup> Número de

**Tabela CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito a acetilcolina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados (SENS) e sensibilizados e desafiados (SD24) 24hs antes dos experimentos com OVA.**

GRUP	CE50 x 10 <sup>-5</sup> M	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) <sup>▲</sup>	N
Controle	2.76 (2.53 –	2.32 (0.0	6
SENS	2.27 (1.30 –	2.71 * *	
Controle	4,03 (2.92 –	2,11 (0.1	6
SD24	7,16 (3.11 –	3,53 * *	

<sup>º</sup> Os valores representam a média geométrica das concentrações molares que produziram respostas iguais a 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com intervalo de confiança de 95%.

<sup>▲</sup> Média aritmética ± erro padrão da média das Respostas Máximas em gF de tensão

<sup>◆</sup> Animais que receberam solução salina (NaCl 0,9%).

<sup>θ</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos consistindo em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml

<sup>\*\*</sup> p<0,01 em relação grupo Controle. Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

<sup>◆</sup> Número de

**Tabela CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito a acetilcolina na presença de ácido niflúmico, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antigenicamente com OVA (SD24AN).**

GRUP	CE50 x 10 <sup>-5</sup> M	RESPOSTA MÁXIMA	N
Controle	3,75 (3.29 –	1,43 (0.0	5
SD24A	2.79 (1.45 –	1,67 * *	5

φ Os valores representam a média geométrica das concentrações molares que produziram respostas iguais a 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com intervalo de confiança de 95%.

^ Média aritmética ± erro padrão da média das Respostas Máximas em gF de tensão

\* Animais que receberam solução salina (NaCl 0,9%).

θ Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos consistindo em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml

σ Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub>

\*\* p<0,01 em relação grupo Controle. Teste "t" de Student para amostras não pareadas.

‡ Número de

**Tabela CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito ao cálcio (CaCl<sub>2</sub>) na presença de acetilcolina e nifedipina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados (SENS) ou sensibilizados e desafiados (SD24) 24hs antes dos experimentos com OVA.**

GRUP	CE50 x 10 <sup>-4</sup> M	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) <sup>▲</sup>	N
Controle	3.31 (1.20 –	0,91 (0.0	6
SENS	3.72 (1.19 – 11.6)	0,87 (0.0	
Controle	3.31 (1.20 –	0,98 (0.0	6
SD24	2.43 (1.45 –	1,54 **	

<sup>φ</sup> Os valores representam a média geométrica das concentrações molares que produziram respostas iguais a 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com intervalo de confiança de 95%.

<sup>▲</sup> Média aritmética ± erro padrão da média das Respostas Máximas em gF de tensão

<sup>\*</sup> Animais que receberam solução salina (NaCl 0,9%).

<sup>θ</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1μg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos consistindo em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml

<sup>σ</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1μg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub>

<sup>\*\*</sup> p<0,01 em relação grupo Controle. Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

<sup>♦</sup> Número de

**Tabela CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito ao cálcio (CaCl<sub>2</sub>) na presença de acetilcolina e nifedipina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados (SD0) imediatamente antes dos experimentos com OVA 24hs antes dos experimentos com OVA.**

GRUP	CE50 x 10 <sup>-4</sup> M	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) <sup>^</sup>	N
Controle	2.00 (1.31 –	0,77 (0.1	6
SD0	4.62 (3.35 –	0,40 *	

<sup>o</sup> Os valores representam a média geométrica das concentrações molares que produziram respostas iguais a 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com intervalo de confiança de 95%.

<sup>^</sup> Média aritmética ± erro padrão da média das Respostas Máximas em gF de tensão

<sup>\*</sup> Animais que receberam solução salina (NaCl 0,9%).

<sup>o</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos consistindo em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml

<sup>σ</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub>

<sup>\*</sup> p<0,05 em relação grupo Controle. Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

<sup>♦</sup> Número de

**Tabela CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito a serotonina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados (SENS) e sensibilizados e desafiados (SD24) 24hs antes dos experimentos com OVA.**

GRUP	CE50 x 10 <sup>-5</sup> M	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) <sup>▲</sup>	N
Controle	1.51 (1.37 –	1,01 (0.0	6
SENS	1.31 (1.18 –	1,19 **	
Controle	6.64 (5.02 –	0,60 (0.0	6
SD24	6.16 (5.15 –	1,48 * *	6

<sup>φ</sup> Os valores representam a média geométrica das concentrações molares que produziram respostas iguais a 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com intervalo de confiança de 95%.

<sup>▲</sup> Média aritmética ± erro padrão da média das Respostas Máximas em gF de tensão

<sup>\*</sup> Animais que receberam solução salina (NaCl 0,9%).

<sup>0</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos consistindo em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml

<sup>\*\*</sup> p<0,01 em relação grupo Controle. Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

<sup>♦</sup> Número de

**Tabela CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito a serotonina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antígenicamente com OVA 24hs (SD24M) ou 0h (SD0M) antes dos experimentos e tratados com metilsergida.**

GRUP	CE50 x 10 <sup>-6</sup> M	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) <sup>▲</sup>	N
Controle	5.47 (4.07 –	0,52 (0.0	6
SD24	6.02 (4.09 –	0,72 (0.1	
Controle	1.43 (1.31 –	0,62 (0.0	6
SD0M	0.72 (0.63 –	0,48 * *	

<sup>◊</sup> Os valores representam a média geométrica das concentrações molares que produziram respostas iguais a 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com intervalo de confiança de 95%.

<sup>▲</sup> Média aritmética ± erro padrão da média das Respostas Máximas em gF de tensão

<sup>+</sup> Animais que receberam solução salina (NaCl 0,9%).

<sup>0</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos consistindo em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml

<sup>◊</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub>

<sup>\*\*</sup> p<0,01 em relação grupo Controle. Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

<sup>♦</sup> Número de

**Tabela CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito a serotonina na presença de nifedipina (N) ou ácido niflúmuco (AN), realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antígenoicamente com OVA.**

GRUP	CE50 x 10 <sup>-4</sup> M	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) <sup>▲</sup>	N <sup>◆</sup>
Controle	12.97 (3.24 –	1,05 (0.0	5
SD24N	4.42 (3.48 –	0,54 **	5
Controle	3.41 (1.80 –	1,28 (0.0	5
SD24A	4.05 (2.68 –	1,01 (0.1	5

<sup>φ</sup> Os valores representam a média geométrica das concentrações molares que produziram respostas iguais a 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com intervalo de confiança de 95%.

<sup>▲</sup> Média aritmética ± erro padrão da média das Respostas Máximas em gF de tensão

<sup>\*</sup> Animais que receberam solução salina (NaCl 0,9%).

<sup>θ</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos consistindo em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml

<sup>σ</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub>

<sup>\*\*</sup> p<0,01 em relação grupo Controle. Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

<sup>◆</sup> Número de

**Tabela CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito ao cálcio (CaCl<sub>2</sub>) na presença serotonina e nifedipina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados (SENS) ou sensibilizados e desafiados (SD24) 24hs antes dos experientos com OVA**

GRUP	CE50 x 10 <sup>-4</sup> M	RESPOSTA MÁXIMA (F.P.M.) <sup>▲</sup>	N <sup>◆</sup>
Controle	4.40 (2.83 –	0,58 (0.0	6
SENS	4.28 (3.31–	0,69 (0.0	
Controle	6.76 (4.41 –	0,50 (0.0	1
SD24	8.24 (3.07 –	0,37 (0.0	

◊ Os valores representam a média geométrica das concentrações molares que produziram respostas iguais a 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com intervalo de confiança de 95%.

▲ Média aritmética ± erro padrão da média das Respostas Máximas em gF de tensão

\* Animais que receberam solução salina (NaCl 0,9%).

