

Ricardo Henrique Marques

**Estresse crônico em cobaias com inflamação
alérgica pulmonar:
Influência do óxido nítrico na modulação das
respostas inflamatórias, de remodelamento e
de hiperresponsividade pulmonar**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Iolanda de F. Lopes Calvo Tibério

**SÃO PAULO
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

*"Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença, entre dar a mão e acorrentar uma alma.
E você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança.
E começa a aprender que beijos não são contratos e presentes não são promessas.
E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança.
E aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.
Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo.
E aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam...
E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando.
Aprende que falar pode aliviar dores emocionais.
Descobre que se leva anos para se construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida.
Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias.
E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você é na vida.
E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.
Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendemos que os amigos mudam.
Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos.
Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos.
Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que você mesmo pode ser.
Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto.
Aprende que não importa aonde já chegou, mas onde está indo, mas se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve.
Aprende que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados.
Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências.
Aprende que paciência requer muita prática.
Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se.
Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha.
Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens, poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso.
Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não lhe dá o direito de ser cruel.
Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame, não significa que esse alguém não o ama com toda intensidade que pode.
Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes você tem que aprender a perdoar-se.
Aprende que com a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado.
Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte.
Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás.
Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores.
E você aprende que realmente pode suportar, que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.
E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!
Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar."
(Autor desconhecido)*

Espero um dia ter aprendido tudo isso...

Dedicatória

Ao meu pai Juventino, minha mãe Elza e meus irmãos Daniel e Mariana, palavras não seriam suficientes para expressar tudo o que sinto por vocês, muito obrigado pelo apoio incondicional de sempre.

Aos meus filhos, Ana Carolina e Pedro Henrique, vocês são o combustível para minhas conquistas.

À Dr^a Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério, tenho pro ti uma profunda admiração, pela dedicação ao trabalho e especialmente as pessoas, independente de quem seja.

À Carla Máximo Prado, só quem te conhece sabe que “Máximo” não é apenas seu sobrenome. Muito obrigado por tudo.

À Claudia Miranda Starling, personificação da palavra amiga, a conclusão de mais essa etapa ficou muito menos divertida sem você por perto.

À Ivanir, amigo de várias horas, sempre presente com ótimos conselhos, só falta usar pra si mesmo de vez em quando... Valeu amigo.

À Edna A. Leick-Maldonado, pela ajuda e orientação em todas as fases dos experimentos. E pela paciência em ensinar.

Ao amigo Antonio Ricardo Gagliardi, pela amizade e companherismo

À Luciana Janjoppi por todos os momentos que passamos juntos

Aos parceiros de Laboratório, Fabiana, Rafael, Luciana Rolim, Patrícia Angeli, Fernanda's, Tati Lanças, Alessandra Choqueta, Clarice, Deborah, Rosana, Sandra, Esmeralda, Leda, Nildo, David, Bia, sem a ajuda direta e indireta de vocês a realização deste trabalho seria impossível. Obrigado a todos .

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

Introdução.....	1
Histórico.....	1
Definição.....	5
Aspectos epidemiológicos.....	6
Classificação e diagnóstico.....	11
Fatores de risco.....	13
Fisiopatologia.....	15
Óxido nítrico.....	17
O Papel do parênquima na fisiopatogenia da asma.....	20
Mecânica oscilatória de tecido pulmonar periférico.....	23
Modelo experimental de inflamação crônica pulmonar.....	24
Estresse.....	25
Modelos experimentais para avaliação do estresse.....	32
Asma, estresse e neuroimunomodulação.....	34
Objetivos.....	40
Métodos.....	41
Grupos experimentais.....	41

Protocolo de sensibilização.....	42
Tratamento com 1400W.....	43
Protocolo de natação forçada.....	43
Avaliação do comportamento em campo aberto.....	46
Dosagem do cortisol sérico.....	49
Avaliação do peso das adrenais.....	50
Avaliação da mecânica oscilatória de tecido pulmonar periférico.....	50
Estudo morfométrico do parênquima pulmonar.....	54
Avaliação da densidade de eosinófilos.....	55
Avaliação do remodelamento de matriz extracelular – Coloração de Picro Sirius.....	55
Imunohistoquímica para detecção de actina.....	57
Imunohistoquímica para detecção de 8-iso-PGF2 α	58
Imunohistoquímica para detecção de iNOS.....	59
Análise estatística.....	60
Resultados.....	62
Discussão.....	88
Conclusão.....	104
Referências.....	106

Lista de abreviaturas

ABC	Complexo avidina-biotina
ACTH	Corticotropina
AMP	Monofosfato de adenosina
BSA	Soro de albumina bovina
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CRF	Fator liberador de corticotropina
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
CVF	Capacidade Vital Forçada
DAB	Diaminobenzidina
DATASUS	Banco de dados do sistema único de saúde
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
Et	Elastância
GINA	Global Initiative National of Asthma
GM-CSF	Fator alfa de crescimento de colônia de granulócitos
Grupo OVA	Animais que receberam inalações com solução de ovoalbumina
Grupo OVA-S	Animais que receberam inalações com solução de ovoalbumina e submetidos ao protocolo de natação forçada
Grupo OVA-S-W	Animais que receberam inalações com solução de ovoalbumina, submetidos ao protocolo de natação forçada e tratamento com 1400W
Grupo OVA-W	Animais que receberam inalações com solução de ovoalbumina e tratamento com 1400W
Grupo SAL	Animais que receberam inalações com soro fisiológico
Grupo SAL-S	Animais que receberam inalações com soro fisiológico e submetidos ao protocolo de natação forçada
Grupo SAL-S-W	Animais que receberam inalações com soro fisiológico, submetidos ao protocolo de natação forçada e tratamento com 1400W
Grupo SAL-W	Animais que receberam inalações com soro fisiológico e tratamento com 1400W

HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
Hz	Hertz
IFN- γ	Interferon-gama
IgE	imunoglobulina E
IL	Interleucinas
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IOD	Densidade óptica integrada
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Children
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LIM-20	Laboratório de investigação médica
L-NAME	L-NG-nitroarginina metil ester
L-NAPNA	L-NG-nitroarginina-p-nitroanilida
LPS	Lipopolissacáride
MBP	Proteína Básica Principal
MMP	Metaloproteinases
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
NCHS	National Center for Health Statistics E-Stats
NIH	National Institute of Health
NKA	neurocinina A
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOex	Óxido nítrico exalado
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução tampão fosfato
PGF-2 α	
RPM	Rotações por minuto
Rt	Resistência
SAG	Síndrome Geral de Adaptação
SAL	Síndrome de Adaptação Local
SP	Substância P
TBS	TRIS-buffered saline

TNF α	Fator de necrose tumoral-afa
VEF ₁	Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo
VEGF	
TGF- β 1	Fator transformador do crescimento-Beta

Lista de figuras

- Figura 1 – Papiro de Ebers00
- Figura 2 – Mapa de prevalência da Asma no mundo
- Figura 3 – Esquema do protocolo de sensibilização, indução do estresse e tratamento com 1400W
- Figura 4 – Caixa utilizada para induzir estresse por natação forçada
- Figura 5 – Imagem capturada pelo sistema Ethovision e as divisões do campo aberto.
- Figura 6 – Fotos da sala de experimento e do equipamento Ethovision
- Figura 7 – Esquema do protocolo experimental da mecânica oscilatória do tecido pulmonar periférico
- Figura 8 – Gráfico de barras representando a média \pm EP da velocidade de deslocamento dos animais no campo aberto
- Figura 9 – Gráfico de barras representando a média \pm EP do tempo de movimentação dos animais no campo aberto
- Figura 10 – *Box Plots* dos valores do peso das adrenais
- Figura 11 – *Box Plots* dos valores da porcentagem de aumento da resistência tecidual após desafio antigênico
- Figura 12 – *Box Plots* dos valores da porcentagem de aumento da elastância tecidual após desafio antigênico
- Figura 13 – *Box Plots* dos valores da densidade eosinofílica em tecido pulmonar de cobaias
- Figura 14 – *Box Plots* da densidade de 8-iso-PGF2 α no septo alveolar de cobaias

Figura 15 – *Box Plots* dos valores de conteúdo de colágeno de septo alveolar de cobaias

Figura 16 – fotomicrografias de tecido pulmonar periférico de cobaias coradas com LUNA. Imunohistoquímica para expressão de 8-iso-PGF2 α e coloração de Picrosirius para marcação de colágeno.