θ Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos consistindo em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml

◻ Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub>

\*\* p<0,01 em relação grupo Controle. Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

\* p<0,05 em relação grupo Controle. Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

◆ Número de

**Tabela CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito ao cálcio (CaCl<sub>2</sub>) na presença de serotonina e nifedipina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antígenicamente com OVA (SD24M) e tratados com metilsergide.**

GRUP	CE50 x 10 <sup>-4</sup> M	RESPOSTA MÁXIMA (F.P.M.) <sup>▲</sup>	N <sup>◆</sup>
Controle	4.75 (3.86 –	0,42 (0.0	6
SD24	6.57 (2.75 –	0,59 (0.0	

<sup>Ⓞ</sup> Os valores representam a média geométrica das concentrações molares que produziram respostas iguais a 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com intervalo de confiança de 95%.

<sup>▲</sup> Média aritmética ± erro padrão da média das Respostas Máximas em gF de tensão

<sup>★</sup> Animais que receberam solução salina (NaCl 0,9%).

<sup>⓪</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1μg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos consistindo em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml

<sup>Ⓢ</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1μg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub>

<sup>\*\*</sup> p<0,01 em relação grupo Controle. Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

<sup>\*</sup> p<0,05 em relação grupo Controle. Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

<sup>◆</sup> Número de

**Tabela CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito a serotonina na presença de ácido niflúmico, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados antigenicamente com OVA (SD24AN).**

GRUP	CE50 x 10 <sup>-6</sup> M	RESPOSTA MÁXIMA	N
Controle	3.33 (2.41 –	0,81 (0.0	5
SD24S	4.06 (2.94 –	1,23 * *	

<sup>φ</sup> Os valores representam a média geométrica das concentrações molares que produziram respostas iguais a 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com intervalo de confiança de 95%.

<sup>△</sup> Média aritmética ± erro padrão da média das Respostas Máximas em gF de tensão

<sup>\*</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub>

<sup>▼</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1µg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos consistindo em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml

<sup>♦</sup> Número de

**Tabela CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentrações-efeito ao cálcio (CaCl<sub>2</sub>) na presença serotonina e nifedipina, realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados (SD0) imediatamente antes dos experimentos com OVA.**

GRUP	CE50 x 10 <sup>-4</sup> M	RESPOSTA MÁXIMA (F.P.M.) <sup>▲</sup>	N <sup>◆</sup>
Controle	8.92 (7.63 –	0,60 (0.0	6
SD0	1.43 (0.96 –	0,18 **	

<sup>φ</sup> Os valores representam a média geométrica das concentrações molares que produziram respostas iguais a 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com intervalo de confiança de 95%.

<sup>▲</sup> Média aritmética ± erro padrão da média das Respostas Máximas em gF de tensão

<sup>✦</sup> Animais que receberam solução salina (NaCl 0,9%).

<sup>θ</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1μg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub> (1mg/ml). O desafio antigênico ocorreu 24 horas antes dos experimentos consistindo em duas inalações consecutivas de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml

<sup>σ</sup> Animais injetados 14 a 21 dias antes dos experimentos com 0.66 ml (i.p.) de uma solução contendo OVA (1μg/ml) e Al(OH)<sub>3</sub>

<sup>\*\*</sup> p<0,01 em relação grupo Controle. Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

<sup>\*</sup> p<0,05 em relação grupo Controle. Teste “t” de Student para amostras não pareadas.

<sup>◆</sup> Número de

## **5. DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

A anafilaxia é uma das desordens imunológicas mais comuns e o modelo de sensibilização seguida de broncoprovocação, empregado no presente trabalho, é um dos mais freqüentemente utilizados no estudo do comportamento contrátil das vias aéreas frente a reações que envolvam a participação do sistema imune (Capaz *et al.*, 1993; Jancar *et al.*, 1997; Steil *et al.*, 1998). Esse método clássico de sensibilização provoca resposta anafilática evidente tanto *in vivo* como *in vitro*, esta também conhecida como reação de Schultz-Dale (Capaz *et al.*, 1993; Tavares de Lima & da Silva, 1998). O procedimento de broncoprovocação pela repetição da exposição ao antígeno por inalação ao animal sensibilizado (Manzoli *et al.*, 1999), corresponde a um modelo de resposta asmática precoce, sendo assim classificada em razão do desencadeamento da resposta broncoconstrictora após a reexposição ao antígeno.

Os resultados obtidos neste trabalho, com animais sensibilizados e/ou sensibilizados e posteriormente desafiados antigenicamente mostraram-se eficazes tanto na fase aguda quanto na fase tardia do processo asmático. Podemos verificar uma resposta broncoconstrictora marcante, como evidenciado pelo desconforto respiratório, no momento da broncoprovocação, sendo necessária, por algumas vezes, a retirada do animal da câmara de inalação, para se evitar a morte do animal por incapacidade respiratória. Nas traquéias isoladas desses animais desafiados com o antígeno sensibilizante, o desenvolvimento de hiperreatividade demonstra a eficácia quanto à fase tardia,

o que não ocorre quando os experimentos são realizados imediatamente após o desafio, conforme descrito abaixo. Esses resultados, portanto, mostram a eficácia de nosso modelo e a reprodutibilidade do método.

Quando os experimentos foram realizados imediatamente após o desafio antigênico observou-se uma discreta, por vezes estatisticamente significativa, redução na resposta contráctil máxima nas CCE obtidas para mediadores que atuam através da ativação de seu receptor específico (ACh e 5-HT) em traquéias isoladas. A redução provavelmente ocorreu por uma dessensibilização ou taquifilaxia do receptor no momento da broncoprovocação. Complementando a isso foi observado que ocorreu redução da resposta máxima nas CCE ao cálcio que teve sua entrada induzida pela adição prévia de serotonina em traquéias de animais sensibilizados e desafiados 24 h antes, quando comparado a CCE obtidas com traquéias de animais do grupo controle não sensibilizado, opondo-se ao observado quando a pré-contração fora realizada com outros mediadores (acetilcolina e potássio) onde houve aumento das respostas máximas. A redução da resposta possivelmente tenha ocorrido como um efeito taquifilático residual, que foi confirmado quando os animais do grupo teste foram tratados com metilsergida, um antagonista competitivo dos receptores da serotonina, 40 minutos antes da broncoprovocação. Nesse caso a redução da resposta observada anteriormente foi abolida. Nas traquéias de animais desafiados no dia anterior e tratados com metilsergida 40 minutos antes do desafio, não se observou, por outro lado, presença de hiperreatividade, talvez por um efeito residual do bloqueador sobre os receptores serotoninérgicos ou

mesmo por um efeito profilático em inibir parcialmente a resposta contrátil imediata, uma vez que nestes animais não se observaram sinais de desconforto respiratório no momento do desafio antigênico. Está bem estabelecido na literatura que a metilsergida pode reduzir a resposta asmática nessas situações (Misawa *et al.*, 1988).

Os resultados demonstram, entretanto, que há padrões diferentes na sinalização dos mecanismos fisiopatológicos da hiperreatividade quando se analisam diferentes mediadores. Observamos a participação marcante de canais do tipo VOC na sinalização do mecanismo contrátil de traquéias de animais sensibilizados e desafiados antigenicamente em CCE obtidas para a serotonina, possivelmente durante a instalação da fase tardia que, para o nosso modelo experimental pode ser visualizada 24 h após a broncoprovocação. Não ocorreu hiperreatividade nas CCEs ao cálcio mediado por serotonina em traquéias de animais broncoprovocados quando comparados com traquéias do grupo naive, ao contrário do que ocorreu quando sua entrada se fez com ACh e KCl. Justificamos esse achado pela presença de nifedipina no líquido nutritivo no momento da confecção das CCEs ao cálcio, para se isolar apenas os canais do tipo ROC. No momento em que foram realizadas CCEs ao cálcio cuja entrada foi mediada pela serotonina na ausência de nifedipina no líquido nutritivo em traquéias de animais desafiados antigenicamente, observamos aumento significativo das respostas máximas, comparadas ao grupo controle não sensibilizado. o que vem a confirmar nossa hipótese. este fato apresenta grande importância na compreensão dos mecanismos da fase tardia do

processo asmático, uma vez que a histamina e, a serotonina, esta última com maior importância no rato (Xu *et al.*, 1992), estão fortemente envolvidas na reação imediata, assim como vários outros mediadores, citocinas e células inflamatórias implicados nesse processo (Liu *et al.*, 2003a; Liu *et al.*, 2003b; Nag *et al.* 2003; Fukuno *et al.*, 2003; Eum *et al.*, 2003; Beech *et al.*,1997;) Esses fatores também contribuem para as alterações relatadas nas horas que se seguem à broncoprovocação, na fase tardia, também conhecida como inflamatória.

Nesta fase inflamatória, padronizada em nossos experimentos em 24 horas após o desafio antigênico, há migração de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos (Qutayba *et al.*, 2000; Barnes *et al.* 1988). Estas células, por sua vez, juntamente com outras células do próprio tecido lesionado promovem a liberação de citocinas, quimiocinas e outros fatores inflamatórios que, por atuarem em receptores ligados à tirosina quinase, levam a alterações intracelulares de indução ou inibição de síntese protéica, que culminam em alterar as respostas celulares a diferentes estímulos. Estas alterações ficam bem caracterizadas, por exemplo, na responsividade a estímulos contrácteis aplicados à célula muscular lisa da árvore traqueobrônquica, que se torna maior a uma série de estímulos. Farmacologicamente, o aumento dessa responsividade a um dado agonista pode ser caracterizada através de uma resposta máxima aumentada (também conhecida como “hiperreatividade”), uma menor  $CE_{50}$  (hipersensibilidade) ou uma combinação desses dois parâmetros (hiperreatividade com hipersensibilidade). Os resultados apresentados no

presente trabalho demonstram o desenvolvimento de hiperreatividade, inespecífica aos estímulos contráteis aqui empregados ( $K^+$ , ACh e 5-HT), uma vez que, na maior parte dos casos, houve aumento significativo apenas na resposta máxima sem o desvio à esquerda na curva concentração efeito, indicativo do desenvolvimento de hipersensibilidade.

As respostas contráteis obtidas em traquéias de animais sensibilizados e posteriormente desafiados com o antígeno sensibilizante demonstraram aumento significativo na resposta máxima (hiperreatividade) quando comparadas àquelas obtidas do grupo controle. A participação de canais de cálcio na hiperreatividade se mostra significativa, e é corroborada por outros autores que sugerem que eventos inflamatórios alteram a atividade de canais iônicos (Bonnet *et al.*, 2003; Akbarali *et al.*, Janssen *et al.*, 2001; 2000; Beech *et al.*, 1997; Chiba *et al.*, 1994). Observamos que o padrão de resposta se apresenta diferenciado, embora a hiperreatividade tenha sido inespecífica para os diferentes agonistas analisados. Os resultados aqui apresentados dão suporte à hipótese de que essa diferenciação seja decorrente, pelo menos parcialmente, da maior disponibilidade de cálcio promovida por ativação de canais VOC e ROC.

Para estudar a participação dos canais de cálcio operados por receptor (ROC), as curvas concentração-efeito (CCE) foram construídas através da sua prévia ativação com a adição dos agonistas ACh ou 5-HT às soluções superperfusoras isentas de cálcio e com EGTA. Está bem descrito na literatura que a ativação de receptores, por exemplo, os muscarínicos  $M_3$  presentes nas

células musculares lisas das vias aéreas, produz contração por aumento da concentração intracelular de cálcio através de sua liberação de estoques internos ou sua entrada por canais da membrana sarcoplasmática, ROCs ou VOCs (Barnes, 1990; Rodger e Pyne, 1992; Chubert *et al.*, 1994). Nos nossos experimentos, a participação dos canais de cálcio (tipo VOC) nesse caso é pouco provável ocorrer, uma vez que os experimentos foram realizados na presença de nifedipina, em concentração capaz de abolir as respostas contráteis induzidas pela solução despolarizante rica em  $K^+$  (dados não mostrados). Assim, as contrações produzidas pela adição de cálcio na presença de ACh ou 5-HT são decorrentes da entrada de cálcio para o citoplasma por canais ROC.

Para avaliar os canais de cálcio dependentes de voltagem (VOC) utilizamos preparações mantidas em soluções despolarizantes (KCl, 60 mM) sem cálcio, com adição de EGTA e na presença atropina (Chubert *et al.*, 1994). A estimulação do tecido nessas condições leva a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem. Uma vez que a solução extracelular era desprovida de cálcio, a sua adição em concentrações crescentes produzia seu influxo por esses canais, com desenvolvimento gradual da força contrátil, à medida que sua concentração extracelular se tornava maior. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que essas contrações foram bloqueadas pela nifedipina (dados não mostrados).

Nesses experimentos, houve desenvolvimento de hiperreatividade para as contrações induzidas pela adição de cálcio feita conforme a descrição acima, observação que difere daquelas feitas por Chiba e Misawa (1995). Não temos

elementos que expliquem essa diferença entre o presente trabalho e os resultados descritos por esses autores, mas talvez ela seja devida aos diferentes protocolos de imunização como a freqüência de administração do antígeno, ou ao próprio antígeno utilizado. Entretanto, outros autores já relataram, de acordo com nossos resultados, que a hiperreatividade do músculo liso das vias aéreas ao  $K^+$  também ocorre tanto em tecidos de ratos como em tecidos de cobaias (Perpina *et al.*, 1990; Piercy *et al.*, 1993).

Para avaliar a participação de canais de cloro ativados por cálcio ( $Cl_{(Ca)}$ ) utilizamos um derivado fenamato, o ácido niflúmico, por ser um inibidor seletivo dos canais de  $Cl^-$  em contrações induzidas por agonistas (Teixeira *et al.*, 2000). Acredita-se que a abertura de canais de cloro de pequena condutância seja responsável por parte da despolarização encontrada para alguns neurotransmissores. Essa despolarização, por sua vez, acaba por abrir canais de cálcio dependentes de voltagem, com influxo desse íon para o interior da célula e aumento da sua concentração no mioplasma (Janssen e Sims, 1992, Criddle *et al.*, 1996). Nossos resultados demonstram que a presença de ácido niflúmico na solução extracelular diminuiu a força máxima desenvolvida na curva concentração-efeito para a ACh quando comparada com a situação controle. Entretanto, para os animais desafiados, mesmo com uma menor força máxima, a hiperreatividade pode ser demonstrada. Por outro lado, o ácido niflúmico aboliu a hiperreatividade para a 5-HT, indicando que o mecanismo envolvido para o seu desenvolvimento deve envolver a ativação de canais de cloreto.

Chiba e Misawa (1995) propuseram a participação de canais de cálcio operados por receptor (ROCs) na hiperreatividade induzida por antígenos, em detrimento da participação de canais de cálcio dependentes de voltagem. Eles sugeriram que a hiperreatividade a ACh e devia a uma maior liberação intracelular de cálcio ou à abertura dos canais ROC. Os resultados aqui apresentados corroboram os resultados obtidos para a ACh por Chiba e Misawa (1995), uma vez que nossas preparações se mostraram hiperreativas em condições normais ou em condições que envolvessem a ativação de canais operados por receptor.. Por outro lado, nossos dados nos permitem afirmar que, para a 5-HT, ocorre a participação de ambos os tipos de canais, VOC e ROC, e que os primeiros parecem ser ativados em maior proporção quando há a ativação dos mecanismos que acabam por tornar o tecido hiperreativo. O desenvolvimento da hiperreatividade, nesse caso, ocorreu somente naquelas preparações mantidas sem nifedipina. Em todas as situações nas quais houve a adição do bloqueador dos canais de cálcio tipo-L, não observamos hiperreatividade. A presença do ácido niflúmico também aboliu o surgimento dessa resposta, conforme descrito acima. Esses dados corroboram os achados de Teixeira *et al.* (2000) que propuseram um modelo de ativação da resposta contrátil para a 5-HT, envolvendo a abertura de canais de cloreto com ativação subsequente de canais de cálcio tipo-L. Como os efeitos entre nifedipina e ácido niflúmico não são aditivos, especula-se que os dois bloqueiam vias que são partes de uma cascata comum de eventos.