Figura 17 – *Box Plots* dos valores de células iNOS positivas em tecido pulmonar de cobaias

Figura 18 - *Box Plots* da percentagem de expressão de actina no septo alveolar de cobaias.

Figura 19 - fotomicrografias de tecido pulmonar periférico coradas com anticorpo para detecção da expressão de iNOS e actina.

Resumo

Marques RH. Estresse crônico em cobaias com inflamação alérgica pulmonar: influência do óxido nítrico na modulação das respostas inflamatórias, de remodelamento e de hiperresponsividade pulmonar. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Introdução: Há crescentes evidências que sinalizam o papel do estresse crônico como desencadeante e mesmo perpetuador de crises asmáticas, bem como a importância do parênquima pulmonar na piora funcional da asma. **Objetivos:** Deste modo, consideramos relevante avaliar em cobaias com inflamação alérgica crônica pulmonar como o estresse físico repetido, induzido pela natação forçada, modula a responsividade do parênquima pulmonar, a infiltração eosinofílica, ativação da via de estresse oxidativo e o remodelamento, bem como o papel da ativação de enzima óxido nítrico sintase induzida nestas respostas. **Métodos:** Os animais receberam inalações duas vezes por semana durante quatro semanas com doses crescentes de ovoalbumina ou solução fisiológica. Após 24 horas da quarta inalação os animais foram separados em dois grupos onde metade destes animais foi submetido ao protocolo de natação forçada por dez dias com intervalo de dois dias, para a indução do estresse, enquanto a outra metade dos animais permaneceu sem a indução de estresse. Para avaliar a participação da ativação de iNOS nesta resposta as cobaias foram novamente divididas em grupos, onde parte foi tratada com 1400-W (inibidor específico de iNOS, 2mg/kg ip/dia/4 dias) ou veículo no mesmo período, iniciando 30 minutos antes da sétima inalação. Para avaliação das repercussões comportamentais da indução de estresse os animais foram

submetidos ao teste de campo aberto, sendo obtidos os seguintes parâmetros: distância percorrida, velocidade média total, tempo de movimentação total. Foi também coletada uma amostra de sangue no dia da realização da mecânica pulmonar para a dosagem do cortisol. Após 72h da sétima inalação, os animais foram anestesiados, exsanguinados e fatias de tecido pulmonar periférico foram retiradas e suspensas em banho orgânico de Krebs, e a resistência (Rt) e elastância (Et) do tecido pulmonar periférico foram avaliadas em condição basal e após desafio com ovoalbumina (1%). Foi também obtida a medida de histerisividade. Após a realização da mecânica oscilatória, as mesmas fatias de tecido pulmonar periférico foram submetidas à avaliação histopatológica. **Resultados:** Nos animais submetidos a natação forçada foi observado um aumento no peso da adrenal, no cortisol sérico, na distância percorrida e no tempo de movimentação em campo aberto o que demonstrou que a natação forçada foi eficaz como indutor de estresse. Os animais expostos às inalações com ovalbumina apresentaram valores maiores de porcentagem de aumento da resistência e da elastância tecidual após desafio com ovoalbumina ($p < 0.05$). Os animais expostos às inalações com ovalbumina e submetidos a estresse induzido por natação forçada apresentaram um aumento da resistência e elastância teciduais ($p < 0,05$), enquanto que o tratamento com 1400W reverteu esse aumento tanto nos animais sensibilizados quanto nos sensibilizados submetidos a estresse. Houve aumento do número de eosinófilos ($P < 0.05$), de células iNOS positivas ($P < 0,05$), da deposição de fibras colágenas ($P < 0,05$), no conteúdo de actina ($P < 0,05$) e de 8-epi-PGF2a

($P < 0,05$) no septo alveolar. Nos animais sensibilizados e submetidos ao estresse houve aumento todos os parâmetros morfológicos descritos anteriormente ($P < 0,05$) exceto pelo depósito de fibras colágenas. A administração de 1400W reduziu todos estes parâmetros funcionais e morfológicos ($P < 0,05$) com exceção do conteúdo de actina no septo alveolar, da infiltração eosinofílica e dos níveis de cortisol sérico.

Conclusões: Neste modelo experimental, o bloqueio específico da iNOS atenuou a constrição, a inflamação eosinofílica, a expressão de iNOS, o remodelamento no parênquima pulmonar tanto nos animais apenas sensibilizados quanto nos animais sensibilizados e submetidos ao estresse. Estas alterações podem estar relacionadas aos efeitos da ativação da óxido nítrico sintase induzida na modulação da via do estresse oxidativo, sinalizada pelos efeitos na produção de isoprostano 8. O presente estudo sugere que a inibição específica da iNOS pode amplificar as estratégias terapêuticas utilizadas na abordagem de doenças inflamatórias crônicas pulmonares.

Descritores (1. Asma, 2. Óxido nítrico sintase, 3. Ovalbumina, 4. Estresse, 5, Cobaias)

Summary

Marques RH. Chronic stress in guinea pigs with chronic allergic inflammation: influence of nitric oxide synthase in the inflammatory responses, remodeling and lung tissue responsiveness. [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Introduction: There is growing evidence to indicate the role of chronic stress even perpetuating as triggering asthma attacks and the importance of functional lung parenchyma in worsening of asthmatic responses. **Objective:** We considered relevant to evaluate in guinea pigs with chronic allergic pulmonary inflammation if repeated physical stress, induced by forced swimming, modulates the responsiveness of the distal lung parenchyma, eosinophilic infiltration, oxidative stress pathway activation and extracellular matrix remodeling as well as the role of the activation of induced nitric oxide synthase in these responses. **Methods:** The animals received inhalations twice a week for four weeks with increasing doses of ovalbumin or normal saline. After 24 hours of the fourth inhalation, the animals were separated into two groups where half of these animals were subjected to the protocol of forced swimming for ten days with an interval two days, while the other half of the animals remained without stress induction. In order to evaluate the involvement of iNOS activation in this response, guinea pigs were again divided in two groups, one part of them were treated with 1400W (specific inhibitor of iNOS, 2mg/kg ip/day/4 days) or vehicle in the same period, starting 30 minutes before the seventh inhalation. To evaluate the behavioral impact of stress induction, the animals were subjected to open field test, and we obtained the following parameters: distance traveled, average speed, total time of handling. It was also collected a blood sample on the day of

pulmonary mechanics to measure cortisol. After 72h of the seventh inhalation, animals were anesthetized, and exsanguinated and slices of peripheral lung tissue were removed, suspended in a Krebs bath, and resistance (Rt) and elastance (Et) of peripheral lung tissue were evaluated either at baseline condition and after ovalbumin challenge (1%). It was also measured the histerisivity. After the end of the mechanical oscillatory evaluation, the same slices of peripheral lung tissue were submitted to histopathological analysis. **Results:** We observed that animals submitted to forced swimming had an increase in adrenal weight, in the serum cortisol, in the distance and time of movement in the open field, showing that forced swimming was effective as stressor. The animals exposed to inhalations with ovalbumin and submitted to stress induced by forced swimming had an increase in pulmonary tissue resistance and elastance ($p < 0.05$), had an increased in the number of eosinophils ($P < 0.05$), iNOS positive cells ($P < 0.05$), actin ($P < 0.05$) and 8-epi-PGF 2α content ($P < 0.05$) in alveolar septum compared to ovalbumin exposed animals (OVA group). Treatment with 1400W reversed this response in sensitized animals submitted or not to stress induction ($P < 0.05$) There was no difference in the collagen deposition. Administration of 1400W for sensitized and stressed animals reduced all these functional and morphological parameters ($P < 0.05$) except for the actin content of the alveolar septum, eosinophilic infiltration and cortisol levels. **Conclusions:** In this experimental model, the specific iNOS inhibition attenuated the constriction, the eosinophilic inflammation, the iNOS expression, the lung parenchyma remodeling in animals sensitized and

submitted or not to stress induction. These changes may be related to the effects of inducible nitric oxide activation in the modulation of oxidative stress pathway. This study suggests that specific inhibition may amplify the therapeutic strategies to chronic inflammatory lung diseases.