Em suma, os resultados aqui apresentados demonstram que a hiperreatividade induzida pela sensibilização e desafio antigênico leva a um significativo aumento na responsividade contrátil em resposta a entrada de cálcio extracelular mediado tanto por canais VOC, como ROC. Esse aumento de responsividade possivelmente possui mecanismos sinalizadores intracelulares diferentes para alguns agonistas contráteis, principalmente para a serotonina, em que além da participação marcante não só dos canais de cálcio operados por receptor, foi demonstrada uma possível participação de canais de cloro ativados pelo cálcio como mecanismo adicional à sua resposta contrátil

## 6. CONCLUSÕES

### 6. CONCLUSÕES

- **O aumento da resposta contrátil observado após a sensibilização e desafio antigênico, possui um componente relacionado com a facilitação da entrada de cálcio, através de canais de cálcio voltagem dependentes e/ou canais operados por receptor.**
  - **Foi evidenciada a ocorrência de dessensibilização ou taquifilaxia após o desafio antigênico, na resposta contrátil obtida para a serotonina e acetilcolina em traquéias isoladas de ratos.**

- **O desenvolvimento de hiperreatividade à serotonina foi inibido pelo pré-tratamento com a metilsergida.**
- **O desenvolvimento de hiperreatividade para a serotonina, após a sensibilização e desafio antigênico envolve a participação de canais de cálcio dependentes de voltagem e canais de cloreto.**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, W. M., DELEHUNT J.C, YERGER L, MARCHETTE B. Characterization of a late phase pulmonary response following antigen challenge in allergic sheep. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 128 p. 839-844,1983.

AKBARALI, H. I., POTHOULAKIS, C., CASTAGLILOLO, I. Altered ion channel activity in murine colonic smooth muscle myocytes an experimental colitis model. **Biochem. Biophysiol. Res. Com.**, v. 272, p. 637-642, 2000.

ALBELDA, S. M., SMITH, C.W., WARD, P.A. Adhesion molecule and inflammatory injury. **FASEB J.**, v. 8, p 504-12, 1994.

ALTOUNYAN, R. E. C. Changes in histamine and atropine responsiveness as a guide to diagnosis and evaluation of therapy in obstructive airway disease. In: Pepys, J., Frankland, A. W. (Eds). **Disodium cromoglycate in allergic airway disease**. London: Butterworth, p. 47-53, 1970.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Committee on Diagnostic Standard for Nontuberculous Respiratory Disease. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 85, p. 762-768, 1962.

AMRANI, Y., TLIBA, O., DESHPANDE, D. A., WALSETH, T. F., KANNAN, M. S., PANETTIERI JR., R. A. Bronchial hyperresponsiveness: insights into signaling molecules. **Curr. Op. Pharmacol.**, v. 4, p. 230-234, 2004.

ANDERSSON P, BRANGE C, VON KOGERER B, SONMARK B, STANRE G. Effect of glucocorticosteroid treatment on ovalbumin-induced IgE-mediated

immediate and late allergic response in guinea pig. **Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.**, v. 93 (Proceedings Suppl.) p. 54,1988.

ATKINS, P. C., NORMAN, M. E., WEINMAN, B. Z. Antigen-induced neutrophil chemotatic factor in man: correlation with bronchospasm and inhibition by disodium cromoglycate. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 62, p. 149-155,1978.

BARNES, P. J. Airway neuropeptides and asthma. In: VANE *et al.* Asthma: basic mechanisms and therapeutic perspectives. **Roma: Pythagora Press**, Cap. 7, p. 127-139,1989.

BARNES, P. J. Neurogenic inflammation and Asthma. **J. Asthma**, v.29, n. 3, p. 165-180, 1992.

BARNES, P. J. Neuropeptides in human airways smooth muscle. **Pharmac. Ther.**, v. 36, p. 119-129, 1988.

BARNES, PETER. J., K. FAN CHUNG., AND CLIVE P. PAGE. Inflammatory mediators of asthma: an Update. **Pharmacol. Ver.**, v. 38, p. 517-535., 1998.

BEECH, D. J. Actions of neurotransmitters and other messengers on Ca<sup>2+</sup> channels and K<sup>+</sup> channels in smooth muscle cells. **Pharmacol. Ther.**, v. 73, p. 91-119, 1997.

BEHRENS, B. L., CLARK, R. A. F., MARSH, W. R., LARSEN, G. L. Modulation of the late asthmatic response by antigen-specific immunoglobulin G in animal model. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 130, p. 1134-1139, 1984.

BELLOFIORE, S., MARIN, J. G. Antigen challenge of sensitized rats increases airway responsiveness to methacoline. **J. Appl. Physiol.**, v. 65, n. 4, p. 1642-1646. 1988.

BEVILACQUA, M. P., NELSON, R. M. Selectins. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 3793-3797,1993.

BITTLEMAN, D. B. & CASALE, T. B. Allergic models and cytokines. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**; v. 150, p. 72-76; 1994.

BONNET, S., SAVIEAU, J. P., BARILLOT, W., DUBUIS, E., VANDIER, C., BONNET, P. Role of Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels in the remission phase of pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary diseases, **Cardiovasc. Res.**, v. 60, p. 326-336, 2003.

BOOIJ-NOORD, H., De VRIES, K., SLUITER, H. J., ORIE, N. G. M. Late bronchial obstructive reactivity to experimental inhalation of house dust extracts. **Clin. Allergy**, v. 2, p. 43-61, 1972.

BOSCHETTO, P., ZOCCA, E., MILANI, G. F., LICATA, B. PIVIROTTI, F. Broncoalveolar neutrophilia during late, but not early, asthmatic reaction induced by toluene diisocyanate (TDI). **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 77, p. 244, (Abstract 496), 1986.

BURASTERO, S. E.; FENOGLIO, D.; CRIMI, E.; BRUSASCO, V., ROSSI, G. A Quantitative analysis of peripheral allergen-specific B-lymphocytes in asthma. **Allergy**; v. 49 n. 5, p. 348-353,1994.

BUSSE, W., ROSENWASSER, L. Mechanisms of asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, p. 799-804, 2003.

CAPAZ, F. R., RUFFIÉ, C., LEFORT, J., MANZINI, S., VARGAFTIG, B.B., PRERTOLANI, M. Effect of active sensitization on the bronchopulmonary to tachykinins in the guinea pig. Modulation by peptidase inhibitors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 266, n. 2, p. 812-819, 1993.

CAPRON, M., CAPRON, A., DRESSAINT, J.P., TORPIER, G., JOHANSSON, S. G. O., PRIN, L. For receptors for IgE on human and rats eosinophils. **J. Immunol.**, v. 126, p. 2087-2092,1981.

CARTIER, A., THOMSON, N. C., FRITH p. a, ROBERTS, R., HARGREAVE F. E. Allergen-induced increase in bronchial responsiveness to histamine: relationship to the late asthmatic response and change in airway caliber. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 70, p. 170-177,1982.

CARVALHO, C., JANCAR, S., MARIANO, M., SIROIS, P. A rat model presenting eosinophilia in the airway, lung eosinophilic and pulmonary hyperreactivity. **Exp. Lung Resp.**, v. 25, n. 4, p. 303-316, 1999.

CHIBA, Y., MISAWA, M. Alteration in Ca<sup>2+</sup> availability in antigen-induced airway hyperreactivity in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 278, p. 79-82, 1995.

CHIBA, Y., SAKAI, H., ARIMOTO, T., TANAKA, Y., YOSHIKAWA, T., MISAWA, M. Gq<sub>i</sub> protein level increases coucurently with antigen-induced airway hyperresponsiveness in rats. **Repir. Physiol.**, v. 121, p. 75-83, 2000.

CHIHARA, J., KURACHI, D., YAMAMOTO, T., YAMADA, H., HAYASHI, N., NAKAJIMA, S. Possible involvement of mononuclear cells stimulated with specific allergy from asthmatic patients in ICAM-1 expression on the eosinophilic cell line. **Immunology Letters**, v. 46, p. 241-244,1995.

CHUNG, K. F. Role of inflammation in the hyperreactivity of the airway in asthma. **Thorax**, v. 41, p. 557-662,1986.

CHUNG, K. F., ROGERS, D. F., BARNES, P. J., EVANS, T. W. The role of increased airway microvascular permeability and plasma exudation in asthma. **Eur. Respir. J.**, v. 3, p. 329-337, 1990.

CHURCH, M. K., PAO, G. J. K., HOLGATE, S. T. Characterization of histamine secretion from mechanically dispersed human lung mast cells: effects of anti-IgE, calcium ionophore A23187, compound 48/80 and basic polypeptides. **J. Immunol.**, v. 129, p. 2116-2121, 1982.

COCKCROFT, D. W., KILLIAN, D. N. MELLON, J. J. A., HARGREAVE, F. E. Bronchial reactivity to inhaled histamine: a clinical survey. **Clin. Allergy.**, v. 7, p. 235-243, 1977.

COCKCROFT, D. W., MURDOCK, K. Y. Protective effect of inhaled albuterol, cromolyn, beclomethasone and placebo on allergen-induced early asthmatic response, and allergen-induced increase in bronchial responsiveness to inhaled histamine. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 77, p. 122 (abstract 8), 1986.

COLLIER HOJ, JAMES GWL. Humoral factors affecting pulmonary inflammation during acute anaphylaxis in the guinea pig *in vivo*. **Br. J. Pharmacol. Chemoter.** v. 30, p 283-301, 1967.

COSTA, J. J., WELLER, P. F., GALLI, S. J. The cells of the allergic response: mast cells, basophils and eosinophils. **Jama.**, v. 278, n. 22, p. 1815-1822, 1997.

CRONSTEIN, B.N. & WEISSMAN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis and Rheumatism**, v. 136 (2), p. 147-149, 1993.

CRIMI, E., MILANES, M., PINGFANG, S., BRUSASCO, V. Allergic inflammation and airway smooth muscle function. **Sci. Total Environ.** v. 270, p. 57-61, 2001.

DE MONCHY, J. G. R., KAUFFMAN, H. F., VENGE, P., KOETER, G. H., JANSEN, H. M., SLUITIER, H. J. & DE VRIES, K. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 131, p. 373-376, 1985.

DIAZ, P., GONZALEZ, M. C., GALLEGUILOS, F. R., ANCIC, P., KAY, A. S. B. Eosinophils and macrophages in bronchial mucus and bronchoalveolar lavage during allergen-induced late-phase asthmatic reactions. (abstract). **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 77, p. 244, 1986.

DJUKANOVIC, R., ROCHE, W. R., WILSON, J. W., BEASLEY, C. R. W., TWENTYMAN, O. P., HOWARTH, P. H., HOLGATE, S. T. Mucosal inflammation in Asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 142, p. 434-457, 1990.

DURHAM, S. R., KAY, A. B. Eosinophils, bronchial hyperreactivity and late-phase asthmatic reactions. **Clin. Allergy**, v. 15, p. 411-418, 1985.

DUSSER, D. J., JACOBY, D. B., DJOKIC, T. D., RUBINSTEIN, I., BORDSON, D. B., NADEL, J. A. Virus induces airway hyperresponsiveness to tachykinins: role of neutral endopeptidase. **J. Appl. Physiol.**, v. 67, n. 4, p. 1504-1511, 1989.

EDWARDS, J. C. W., SEDGWICK, A. D., WILLOUGHBY, D. A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air. An in vivo tissue culture system. **J. Pathology.**, v. 134 p. 147-156, 1981.

EIDELMAN, D. H., BELLOFIORE, S., MARTIN, J. G. Late airway responses to antigen challenge in sensitized inbred rats. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 137, p. 1033-1037, 1988.

EUM, S. Y., MAGHNI, K., HAMID, Q., EIDELMAN, D. H., CAMPBELL, H., ISOGAI, S. MARTIN, J. G. Inhibition of allergic airways hyperresponsiveness in mice by dexamethasone: Role of eosinophils, IL-5, eotaxin, and IL-13. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, p. 1049-1061, 2003.

FABBRI, L. M., BOSCHETTO, P., ZOCCA, E., MILANI, G., PIVIROTTI, F., PLEBANI, M., BURLINA, LICATA, B., MAPP, C. E. Bronchoalveolar neutrophilia during late asthmatic reactions induced by toluene diisocyanate. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 136, p. 36-42, 1987.

FABBRI, L. M., MAESTRELLI, P., SAETTA, M., MAPP, C. M. Mechanisms of occupational asthma. **Clin. Exp. Allergy.**, v.24, p. 628-635, 1994.

FABRIS, N. Immunodepression in thyroid-deprived animals. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 15, p. 601-611, 1973.

FERGUNSON, A. C., VAUGHAN, R., BROWN. H. & CURTIS, C. Evaluation of serum eosinophilic cationic protein as a marker of disease activity in chronic asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 95, p. 23-28, 1995.

FRIGAS, F., MOTOJIMA, S. & GLEICH, G. J. The eosinophilic injury to the mucosa of the airway in the pathogenesis of bronchial asthma. **Eur. Respir. J.**, v. 4, p. 123-135, 1991.

FROSSARD, N., RHODEN, K. J., BARNES, P. J. Influence of epithelium on guinea pig airway responses to tachykinins: role of endopeptidase and cyclooxygenase. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 248, p. 292-298, 1989.

FUKUNO, Y. HAYASHI, S., KOHSA, K., FUGISAWA, N. TOMINAGA, M., MILLER, E., NAGASAWA, K. Chemokine receptor inhibitor, antileukinate,

suppressed ovalbumin-induced eosinophilic inflammation in the airway. **Cytokine**, v. 22, p. 116-125, 2003.

GOLDBERG, A., SHAPIRO, M., HAMMEL, I., MEKORI, Y. A cutaneous response to histamine, compound 48/80 and codeine in patients with hyperthyroidism. **Annals of Allergy**, v. 64 p. 179-181, 1990.

GIMBRONE, M., OBTIN, M.S., BROCK, A F., *et al.*, Endothelial interleukin 8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. **Science**, v. 246, p.1601-1608, 1989.

GUO, Y., HEDQVIST, P., GUSTAFSSON, L. E. Absence of mast cell involvement in active systemic anaphylaxis in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 430, p. 305-310, 2001.

HAMAGUCHI, Y.; KANAKURA, Y.; FUJITA, J.; TAKEDA, S. I., NAKANO, T., TARUI, S., HONJO, T., KITAMURA, Y. Interleukin-4 as an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue-type mast cell. **J. Exp. Med.**; v. 65, p. 268-73, 1987.

HAMID, Q., CAMERON, L. A. Recruitment of T cells to the lung in response to antigen challenge. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 106, p. s227-s234, 2000.

HARGREAVE, F. E., DOLOVICH, J., ROBERTSON, D. G., KERIGAN, A. T. The late asthmatic responses. **Can. Med Assoc. J.**, v. 110, p. 415-421, 1974.

HARGREAVE, F.E., RAMSDALE, E.H., KIRBY, J.G., O'BYRNE, P.M. Asthma and the role of inflammation. **Eur. J. Respir. Dis.**, v. 69, p. 16-21, Supplement 147, 1986.

HERMSMEYER, K., MISHRA, S., MIYAGAWA, K., MINSHALL, R. Physiologic and pathophysiologic relevance of T-type calcium-ion channels: Potential indications for T-type calcium antagonists. **Clin. Ther.**, v. 19, p. 18-26, suppl. A, 1997.

HOLGATE, S. T., BENYON, R. C., HOWARTH, P. H., AGIUS, R., HARDY, C., ROBINSON, C., DURHAM, S. R., KAY, A. B., CHURCH, M. K. Relationship between mediator release from human lung mast cells in vitro and in vivo. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 77, p. 47-56, 1985.

HOLGATE, S. T.; DJUKANOVIC, R.; WILSON, W.; ROCHE, W.; BROEN, K., HOWARTH, P.H. Allergic inflammation and its pharmacological modulation in asthma. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 94, p. 210-217, 1991.