Descriptors: 1. Asthma 2. Nitric oxide sintase, 3. Ovalbumin, 4. Stress, 5, Guinea pigs

Introdução

Histórico

A etimologia da palavra asma perde-se no tempo, remontando-se ao grego, cujo significado está associado a arquejante, ofegante. Foi utilizada pela primeira vez por Homero, na *Ilíada*, um dos maiores épicos da Grécia antiga. O termo foi também citado pelo poeta Píndaro (522?-443? a.C.), pelo dramaturgo Aeschylus (525-456 a.C.) e pelo filósofo Platão (427?-347? a.C) (Brenner, 1999). Além disto, a asma já teria sido descrita no livro médico “A Teoria do Interior do Corpo”, conhecido como *Nei Ching*, considerado o livro mais antigo de Medicina Interna, escrito por Huang-Ti, "o Imperador Amarelo"(2698-2598 a.C.). Neste livro era descrito o efeito terapêutico da planta Ma Huang (*Ephedra sinica*), a qual no século XX passou a ser utilizada para a extração de efedrina (Saavedra-Delgado e Cohen, 1991).

Os papiros de Ebers (Figura 1), descobertos em Luxor no ano de 1873 pelo egiptólogo alemão George Moritz Ebers (1837-1898), constituem o mais antigo compêndio médico conhecido do Egito antigo. Neste livro, existem algumas referências às crises de asma, cujo tratamento consistia na utilização de fezes de animais, como as de crocodilo e as de camelo, associados a ervas como a cebola, o zimbro, o sicômoro e o meindro, ricos em uma substância anticolinérgica, a escopolamina. O vinho, a cerveja e a gordura de ganso freqüentemente eram utilizados como veículos para estas preparações. Na época os tais preparados eram colocados sobre tijolos aquecidos, sendo os vapores inalados (Sakula, 1988; Cohen, 1992).



Figura 1. O Papiro Ebers, um manuscrito adquirido em 1873 na cidade de Luxor pelo egiptologista alemão Georg Ebers (1837–1898). Este papiro possui 20 metros de folhas, 110 colunas e 2289 linhas, que se conserva na Biblioteca da Universidade de Leipzig (Alemanha). O texto é datado no verso pelo nono ano do reinado de Amenhotep I (1534 a.C.)

Hipócrates (460–377 a.C.) utilizou a palavra asma no plural. No livro "Dos ares, das águas e dos lugares", no capítulo sobre climas (II,12) menciona que nas cidades expostas aos ventos quentes "as crianças são atacadas de convulsões, de asmas...". Também no capítulo III.22 refere que diversas doenças são mais freqüentes no outono, dentre as quais cita "as asmas". Hipócrates foi, assim, o primeiro a assinalar o vínculo entre a asma e as condições ambientais (Keeney, 1964; Sangiorgi, 1966; Marketos e Ballas, 1982).

Celsus (séc. I d.C.), em seu tratado de medicina, livro IV.8 escreveu: "Há uma doença que entre os gregos recebe diferentes nomes conforme a sua intensidade. Consiste em dificuldade de respirar; quando moderada e sem sufocação é chamada dispnéia; quando mais acentuada, de modo que o paciente respira com ruído e esforço, asma, e quando a respiração só é possível na posição ereta, é chamada de ortopnéia" (Cohen, 1992).

Aretaeus, no séc. II d.C., descreveu a asma como dispnéia de esforço: "A dificuldade de respiração que se manifesta quando o paciente corre, faz exercícios ou executa qualquer outro trabalho é chamada de asma; a doença chamada ortopnéia é também chamada asma". Em sua descrição clínica da asma registrou o aparecimento de ruídos no tórax (estertores e sibilos) (Major, 1954).

Ainda que não desprezada ao longo do tempo, apenas no século XVII é feita a sua descrição patogênica por van Helmont (1577-1644), publicandose, nessa altura, o primeiro livro especificamente sobre a doença. Em citações antigas, a asma surge descrita como oriunda de “alterações humorais” e no século XIX Trousseau e Mackensie já demonstravam a importância do surgimento das crises em relação com fatores psicogênicos ou com uma representação simbólica dos alérgenos.

A investigação nas áreas patogênica e terapêutica, já no decorrer do século passado, conduziu a conceitos que, de uma forma impulsionadora, possibilitaram inegáveis benefícios para o conhecimento e controle da doença nos pacientes asmáticos. Ainda que não seja possível admitir a cura, para muitos deles é possível assegurar a ausência de sintomas ou o seu controle, majoritariamente recorrendo a esquemas terapêuticos cada vez mais efetivos.

A partir do momento em que os países mais desenvolvidos notaram que as causas principais de mortalidade e morbidade deixaram de ser as doenças infecciosas para passarem a ser as comportamentais, surgiu uma clara evidência de que os modelos de saúde necessitam de revisão urgente; também em relação às doenças respiratórias. Nomeadamente em relação à asma, isso não foi exceção.

O conceito moderno de asma brônquica atribui um papel fundamental à inflamação das vias aéreas; o reconhecimento desta natureza não é, porém, recente e já William Osler, em 1892, se referia à asma como “uma forma especial de inflamação das pequenas vias aéreas”. Em 1906, Ellis definia como sendo característico do ponto de vista anatomo-patológico a “obstrução do *lúmen* brônquico, a descamação epitelial e o infiltrado eosinofílico” .

Definição

A definição mais recente da asma é de 2008, realizada pela *Global Initiative National of Asthma* (GINA):

“A asma é uma desordem crônica inflamatória de vias aéreas onde diversas células e elementos celulares desempenham um papel. A inflamação crônica está associada à hiperresponsividade das vias aéreas que tem como consequência, episódios recorrentes de sibilos, dispnéia, tiragem intercostal e tosse, particularmente à noite e início da manhã. Esses episódios estão normalmente associados à obstrução variável ao fluxo que é normalmente reversível espontaneamente ou com tratamento”.

Aspectos epidemiológicos

Estudos revelam que apesar dos avanços, a morbidade e a mortalidade por asma têm aumentado (Lugogo e Kraft, 2006; Gina, 2008). A asma é um problema mundial, estimando-se em 300 milhões o número de pacientes acometidos pela doença. Na segunda metade do século XX, no ocidente, a asma foi a única doença crônica tratável que aumentou em prevalência e em número de internações (Platts-Mills e Wheatley, 1996). A asma é um problema de saúde mundial que acomete pessoas de todas as idades, principalmente crianças, que são afetadas por essa doença pulmonar crônica que pode levar a limitações significativas na qualidade de vida e na mortalidade, sendo responsável por uma a cada 250 mortes no mundo (GINA, 2008).