HOLGATE, S. T., HARDY, C. C., ROBISON, C., AGIUS ', R. M., HOWARTH, P. H. The mast cell as a primary effector cell in the pathogenesis of asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 77, p. 274-282,1986.

HOGG, J. C. The pathophysiology of asthma. *Chest.*, v. 82, suppl., p. 287-306, 1982.

HORIE, S.; OKUBO, Y.; HOSSAINT, M; MOMOSE, T.; SUZUKI, J.; ISOBE, M & SEKIGUCHI, M. intercellular adhesion molecule-1 on eosinophils is involved in eosinophil protein X release induced by cytokines. **Immunology**, v. 90, p. 301-307,1997.

HOWARTH, P. H., HOLGATE, S. T. Astemizole, an H-1 antagonist in allergic asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 75, p. 166,1985.

HUTSOM, P. A. **Investigations into the mechanisms of late phase responses in guinea pig airways.** Thesis (Doctor of philosophy) - Faculty of medicine, University of Southampton. f. 282, 1989.

HUTTENLOCHER, A; SANDBORG, R. R., HORWITZ, A F. Adhesion in cell migration. **Current Op. Cell Biol.**, v. 7, p. 697-706,1995

IJIMA, H., ISHII, M., YAMAUCHI, K., CHAO, C. L., KIMURA, K., SHIMURA, S., SHINDOH, Y., INOUE, H., MEU, S., TAKISHIMA, T. Bronchoalveolar lavage and histological characterization of late asthmatic response in guinea pigs. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 136, p. 922-929,1987.

JANCAR, S., SIQUEIRA, A. L. P., RUSSO, M., STEIL, A. A., FACINCONE, S., MARIANO. A new murine model of pulmonary eosinophilic hypersensitivity: contribution to experimental asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 100, p. 383-388, 1997.

JEFFIES, E., PARÉ, P.D., HOGG, J.C. Measurements of airway edema in allergic bronchoconstriction in guinea pig. **Am Rev. Respir. Dis.**, v. 123, p. 687-688,1981.

JONH, M., HIRST, S. J., JOSE, P., ROBICHAUD, WITT, C., TWORT, C., BERKMAN, N., BARNES, P. J., CHUNG, K. F. Human airway smooth muscle cell express and RANTES in responses to Th1 cytokines: regulation by Th2 cytokines **J. Immunol.**, v. 158, n.4, p. 1841-1847, 1997.

JOSEPH, M., AURIAULT, C., CAPRON, A., VORNG, H., VIERS, P. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. **Nature**, v. 303, p. 310-312,1983.

JOSEPH, M., TONNEL, A. B., CAPRON, A., VOISIN, C. Enzyme release and superoxide anion production by human alveolar macrophages stimulated with immunoglobulin e. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 40, p. 416-422,1980.

JUTILA, A. M. Selectins in leukocyte extravasation: function of a common epitope on L-and E-selectin. **Advances in Pharmacol.**, v. 25, p. 235-62, 1994.

KALLOS, P., KALLOS, L. Experimental asthma in guinea pig revisited. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, v. 73, p. 77-85, 1984

KNOX, A. J. Airway re-modeling in asthma: Role of airway smooth muscle. **Clin. Sci.**, v. 86, p. 647-652,1994.

KARAKI, H., OZAKI, H., HORI, M., MITSUI-SAITO, M., AMANO, K. I., HARADA, K. I., MIYAMOTO, S., NAKAZAWA, H., WON, K. J., SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol. Rev.**, v. 49, p. 157-230, 1997.

KAY, A. B., "Helper" (CD4+) T cells and eosinophils in allergy and asthma. **Ann. Rev. Respir. Dis.**, v. 145, p. 522-526,1992.

KOIVISTO, T., KAIHOVAARA, P., SALASPURO, M. Acetaldehyde induces histamine release from purified peritoneals mast cells. **Life Science.**, v. 64, p. 183-190,1999.

KOSHINO, T., ARAI, Y., MIYAMOTO, Y., SANO, Y., TAKAISHI, T., HIRAL, K., ITO, K. & MORITA, Y. Mast cell and basophil number in the airway correlate with the bronchial responsiveness of asthmatic. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, v. 107 (1-3), p. 378-379,1995.

KOWANKO, I. C., GORDON, T. P., ROZENBILDS, M. a, BROOKS, P. M., ROBERTS-THOMSON, P. J. The subcutaneous air pouch model of synovium and the inflammatory response to heat aggregated gammaglobulin. **Agents Actions.**, v. 18, n. 3-4, p. 421-428,1986.

KUWANO, K., BOSKEV, C. H., PARÉ, P. D., BAI, T. R. WIGGS, B. R., HOGG, J. C. Small airway dimensions in the asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 148, p. 1220-1225,1993.

LACOSTE, J. Y., CHANEZ, P., PAGANIN, F., GOGARD, P., MICHEL, F. B., BOUSQUET, J. inflammation bronchique de l'asthmatique. Evaluation par biopsies bronchiques. **Rev. Mal. Resp.**, v. 6, p. 533-541, 1991.

LAM, S., LERICHE, J., PHILLIPS, D., CHAN-YEUNG, M. Cellular and protein changes in bronchial lavage fluid after late asthmatic reaction in patients with red cedar asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 80, p. 44-50, 1987.

LANDUCCI, E. C. T., ANTUNES, E., DONATO, J. L., FARO, R., HYSLOP, S., MARAGONI, S., OLIVEIRA, B., CIRINO, G., De NUCCI, G. Inhibition of carrageenan-induced rat paw oedema by crotafotin, a polypeptide complex with phospholipase A2. **Br. J. Pharmacol.**, v.1 14, p. 578-573, 1995.

LEFF, A. R., HAMANN, K. J., WEGNER, C. D. Inflammation and cell-cell interactions in airway hyperresponsiveness. **Am. J. Physiol.**, v. 260 (4 pt 1), p. 189-206,1991.

LISSEN, M., LEMMERMANN, C. H., LIPPONER, L., WILHELMS, O. H. Late phase increase of thrombin-like proteinase, protein, leukocytes in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and chemiluminescence of BAL after ovalbumin aerosol inhalation by actively immunized, rats. **Int. Allergy Appl. Immunol.**, v. 94, p. 284-287,1991.

LIU, L. Y., JARJOUR, N. N., BUSSE, W. W., KELLY, E. A. B. Chemokine receptor expression on human eosinophils from peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid after segmental antigen challenge. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 122. p. 556-562, 2003.

LIU, L. Y., SWENSON, C. A., KELLY, E. A. KITA, H., JARJOUR, N. N., BUSSE, W. W. Comparison of the effects of repetitive low-dose and single-dose antigen challenge on airway inflammation. **J. Allergy Clin Immunol.**, v. 111, p. 818-825, 2003.

LO, T. N., ALMEIDA, A. P., BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 221, p. 261-267, 1982.

LUKACS, N. W., STRIETER, R.M., CHENSUE, S. W., KUNKEL, S.L. Activation and regulation of chemokines in allergy airway inflammation. **J. Leukoc. Bio.**, v. 59, p. 13-17,1996.

LUKACS, N. W., STRIETER, R. M.; CHENSUE, S. H.; WIDMER, M., KUNKEL, S. L. TNF- $\alpha$  mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. **J. Immunol.**, v. 154, n. 10. p. 5411-5417, 1995.

LUONG, K. V., NGUYEN, L. T., Hyperthyroidism and asthma. **J Asthma.**, v. 37, p. 125-130, 2000.

MANZOLLI, S., MACEDO-SOARES, M. F., VIANNA, E. O., SANNOMIYA, P. Allergic airway inflammation in hypothyroid rats. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 104, p. 595-600,1999.

MARSH, W. R., IRVIN, C. G., MURPHY, K. R., BEHRENS, B. L. & LARESN, G. L. Increases in airway reactivity to histamine and inflammatory cells in bronchoalveolar lavage after the late asthmatic response in an animal model. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 131, p. 875-879, 1985.

MARTHAN, R., STEPHENS, N. L. Mechanisms of bronchial hyperreactivity. Role of smooth muscle. **Rev. Mal. Respir.** v. 11, p. 149-159, 1994.

MARTIN, J. G., XU, L. J., TOH, M. Y., OLIVESTEIN, R., POWELL, W. S. Leukotrienes in bile during the early and the late airway responses after allergen challenge of sensitized rats. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 147, p. 104-110, 1993.

McDONALD, R. J., St-GEORGE, J. A., PAN, L.C., HYDE, D. M. Neutrophil adherence to airway epithelium is reduced by antibodies to the leukocyte CD11b/CD18 complex. **Inflammation.**, v. 17, n. 2, p. 145-151; 1993.

McEVER, R.P. Leukocyte endothelium cell interactions. **Current Op. Cell Biol.**, v. 4, p. 840-844, 1992.

McFADDEN, E. R. Jr., GILBERT, I. A. Asthma. **The New England J. of Med.**, v. 327, n. 27, p. 1928-1937, 1992.

METZGER, W.J., RICHERSON, H.B., WORDEN, K., MONICK, M., HUNNINGHAKE, G.W. Bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic patients following allergen bronchoprovocation. **Chest.**, v. 89, p. 447-83, 1986.

METZGER, W. J., ZAVALA, D., RICHERSON, H. B., MOSELEY, P., IWAMOTA, P., MONICK, M., SJOERDSMA, K., HUNNINGHAKE, G. W. Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lungs. Description of the model and local airway inflammation. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 135, p. 433-440, 1987.

MORRISON, K. J., VANHOUTTE, P. M. Airway epithelial cells in the pathophysiology of asthma. **Ann. NY. Acad. Sc.** v. 8, p. 629-682, 1991.

MOTOJIMA, S., FRIGAS, E., LOEGERING, D. A., GLEICH, G. J. Toxicity of eosinophil cationic proteins for guinea pig tracheal epithelium *in vitro*. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 139, p. 801-805, 1989.

MURPHY, K. R., WILSON, M. C., IRVIN, C. G., GLEZEN, L. S., MARSH, W. R., HASLETT, C., HENSON, P. M., LARSEN, G. L. The requirement for polymorphonuclear leukocytes in the late asthmatic response and heightened airway reactivity in an animal model. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 134, p. 62-68, 1986.

NAG, S. S., XU, L. J., HAMID, Q. RENZI, P. M. The effects of IL-5 on airway physiology and inflammation in rats. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111. p. 558-566, 2003.

OHRUI, T., YANAI, M., SEKIZAWA, K., SHIMURA, S., OKAYAMA, H., AIKAWA, T., SASAKI, T., TAKISHIMA, T. The role of eosinophils in allergic reaction in the dog asthma model. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 137 (Supp.), p. 136, 1988.

ONISHI, T., KITA, H., WEILER, D., SUR, S., SEDGWICK, J. B., CALHOUN, W. J., BUSSE, W. W., ABRAMS, J. S. & GLEICH, G. J. IL-5 is the predominant eosinophil-active cytokine in the antigen-induced pulmonary late-phase reaction. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 147, p. 901-907, 1993.

OSBORN, Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. **Cell**, v. 62, p. 36, 1990.

OTSUKA, Y., NAGANO, K., HORI., *et al.*, Inhibition of neutrophil migration by tumor necrosis factor. *In vivo* and *in vitro* studies in comparison with *in vitro* effect. **J. Immunol.**, v. 145, p. 2639-2643, 1990.

PAUWELS, R. A., KIPS, J. C., PELEMAN, R. A., VAN DER STRAETEN, M. E. The effect of endotoxin inhalation on airway responsiveness and cellular influx in rats. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 141, p. 540-545, 1990.

PEPYS, J. Clinical and therapeutic significance of patterns of allergic reactions in the lungs to extrinsic agents. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 116, p. 573-578, 1977.

PEPYS, J. & HUTCHCROFF, B. J. Bronchial provocation tests in etiologic diagnosis and analysis of asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 112, p. 829-835, 1975.

PEPYS, J. Immunopathology of allergic lung disease. **Clin. Allergy.**, v. 3, p. 122, 1973.

POLOSA, R. Renaissance of the effector role of the mast cell in bronchial asthma. **Ann. Ital Med. Int.**, v. 10, n. 2, p. 126-33, 1995.

POLOSA, R., RENAUD, L., CACCIOLA., PROSPERINI, G., CRIMI, N., DJUKANOVIC, R. Sputum eosinophilia is more closely associated with airway responsiveness to bradykinin than methacholine in asthma. **Eur Respir J.**, v. 12, p. 551-556, 1998.

PREDALIER, A. Late-phase reaction in asthma: basic mechanisms. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 101, n. 3, p. 322-325, 1993.

RAEBURN, D., GIEMBYCZ, M. A. Airway smooth muscle: peptide receptors, ion channels and signal transduction. **Resp. Med.**, v. 90, p. 369-370, 1996.

RAFFERTY, P., LEWIS, P., WHEELEY, M. St. G., HOLGATE, S. T. Terfenadine as a potent and specific H-1 histamine receptor antagonist on asthmatic airway. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 77, p. 155, 1986.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M. Sistema respiratório. **Farmacologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 17, p. 280-291, 1997.

RAND, T.H., CRUIKSHANK, W. W., CENTER, D. M., WELLER, P. F. Human eosinophils share with other CD4+ leukocytes responsiveness to lymphocyte chemoattractant factor. **FASEB J.**, v. 4, A1 699, (Abstract 28), 1990.

RENZI, P. M., OLIVENSTEIN, R., MARTIN, G. J. Effect of dexamethasone on airway inflammation and responsiveness after antigen challenge of the rat. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 148 (4 pt 1), p. 932-939, 1993.

ROBERTSON, D. G., KERIGAN, A. T., HARGREAVE, F. E. CHALMERS, R., DOLOVICH, J. Late asthmatic responses induced by ragweed pollen allergen. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 54, p. 244-254, 1974.

RODGER, I. W. Asthma. Airway smooth muscle. *Br. Med. Bull.* v. 48, p. 97-107, 1992.

ROSENTHAL, P. R., NORMAN, P. S., SUMMER, W. R. Role of the parasympathetic system in antigen-induced bronchospasm. **J. Appl. Physiol.**, v. 42. p. 600-606, 1977.

ROSS, H. M., REITH, E. J., ROMRELL, L. J. Sistema respiratório. **Histologia: texto e atlas**. 2. Ed. São Paulo: Ed. Panamericana, Cap. 18, p. 501-525, 1993.

ROUX, E., MOLIMARD, M., SAVINEAU, J. P., MARTHAN, R. Muscarinic stimulation of airway smooth muscle cells, **Gen. Pharmac.**, v. 31, p. 349-356, 1998.

SABAN, R., DICK, E. C., FISHLEDER, R. I., BUCKNER, C. K. Enhancement by parainfluenza 3 infection of contractile responses to substance P and capsaicin in airway smooth muscle from the guinea pig. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 136, p. 586-591, 1987.

SAETTA, M., FABRI, L. M., DANIELI, D., PROTTI, G. & ALLEGRA, L. Pathology of bronchial asthma and animal models of asthma. **Eur. Respir. J.**, v. 2 p. 47754782, Supplement, 1989.

SASAKI, H., YANAI, M., SHIMURA, S., OKAYAMA, T., SASAKI, T., TAKISHIMA, T. Late asthmatic response to *Ascaris* antigen challenge in dogs treated with metyrapone. **Ann. Rev. Respir. Dis.**, v. 136, p. 1459-1465, 1987.

SAUNDERS, M. A., MITCHELL, J. A., SELDON, P. M., BARNES, P. J., GIEMBYCZ, M. A., BELVISI M.G. Release of granulocytes-macrophage colony-stimulating factor by human cultured airway smooth muscle cells: Suppression by dexamethasone. **Br. J. Pharmacol.**, v. 120 p. 545-546, 1997.

SEOW, C. Y., SCHELLENBERG, R. R., PARE, P. D., Structural and functional changes in the airway smooth muscle of asthmatic subjects. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v. 158, p. 179-186, 1998.