A prevalência vem aumentando, variando de 1% a 18% da população geral em diferentes continentes, com variações conforme a região e o país (Figura 2). Estima-se que 300 milhões de indivíduos sofrem de asma no mundo (Gina, 2008), sendo que em 2005 nos EUA, dados do NCHS (*National Center for Health Statistics E-Stats – Division of Data Services do Centers for Disease Control and Prevention- CDC*) estimavam em 22,2 milhões (7,7% da população) o número de pacientes com asma. Isto representa 15,7 milhões de adultos (7,2% dos adultos) e 6,5 milhões de crianças (8,9% das crianças).

Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revisados em 2008, 100 a 150 milhões de pessoas têm diagnóstico de asma brônquica e 180.000 pessoas falecem por ano desta doença no mundo. Além disso, acredita-se que haverá um aumento de 100 milhões de pessoas com asma até o ano de 2025, fato este decorrente de mudanças de estilo de vida e do aumento da população urbana (45 a 59% até 2025).

Sua prevalência mundial já foi estudada por meio da aplicação de um questionário denominado ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Children*). Participaram deste estudo vários centros de pesquisa em todos os continentes. Na faixa etária de 13 a 14 anos foram entrevistados aproximadamente 366.000 estudantes em 119 centros em 45 países. Já na faixa entre 6 a 7 anos, foram aproximadamente 209.000 estudantes provenientes de 74 centros em 34 países. No Brasil a pesquisa foi realizada em sete diferentes centros, sendo que as maiores taxas foram encontradas nas cidades de Recife e Porto Alegre (Sole, Yamada *et al.*, 2001). A partir deste estudo, o Brasil seria o oitavo país do mundo no que diz respeito à quantidade de pessoas que apresentam sinais e sintomas de asma (Sole, Yamada *et al.*, 2001).

Solé *et al* (2007) observaram que há uma tendência maior de sintomas relatados de asma em adolescentes que vivem em áreas urbanas como Caruaru e Santa Maria. Seus resultados confirmam que morar na área

rural está associado a uma diminuição da prevalência dos sintomas em crianças.

Toyoshima *et al* (2005) realizaram um estudo no município de São Paulo e demonstraram que a taxa de internação por asma se manteve constante no período entre 1995 e 2000. Neste período, a asma representou a segunda causa de internação por doenças respiratórias no município de São Paulo, acometendo indivíduos de ambos os sexos e todas as faixas etárias(Toyoshima, Ito *et al.*, 2005).

A prevalência de asma na América do Sul, geralmente está acima da média em relação a vários países (Gina, 2008). Os dados da OMS revisados em 2000- mostram que nos países em desenvolvimento como o Brasil, Costa Rica, Panamá, Peru e Uruguai, 20 a 30% das crianças apresentam sintomas característicos da asma brônquica.

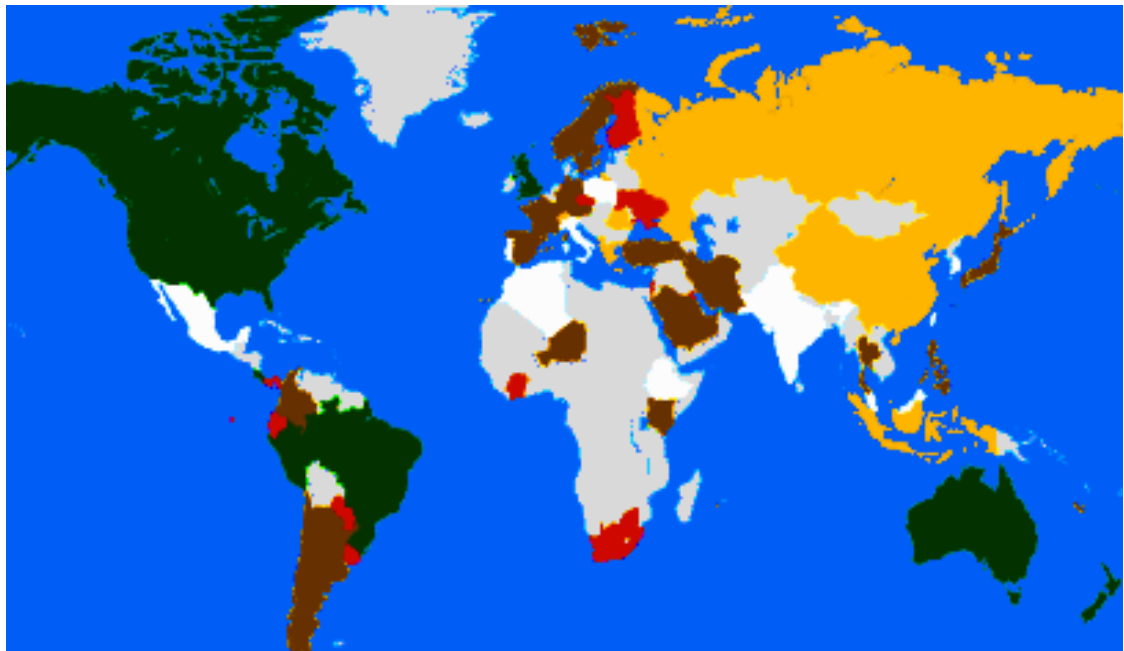
No Brasil, embora a mortalidade pareça estar estabilizada (Hunt, Silverstein *et al.*, 1993; Rio, Gallo *et al.*, 2002), as crises asmáticas ainda foram responsáveis por 6,5% das mortes que ocorreram por doenças respiratórias, apresentando uma maior incidência de óbitos em adultos jovens.

Considerando as estatísticas do DATASUS, no período de janeiro de 2008 a fevereiro de 2009, foram internadas 230.256 pessoas, sendo 43,30%

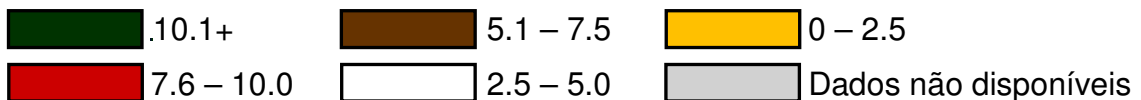
no nordeste, 23,45% no sudeste, 15,78% no sul, 9,32% no norte e 8,15% no centro-oeste. Além disso, neste mesmo período 928 pessoas morreram em decorrência das crises asmáticas, sendo 37,18% no sudeste, 34,27% no nordeste, 17,89% no sul, 7,11% no centro-oeste e 3,55% no norte. Cabe ressaltar ainda que, neste período, foram gastos R\$110.115.147,31 no tratamento desses pacientes.

A asma representa um sério problema de saúde mundial, já que em vários países existe um percentual significativo de pacientes asmáticos, com manifestações variadas, desde um quadro clínico de leve a grave, sendo que o cuidado, especialmente aos pacientes graves, se associa a significativas repercussões pessoais, sociais e econômicas(Gina, 2008). Considerando o impacto econômico cabe ressaltar os gastos com medicamentos e hospitalizações(Sullivan e Weiss, 2001). No Brasil apenas no ano de 2007, foi registrado um gasto de aproximadamente 99 milhões de reais com internações e medicações para a doença.

Por estes motivos, a asma brônquica é considerada atualmente um problema de saúde pública que gera alto custo com medicações e internações de pacientes. Além disso, como a incidência é alta, particularmente em faixas etárias economicamente ativas, o impacto sócio-econômico é grande em todas as comunidades ao redor do mundo.



Porcentagem da população afetada



Scotland	18.4	Ivory Coast	7.8	Oman	4.5
Jersey	17.6	Colombia	7.4	Pakistan	4.3
Guernsey	17.5	Turkey	7.4	Tunisia	4.3
Wales	16.8	Lebanon	7.2	Cape Verde	4.2
Isle of Man	16.7	Kenya	7.0	Latvia	4.2
England	15.3	Germany	6.9	Poland	4.1
New Zealand	15.1	France	6.8	Algeria	3.9
Australia	14.7	Norway	6.8	South Korea	3.9
Republic of Ireland	14.6	Japan	6.7	Bangladesh	3.8
Canada	14.1	Sweden	6.5	Morocco	3.8
Peru	13.0	Thailand	6.5	Occupied Territory of Palestine	3.6
Trinidad & Tobago	12.6	Hong Kong	6.2	Mexico	3.3
Costa Rica	11.9	Philippines	6.2	Ethiopia	3.1
Brazil	11.4	United Arab Emirates	6.2	Denmark	3.0
United States of America	10.9	Belgium	6.0	India	3.0
Fiji	10.5	Austria	5.8	Taiwan	2.6
Paraguay	9.7	Spain	5.7	Cyprus	2.4
Uruguay	9.5	Saudi Arabia	5.6	Switzerland	2.3
Israel	9.0	Argentina	5.5	Russia	2.2
Barbados	8.9	Iran	5.5	China	2.1
Panama	8.8	Estonia	5.4	Greece	1.9
Kuwait	8.5	Nigeria	5.4	Georgia	1.8
Ukraine	8.3	Chile	5.1	Nepal	1.5
Ecuador	8.2	Singapore	4.9	Romania	1.5
South Africa	8.1	Malaysia	4.8	Albania	1.3
Czech Republic	8.0	Portugal	4.8	Indonesia	1.1
Finland	8.0	Uzbekistan	4.6	Macau	0.7
Malta	8.0	FYR Macedonia	4.5		
		Italy	4.5		

Figura 2: Mapa mundial de prevalência na asma. Observe que o Brasil encontra-se entre os 15 países de maior prevalência de asma no mundo. Fonte: modificado de GINA, 2008.

Classificação e Diagnóstico

Segundo o último consenso realizado pelo GINA em 2008, a asma deve ser classificada, baseada no grau de gravidade, na intensidade de sinais e sintomas decorrentes da limitação ao fluxo aéreo, quantificados por testes espirométricos, em 4 diferentes estágios, quais sejam: leve intermitente, leve persistente, moderada persistente ou grave persistente (vide tabela 1). Atualmente a classificação da asma também considera se o paciente ainda não recebeu tratamento específico ou se já está em tratamento. Como a história e o exame clínico não são sempre suficientes para excluir outras possibilidades diagnósticas, a espirometria é de fundamental importância na definição do diagnóstico (Gina, 2008).

Considerando que o paciente já se encontre em tratamento, os asmáticos podem ser considerados como controlados, parcialmente controlados ou não controlados (vide tabela 2).

Os pacientes asmáticos apresentam uma redução do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) e da relação VEF_1/CVF (capacidade vital forçada), elevação da capacidade residual funcional e do volume residual ou de ambos (Mcfadden e Gilbert, 1992). Persistindo a suspeita de asma e normalidade dos parâmetros espirométricos, é indicada a realização do teste de broncoprovocação com agonistas broncoconstritores, como a metacolina ou histamina. Os principais sinais e sintomas são episódios de tosse, principalmente noturna ou pela manhã,

dispnéia e tiragem intercostal, que normalmente são reversíveis com broncodilatadores e são associados à obstrução do fluxo aéreo (Wardlaw, Brightling *et al.*, 2002).

TABELA 1: Sinais clínicos e funcionais de gravidade da asma

GRAVIDADE	SINTOMAS	SINTOMAS NOTURNOS	FUNÇÃO PULMONAR
INTERMITENTE	Sintomas menos que 1x/semana Assintomático e PEF normal entre exacerbações	Até 2 vezes por mês	VEF ₁ ou PFE ≥ 80% do predito Variabilidade PFE ou VEF ₁ menor que 20% do predito
PERSISTENTE LEVE	Sintomas > 1x/semana e menos do que 1x/dia	Mais que 2 vezes por mês Exacerbações podem afetar as atividades e o sono	VEF ₁ ou PFE ≥ 80% do predito Variabilidade PFE ou VEF ₁ entre 20 e 30% do predito
PERSISTENTE MODERADA	Sintomas diários Uso diário de beta 2-agonistas	Mais do que 1 vez por semana Exacerbações podem afetar as atividades e o sono	VEF ₁ ou PFE entre 60% e 80% do predito Variabilidade de VEF ₁ ou PFE > 30% do predito
PERSISTENTE GRAVE	Sintomas contínuos Atividade limitada Exacerbações freqüentes Limitação para atividade física e	Freqüentes exacerbações	VEF ₁ ou PFE ≤ 60% do predito Variabilidade PFE ou VFE ₁ > 30% do predito

VEF₁ – volume expiratório forçado no primeiro segundo; PFE – pico de fluxo expiratório.

Adaptado-GINA, 2008

Tabela 2- Níveis de controle do paciente com asma.

Parâmetro	Controlado (todos presentes)	Parcialmente controlado (Pelo menos 1 em qualquer semana)	Não controlado
Sintomas diurnos	Nenhum (ou menos do que 2 por semana)	Mais do que 2 por semana	3 ou mais parâmetros do parcialmente controlado presentes em qualquer semana
Despertares noturnos	Nenhum	Pelo menos 1	
Necessidade de medicações de resgate	Nenhuma	2 ou mais por semana	
Limitação de atividades	Nenhuma	Presente em qualquer momento	
PFE ou VEF1	Normal ou próximo do normal	< 80% predito ou do melhor individual, se conhecido	
Exacerbação	Nenhuma	1 ou mais por ano	1 em qualquer semana

Adaptado da revisão do GINA, 2008

*A ocorrência de uma exacerbação deve levar a uma revisão do tratamento de manutenção para assegurar que o mesmo é adequado.

Fatores de Risco

A etiologia da asma é multifatorial. Diversos estímulos podem desencadear a hiperresponsividade observada na asma brônquica, entre eles, diferentes alérgenos, drogas, poluentes atmosféricos, alterações ambientais e meteorológicas, infecções, estímulos ocupacionais, irritantes químicos, exercício, aditivos em alimentos e, mais recentemente, tem-se evidenciado o estresse como desencadeador da crise asmática.

Há fatores que podem gerar o desenvolvimento da inflamação presente na asma, os que desencadeiam os sintomas e os que estão relacionados às duas situações. O primeiro caso inclui fatores

predisponentes (principalmente genéticos) e no segundo caso, existe uma estreita relação com fatores ambientais, entre eles, alérgenos, drogas, poluentes atmosféricos, alterações ambientais e meteorológicas, infecções, estímulos ocupacionais, irritantes químicos, exercício, aditivos em alimentos e o estresse, como desencadeadores da crise asmática (Cabral, Conceicao *et al.*, 1999; Von Mutius, 2000; Gina, 2008). Entretanto, os mecanismos que influenciam o desenvolvimento e a expressão da asma são extremamente complexos e interativos.

A predisposição genética tem sido enfatizada como fator principal para o desenvolvimento da resposta mediada por imunoglobulina E (IgE) a alérgenos inalatórios comuns, visto que várias pessoas são expostas a substâncias semelhantes e nem todas desenvolvem a asma brônquica, ou ainda, que tempos diferentes de exposição ao antígeno são necessários para que ocorra o desencadeamento da doença; (NIH, 1997; (De Sanctis, Maclean *et al.*, 1999; Gao, Kawada *et al.*, 2000; Gina, 2008).

A atopia e a hiperresponsividade são também importantes fatores para o desenvolvimento da asma, sendo que não precisam, necessariamente, estarem presentes em todos os pacientes asmáticos. Neste aspecto, McFadden e Gilbert (1992) mostraram que mesmo não sendo atópicos e estando assintomáticos, pode-se detectar processo inflamatório ao redor das vias aéreas nestes pacientes. Em contato com alérgenos comuns, indivíduos atópicos são capazes de desencadear uma

produção de grande quantidade de anticorpos tipo IgE específicos, que podem ser detectados no soro ou por meio de testes cutâneos para uma série de alérgenos (Pearce, Pekkanen *et al.*, 1999; Gina, 2008).