SEOW, C. Y., FREDBERG, J. J. Historical perspective on airway smooth muscle: the saga of frustrated cell. **J. Appl. Physiol.** v. 92, p. 938-952, 2001.

SCHMEKEL, B. & VENGE, P. Markers for eosinophils and T-lymphocytes as predictors of late asthmatic response. **Allergy.**, v. 48, p. 94-97, Supplement, 1993.

SHAPAIN, M. P., BEHRENS, B. L., LARSEN, G. L., HENSON, P. M. Na animal model of late pulmonary responses to *alternaria* challenge. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 126, n. 3, p. 483-489, 1982.

SHULMAN, E.S. The role of mast cell derived mediators in airway hyperresponsiveness. **Chest.**, v. 90, p. 578-583, 1986.

SMITH, K. A. Interleukin-2: inception, impact, and implications. **Science.**, v. 240, n. 4856, p. 1169-1176, 1988.

SOLLEY, G. O.GLEICH, G. J., JORDAN, R. E., SCHROETER, A. L. Late phase of immediate wheal and flare skin reaction - its dependence upon IgE antibodies. **J. Clin. Invest.**, v. 58, n.2, p. 408-420, 1976.

SOUZA, G. E. P., FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents and Actions.**, v. 17, p. 1, 1985.

STEIL, A. A., DE LIMA, W. T., JANCAR. S. Modulation by lipid mediators of immune complex-induced lung inflammation in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 361, n. 1, p. 93-98, 1998.

STEPHENS, N.L., JIANG, H., HALAYKO, A. Role of airway smooth muscle in asthma: possible relation to the neuroendocrine system. **Anat. Rec.** v. 236, p. 152-163, 1993.

STEPHENS, N.L., LI, W, WANG, Y., MA, X., The contractile apparatus of airway smooth muscle. Biophysics and biochemistry. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** V. 158, p. 80-94, 1998.

STEPHENS, N. L. Airway smooth muscle, **Lung.**, v. 179, p. 333-373, 2001

STEPHENS, N. L., LI, W., JIANG, H., UNRUH, H., MA, X. The biophysics of asthmatic airway smooth muscle. v. 137, p. 125-140, 2003.

STRAIT, R., MORRIS, S. C., YANG, M., QU, X. W. FINKELMAN, F. D. Pathways of anaphylaxis in the mouse. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 109, p. 658-668, 2002.

TAKAHASHI, A., CAMACHO, P., LECHLEITER, J. D., HERMAN, B. Measurement of intracellular calcium. **Physiol. Rev.**, v. 79, p.1089-1124, 1999.

TAVARES DE LIMA, W., DA SILVA, Z. L. Contractile responses of proximal and distal trachea segments isolated from rats subjected to immunological stimulation: Role of connective tissue mast cells. **Gen. Pharmac.**, v. 30, p. 689-695, 1998.

TEIXEIRA, M. C. L., COELHO, R. R., LEAL-CARDOSO, J. H., CRIDDLE, D. N. Comparative effects of niflúmico acid and nifedipina on 5-hydroxythiptamine- and acetylcoline-induced contraction of the rat trachea. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 394, p. 117-122, 2000.

THOMAS, T.S., YATES, D. H., BARNES, P.J. Tumor necrosis factor a increases airways responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 152, n. 1, p. 76-80, 1995.

TIBERIO, I. F., TURCO, G. M., LEICK-MALDONADO, E. A., SAKAE, R. S., PAIVA, S. O., WARTH, M. P. T. N., LAPA E SILVA, J. R., SALDIVA, P. H., MARTINS, M. A. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 155, n.5, p. 1739-1747, 1997.

TORO, L., MARIJIC, J., NISHIMARU, K., TANAKA, Y., SONG, M., STEFANI, E. Aging, ion channel expression, and vascular function, **Vasc. Pharmacol.**, v. 38, p. 73-80, 2002.

TURNER, M. Anticorpos e seus receptores. In: **Imunologia**, ROITT, J. OSTOFF; D. MALE. Ed. Manole Ltda. 4a ed., São Paulo, S.P., p. 4.1-4.10, 1997.

VAN ROSSUM, J. M., VAN DEN BRING, F. V. Cumulative dose-response curves. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 143, p. 240-246, 1963.

VIANA, E. O., GARCIA-LEME, J. Allergen-induced airway inflammation in rats: Role of insulin. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 151, n. 3, pt.1, p. 809-814, 1995.

VENGE, P. & DAHL, R. Are blood eosinophil number and activity important or the development of the late asthmatic reaction after allergen challenge? **Eur. Respir. J.**, v. 2, p. 430-434, Supplement 6, 1989.

VENGE, P. Eosinophil activity in bronchial asthma. **Allergy Proc.**, v. 15, n. 3, p. 139-41, 1994.

VIGNOLA, A. M.; CHANEZ, P.; PAUL-LACOSTE, P.; PAUL-EUGENE, N.; GODARD, P. & BOUSQUET, J. Phenotypic and functional modulation of normal human alveolar macrophages by histamine. **Am. J. Respir. Cell Mol. Bio.**, v. 11 n. 4, p. 456-63; 1994.

WAHL, S. M., FEDMAN, G. M., McCARTHY, J. B. Regulation of leukocyte adhesion and signaling in inflammation and disease. **J. Leukocyte Biol.**, v. 59, p. 789-796, 1996.

WATANABE, A. MISHIMA, H., RENZI, P. M., XU, L. J., HAMID, Q., MARTIN, J. G. Transfer of allergic airway responses with antigen-primed CD4+ but not CD8+ T cells in brown Norway rats. **J. Clin. Invest.**, v. 96, n. 3, p. 1303-1310, 1995.

WEGNER, C. D., KOKER, P. J., SABO, J. P., GUNDEL, R. H. Interdependence of antigen-induced bronchoconstriction, airway inflammation and altered blood white cell composition in monkey. (Abstract). **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 135: A221, 1987.

WEGNER, C. D., GUNDEL, R. H., ABRAHAM, W. M., SCHHULMAN, E. S., KONTNY, M. J., LAZER, E. S., HOMON, C. A., GRAHAM, A. G., TORCELLINI, C. A., CLARKE, C. C. *et al.* The role of 5-lipoxygenase products in preclinical models of asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 91, n. 4, p. 917-929, 1993.

WEGNER, C. D., GUNDEL, R. H., REILLY, P., HAYNES, N., GORDON LETTS, L., ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. **Science**, v. 247, p. 456-459, 1990.

WEISS, S. J., TEST, S. T., ECKMANN, C. M., ROODS, D., REGIANI, S. Brominating oxidants generated by human eosinophils. **Science**, v. 234, p. 2002-03, 1986.

WELLER P.F., GOETZL E.J. The human eosinophil: roles in host defense and tissue injury. **Am. J. Pathol.**, v. 100, p. 793-820, 1980.

WIESLANDER, E., ANDERSSON, P., CINDEN, M., AXELSSON, B., KALLSTROM, L., BRATTSAND, R., PAULSSON, I. Importance of particulate antigen for the induction of dual bronchial reaction in guinea pigs. **Agents and Actions**, v. 16, p. 37-38, 1985.

WOOLLEY, K. L., ADELROTH, E., WOOLLEY, M. J., ELLIS, R., JORDANA, M. & O'BYRNE, P. M. Effects of allergen challenge on eosinophils, eosinophil cationic protein, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mild asthma. **Am. j. Respir. Crit. Care Med.**, v. 151, n. 6, p. 1915-1924,1995.

XU, L. J., SAPIENZA, S., DU, T., WARSERMAN, S., MARTIN, J. G. Comparison of upper and lower airway responses of two sensitized ratstrain to inhaled antigen. **J. Appl. Physiol.**, v. 73, n. 4, p. 1608-1613,1992.

YU, D. Y. C., GALANT, S. P., GOLD, W. M. Inhibition of antigen-induced bronchoconstriction by atropine in asthmatic patients. **J. Appl. Physiol.**, v. 32, p. 832-843,1972.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)