Fisiopatologia

A inflamação brônquica constitui o mais importante fator fisiopatogênico da asma. É resultante de interações complexas entre células inflamatórias, mediadores e células estruturais das vias aéreas (Djukanovic, Roche *et al.*, 1990; Djukanovic, Wilson *et al.*, 1990; Barnes, 1997; Kumar, 2001; Bergeron e Boulet, 2006). Está presente em pacientes com asma de início recente ou com formas leves da doença e mesmo entre os assintomáticos (Vignola, Chanez *et al.*, 1998; Louis, Lau *et al.*, 2000).

A resposta inflamatória tem características especiais que incluem infiltração eosinofílica, desgranulação de mastócitos, lesão intersticial das paredes das vias aéreas e ativação de linfócitos Th2 que produzem citocinas, como as interleucinas IL-4, IL-5, IL-13, entre outras, responsáveis pelo início e manutenção do processo inflamatório. A IL-4 tem papel importante no aumento tanto da produção de IgE específica como da expressão de receptores de alta e baixa afinidade à IgE por muitas células inflamatórias (Bousquet, Chanez *et al.*, 1990; Robinson, Hamid *et al.*, 1992).

Vários mediadores/moduladores inflamatórios são liberados pelos mastócitos brônquicos (histamina, leucotrienos, triptase e prostaglandinas), pelos macrófagos (fator de necrose tumoral – TNF α , IL-6, óxido nítrico), pelos linfócitos T (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, fator alfa de crescimento de colônia de granulócitos (GM-CSF), pelos eosinófilos (MBP, ECP, EPO, mediadores lipídicos e citocinas), pelos neutrófilos (elastase) e pelas células epiteliais (endotelina-1, mediadores lipídicos, óxido nítrico).

A liberação destas diferentes substâncias durante o processo inflamatório causa lesões e alterações na integridade epitelial, anormalidades no controle neural autonômico (substância P, neurocinina A) e no tônus da via aérea, alterações na permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso da via aérea (Holgate, 2000; Kumar, 2001; Bergeron e Boulet, 2006).

Esses mediadores podem ainda atingir o epitélio ciliado, causando-lhe dano e ruptura. Como consequência, células epiteliais e miofibroblastos, presentes abaixo do epitélio, proliferam e iniciam o depósito intersticial de colágeno e fibras elásticas na lâmina reticular da membrana basal, o que explica o seu aparente espessamento. Outras alterações, incluindo hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, elevação no número de células caliciformes, aumento das glândulas submucosas e alteração no depósito/degradação dos componentes da matriz extracelular, são

constituintes do remodelamento que interferem na arquitetura pulmonar e conseqüentemente para a irreversibilidade das alterações morfofuncionais que podem ocorrer em alguns pacientes asmáticos (Kumar, 2001).

Óxido Nítrico

Entre os diversos mediadores que estão envolvidos na fisiopatologia da asma brônquica, pode-se destacar óxido nítrico (NO). Trata-se de uma molécula extremamente lábil, de meia vida de aproximadamente 1-5 segundos (Palmer, Ferrige *et al.*, 1987). Era conhecido como um fator poluente oriundo da fumaça do cigarro, mas a partir da década de 80 foi descoberto como sendo um fator relaxante dependente do endotélio (Furchgott e Zawadzki, 1980; Palmer, Ferrige *et al.*, 1987).

A produção de NO ocorre quando um grupo molecular guanidino de aminoácido L-arginina é quebrado, através de oxidação enzimática (Moncada, Palmer *et al.*, 1989; Tayeh e Marletta, 1989; Michel e Feron, 1997; Ignarro, 2002), gerando NO e L-citrulina e não D-arginina (Culotta e Koshland, 1992; Moncada, 1993). A L-arginina é transportada para dentro das células via sistema de transporte aminoácido catiônico e pode ser metabolizada por dois grupos distintos de enzimas, sendo as óxido nítrico sintases (NOS) e a arginase. As óxido nítrico sintases convertem a L-arginina em óxido nítrico e L-citrulina utilizando a NG-hidroxil-L-arginina como intermediário, que por sua vez diminui a atividade da arginase. As

isoformas óxido nítrico sintases constitutivas são ativadas pelo aumento intracelular de cálcio.

Por outro lado, o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e algumas citocinas podem ampliar tanto o transporte de L-arginina, aumentando, assim, a produção de NO via óxido nítrico sintase induzida (iNOS), quanto a atividade da arginase. Existem três tipos de isoformas da enzima NOS sendo duas constitutivas (nNOS e eNOS) e uma induzida (iNOS). As constitutivas, presentes no endotélio (eNOS) e nos tecidos nervosos (nNOS), estão presentes normalmente em situações fisiológicas, são cálcio dependentes e capazes de produzir quantidades picomolares de NO (Lacza, Snipes *et al.*, 2003; Mathewson e Wadsworth, 2004).

A iNOS pode ser encontrada em uma grande variedade de tecidos, principalmente em situações patológicas. Pode ser estimulada pelo LPS ou por diversas citocinas tal como a IL-1, o fator de necrose tumoral (TNF) e o interferon γ (IFN- γ). Apresenta também função no controle da infecção, e quando liberada pelos macrófagos parece ser citotóxicos para células tumorais (Robbins e Grisham, 1997).

A quantidade de NO exalado (NOex) tem sido considerada como um marcador da atividade inflamatória na asma. Detectou-se aumento de mais de 160% na quantidade de NOex em asmáticos que apresentaram resposta tardia (Belvisi, Barnes *et al.*, 1995; Deykin, Halpern *et al.*, 1998).

A utilização de inibidores sintéticos da enzima NOS pode reduzir a produção de NO. A hidroxicoalamina é considerada como a mais seletiva inibidora de eNOS, o L-NAPNA a de nNOS, e o L-NAME como a de iNOS. Utilizando cobaias com inflamação crônica de vias aéreas induzida por múltiplas exposições ao aerossol de ovoalbumina e tratadas com dose única de L-NAME, estudos demonstraram que o NO tem um importante papel broncodilatador atuando em maior intensidade no componente distal das vias aéreas (Prado, Leick-Maldonado, Kasahara *et al.*, 2005).

Recentemente demonstramos que ocorre um aumento da expressão de iNOS em células inflamatórias em modelo experimental de inflamação crônica de vias aéreas (Prado, Leick-Maldonado, Arata *et al.*, 2005). Além disto, foi possível caracterizar uma importante participação do NO como modulador das respostas de mecânica pulmonar e inflamatória neste modelo experimental. O NO derivado de cNOS e iNOS atua como broncodilatador fisiológico de vias aéreas proximais. Além disso, observamos que o NO derivado de cNOS atua como broncodilatador pós desafio antigênico, vasodilatador e protetor do processo de remodelamento, particularmente da deposição de fibras colágenas na parede das vias aéreas de animais sensibilizados. Por outro lado, o NO oriundo da ativação de iNOS tem papel broncoconstritor, pró-inflamatório e contribui com a deposição de fibras colágenas e elásticas na parede das vias aéreas (Prado, Leick-Maldonado, Arata *et al.*, 2005; Prado, Leick-Maldonado *et al.*, 2006).

O papel do parênquima na fisiopatogenia da asma

Atualmente é possível a mensuração e avaliação da fisiologia pulmonar devido ao desenvolvimento de novas tecnologias, sendo possível demonstrar que a porção distal do pulmão contribui para a obstrução do fluxo aéreo em pacientes asmáticos (Yanai, Sekizawa *et al.*, 1992; Wagner, Bleecker *et al.*, 1998). Considerava-se que esta região, antes conhecida como “zona silenciosa”, contribuiria somente com 10% do valor total de resistência ao fluxo aéreo pulmonar. Além disso, as novas tecnologias permitiram demonstrar que há alterações estruturais e inflamatórias no parênquima pulmonar distal que são similares às observadas nas vias aéreas de indivíduos asmáticos (Minshall, Hogg *et al.*, 1998; Lancas, Kasahara *et al.*, 2006).

É importante considerar que o volume total e a área de superfície das vias aéreas distais são muito maiores que o volume e a área de superfície das grandes vias aéreas, sugerindo que o desenvolvimento de qualquer alteração no pulmão distal em pacientes asmáticos tem um efeito mais dramático sobre a patogênese e o tratamento da doença (Tulic e Hamid, 2003).

Desta forma, tem sido proposto que a periferia pulmonar, considerada como as vias aéreas de calibre menor ou igual a dois milímetros de diâmetro e o parênquima pulmonar adjacente, pode ter um papel fundamental na

resistência pulmonar total. Sendo assim, este fato suscita a importância do parênquima pulmonar na fisiopatologia da asma, o que provavelmente altera o conceito e, principalmente, a forma de pensar o tratamento da doença (Bachofen, 1968). Além disto, estes fatos alertam para a possibilidade de um tratamento paralelo da doença, uma vez que os esteróides inalatórios mais usados atualmente apresentam sua deposição principalmente nas vias aéreas centrais e não na periferia pulmonar (Tulic e Hamid, 2003). Considerando estes fatos, um dos desafios terapêuticos em asma tem sido desenvolver novas tecnologias e drogas que permitam uma melhor oferta de agentes inflamatórios à porção distal do pulmão.

(Carroll, Cooke *et al.*, 1997) demonstraram que o aumento no número de linfócitos e eosinófilos era uniformemente distribuído ao longo das vias aéreas proximais e distais em pacientes com asma grave e moderada comparativamente aos indivíduos controle. Neste sentido, alguns autores já demonstraram aumento no número de células T (CD3), eosinófilos totais, eosinófilos ativados, assim como aumento na expressão de mRNA positivo para IL-5 e IL-4 nas vias aéreas distais de pulmões ressecados de indivíduos asmáticos comparativamente aos indivíduos normais (Hamid, 1997; Minshall, Hogg *et al.*, 1998). (Kraft, Djukanovic *et al.*, 1996) também mostraram inflamação alveolar em pacientes com asma noturna, o que não ocorre nos indivíduos que apresentam asma não noturna.

Neste sentido, (Haley, Sunday *et al.*, 1998) avaliaram a distribuição de células CD45+ dentro de regiões subepiteliais da parede de vias aéreas. Os autores mostraram que, nas vias aéreas distais de asmáticos, a maioria dos leucócitos CD45+ e eosinófilos estão na região externa à parede da via aérea (definida como a área entre o músculo liso e o alvéolo). No entanto, nas grandes vias aéreas dos mesmos indivíduos a maior parte destas células se encontra no interior da parede da via aérea (definida como área entre a membrana basal e o músculo liso). A diferente organização das células inflamatórias na árvore traqueobrônquica pode ser atribuída às diferenças nos mecanismos de recrutamento de células inflamatórias ou às diferenças na produção de citocinas e quimiocinas entre estas regiões. Estas diferenças podem influenciar a resposta fisiológica causada pela produção local de mediadores inflamatórios (Haley, Sunday *et al.*, 1998).

Vale ressaltar, que os indivíduos asmáticos com espirometria normal podem apresentar um aumento da resistência das vias aéreas distais em até sete vezes quando comparados aos indivíduos normais (Wagner, Liu *et al.*, 1990).

Em modelos experimentais de inflamação alérgica crônica pulmonar, Lanças *et al.* (2006) observaram aumento no número de eosinófilos e na responsividade do tecido pulmonar, observada através de curva dose resposta específica (com ovoalbumina) e inespecífica (com metacolina) em

sistema de mecânica oscilatória, utilizando fatias de tecido pulmonar periférico de cobaias sensibilizadas à ovoalbumina.

Considerando o remodelamento pulmonar, Xisto et al. (2005) demonstraram um aumento do conteúdo de colágeno e de actina em fatias de tecido pulmonar periférico em modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica em ratos. Estas alterações apresentaram uma correlação positiva com o aumento da resistência e elâstancia, evidenciando que a inflamação, as alterações mecânicas, assim como o remodelamento não ocorrem apenas nas vias aéreas, mas também no parênquima pulmonar, levando as mudanças mecânicas *in vivo* e *in vitro*.

Mecânica oscilatória de tecido pulmonar periférico

Atualmente vários estudos têm utilizado fatias de tecido pulmonar periférico para avaliação do papel do parênquima na inflamação pulmonar obstrutiva crônica (Xisto, Farias *et al.*, 2005; Lancas, Kasahara *et al.*, 2006; Angeli, Prado *et al.*, 2008). Fatias de tecido pulmonar (“*strips*”) analisadas por meio de mecânica oscilatória têm sido utilizadas como instrumento capaz de elucidar as propriedades mecânicas e farmacológicas da periferia do pulmão. Neste sentido, pesquisadores realizaram vários estudos utilizando esta técnica e demonstraram que o fragmento pulmonar periférico seria um modelo ideal para o estudo das propriedades reais da mecânica pulmonar, uma vez que as vias mais proximais podem sofrer maior influência

da parede brônquica na determinação da resposta mecânica (Salerno, Dallaire *et al.*, 1995; Salerno, Pare *et al.*, 1998).

Modelo experimental de inflamação crônica pulmonar:

Os modelos experimentais contribuem com importantes informações a respeito da fisiopatologia da asma e com a elaboração de novas estratégias terapêuticas. Estes modelos são capazes de reproduzir tanto a resposta aguda quanto a resposta tardia da inflamação das vias aéreas características da asma. Acreditamos que a exposição múltipla a inalações com antígenos é provavelmente o método mais adequado para o estudo da fisiopatologia da asma, por se aproximar do mecanismo principal de sensibilização que ocorre em pacientes asmáticos (Kips, Cuvelier *et al.*, 1992; Warth Mdo, Maldonado *et al.*, 1995; Tiberio, Turco *et al.*, 1997; Kips, Anderson *et al.*, 2003).

Tibério *et al.* (1997) determinaram em cobaias, os efeitos da inflamação de vias aéreas induzidas por exposições inalatórias repetidas de ovoalbumina, onde os valores máximos de resistência e elastância do sistema respiratório foram significativamente maiores nas cobaias submetidas a exposições repetidas ao antígeno do que nos animais inalados com solução salina. Também foi observado um aumento significativo de linfócitos CD4+ e de eosinófilos, tanto no lavado broncoalveolar como na parede de vias aéreas nas cobaias tratadas com ovoalbumina.

Além disto, neste modelo foi possível também caracterizar um aumento do número de células iNOS e nNOS positivas, do remodelamento da matriz extracelular, da expressão de isoprostano PGF-2 α e das citocinas inflamatórias na parede de vias aéreas e no parênquima pulmonar distal nas cobaias tratadas com ovoalbumina (Angeli, Prado *et al.*, 2008; Nakashima, Prado *et al.*, 2008; Starling, Prado *et al.*, 2009). Estes resultados sugerem que o modelo de exposições múltiplas a aerossóis de ovoalbumina reproduz algumas das principais características morfofuncionais encontradas em pacientes asmáticos.

Estresse

Atualmente a palavra estresse tem sido muito empregada associada a sensações de desconforto, sendo cada vez maior o número de indivíduos que se definem como estressados (Stacciarini e Troccoli, 2001). Sinha (2001) postulou que a dificuldade de conceituar o termo estresse deve-se ao fato de que este não se trata de uma reação única, mas um processo que envolve múltiplos aspectos. Dentre estes podemos citar a percepção do evento estressor, a sua avaliação cognitiva e afetiva, o desenvolvimento de estratégias para o seu enfrentamento e a apresentação de respostas biológicas comportamentais e cognitivas que visam manutenção do equilíbrio, ou seja, manutenção da homeostase. As respostas adaptativas com o objetivo de restabelecer a homeostase podem ser inadequadas, excessivas ou prolongadas e, em qualquer destes casos, um estado de

equilíbrio saudável não é alcançado podendo resultar em uma doença (Chrousos e Gold, 1998).

As primeiras referências à palavra estresse, com significado de "aflição" e "adversidade", datam do século XIV. No século XVII, o vocábulo de origem latina passou a ser utilizado em inglês para designar "opressão", "desconforto" e "adversidade" (Spielberger, O'neil *et al.*, 1972). Hans Selye, médico endocrinologista, foi o primeiro cientista a utilizar o termo estresse na área da saúde. Este observou que muitas pessoas, provavelmente desde a pré-história, sofriam de doenças físicas e reclamavam de sintomas comuns. Tais observações o levaram às investigações científicas em laboratórios, com animais, e em 1936, a definir estresse como "o resultado inespecífico de qualquer demanda sobre o corpo, seja de efeito mental ou somático, e estressor, como todo agente ou demanda que evoca reação de estresse, seja de natureza física, mental ou emocional".

Selye observou ainda que o estresse produzia reações de defesa e adaptação frente ao agente estressor e, a partir dessas observações, o autor descreveu a Síndrome Geral de Adaptação (SAG), que pode ser entendida como "o conjunto de todas as reações gerais do organismo que acompanham a exposição prolongada do estressor". Tal síndrome apresenta três fases ou estágios (Selye, 1956b; a; d; c):

1ª - **Fase de Alarme:** O organismo tem uma excitação de agressão ou de fuga ao estressor, que pode ser entendida como um comportamento de adaptação. Nos dois casos, reconhece-se uma situação de reação saudável ao estresse, porquanto possibilita o retorno à situação de equilíbrio após a experiência estressante. Essa fase é caracterizada por alguns sintomas: taquicardia, dor de cabeça, sensação de esgotamento, hipocloremia, pressão no peito, extremidades frias, dentre outros.

2ª - **Fase de Resistência:** Havendo persistência da fase de alerta, o organismo altera seus parâmetros de normalidade e concentra a reação interna em um determinado órgão-alvo, desencadeando a Síndrome de Adaptação Local (SAL). Nessa fase, ocorre a manifestação de sintomas da esfera psico-social, como ansiedade, medo, isolamento social, roer unhas, oscilação do apetite, impotência sexual e outros.

3ª - **Fase de Exaustão:** O organismo encontra-se extenuado pelo excesso de atividades e pelo alto consumo de energia. Ocorre, então, a falência do órgão mobilizado durante a síndrome de adaptação local, o que se manifesta sob a forma de doenças orgânicas.

Os agentes estressores funcionam como estímulos que desencadeiam vários tipos de repostas biológicas, integrando os sistemas nervoso, endócrino e imunológico. Os principais componentes da resposta central ao estresse envolvidos na adaptação são: o hormônio liberador de

corticotropina, que é liberado pelo núcleo paraventricular do hipotálamo e a ativação noradrenérgica, envolvendo os neurônios do *Locus coeruleus* (LC), da ponte e da medula, conhecido como sistema LC/epinefrina (Sinha, 2001; Motzer e Hertig, 2004).

Os estudos do estresse em animais mostram-se úteis, pois, nem sempre, é possível submeter pacientes a um dado procedimento experimental, esta relevância é mantida mesmo se for considerado como certo o fato de não ser nenhum destes modelos capaz de mimetizar a totalidade da situação observada em seres humanos.

As características que validam a utilização de modelos animais, além da supracitada, segundo Katz et al. (1980) são:

1. Controle e possibilidade de manipulação da história genética;
2. Período de vida curto dos animais, o que permite um estudo através de gerações;
3. Manipulação e observação direta de estruturas cerebrais;
4. Controle total de diversas variáveis durante toda a vida do animal;
5. Custo baixo e menor tempo despendido.

Dois pontos importantes devem ser levantados quando se faz uso de modelos de estresse. Em primeiro lugar, é útil não classificar o estresse

como um estímulo ou uma resposta, mas sim como um processo, onde temos um estímulo aversivo (estressor) e uma resposta a esse estímulo.

Vários autores descrevem o estresse como “um processo complexo pelo qual um organismo reage a eventos ambientais internos ou externos ou eventos psicológicos que representam desafio ou perigo ao organismo”. Deve-se também considerar a complexidade e o tipo do estímulo estressor. Por exemplo, estímulos aversivos físicos como a aplicação de choque nas patas, a contenção, o frio, o ruído, serão considerados como estressantes independentemente do indivíduo a eles submetidos ou do observador (Pare e Glavin, 1986; Glavin, Pare *et al.*, 1994).

Contudo, quando o estímulo tem característica psicológica, torna-se difícil fazer esta afirmação visto que um mesmo estímulo pode ser considerado aversivo/estressante por alguns indivíduos, mas não para outros. Neste caso, a forma como o indivíduo avalia a situação, sendo esta dependente das experiências anteriormente vividas, será responsável ou não pela manifestação de uma resposta (Pare e Redei, 1993b).

Dentro dos vários modelos de estresse temos um grande número de respostas que podem ser observadas, sendo elas comportamentais ou fisiológicas. Entre as respostas comportamentais temos:

1. **Comportamento alimentar:** exposição a estresse agudo ou crônico leva à diminuição das atividades de comer e beber (Pare, 1964; Kennett, Dickinson *et al.*, 1985);

2. **Atividade exploratória:** o estresse inibe o comportamento exploratório no campo aberto (Katz e Hersh, 1981);

3. **Respostas aprendidas:** um som associado a choques nas patas será capaz de suprimir, em ratos privados de alimento, a ação de pressionar uma barra para a obtenção de comida (Annau e Kamin, 1961);

4. **Desamparo aprendido:** animais submetidos a estressores inescapáveis se tornam incapazes de aprender respostas de esquiva (Seligman e Maier, 1967).

Da mesma forma que um estressor altera o comportamento, este também causa alterações fisiológicas. Neste caso, quanto maior a intensidade do agente aversivo, maior será a alteração fisiológica observada:

1. **Peso corporal:** animais expostos a estresse, normalmente, demonstram perda de peso (Pare e Redei, 1993a; b);

2. Peso da adrenal e do timo: a relação peso da adrenal/peso corporal, normalmente, aumenta em animais expostos a estresse crônico (Pare, 1971).

3. O estresse também está relacionado com a atrofia do timo (Selye e Fortier, 1949);

4. Úlceras gástricas: lesões na porção glandular do estômago são relacionadas ao estresse, sendo que a gravidade desta pode ser medida tanto pelo número de ulcerações como por seu tamanho (Pare e Temple, 1973);

5. Secreção gástrica: devido a sua associação com as úlceras, a secreção de ácido do estômago tem sido utilizada como indicativo de estresse (Shay, 1954; Shay e Sun, 1954);

6. Corticosterona plasmática: a exposição a qualquer agente estressor resulta em aumento de corticosterona plasmática (Levine, Goldman *et al.*, 1972).

Por outro lado, quando estes estressores são utilizados cronicamente mecanismos de adaptação aos estímulos são necessários para a sobrevivência do organismo. A adaptação ao estresse crônico está associada a uma complexa cascata de eventos, tais como, liberação de

neurotransmissores (Kalen, Rosegren *et al.*, 1989), indução de expressão gênica (Stamp e Herbert, 2001), e diminuição da resposta do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), protegendo o organismo dos efeitos do hipercortisolismo (Armario, Marti *et al.*, 2004; Armario, Valles *et al.*, 2004). Porém, os mecanismos envolvidos na adaptação ao estresse diário são pouco compreendidos. Alguns trabalhos demonstraram que o feedback negativo de glicocorticóides participam da depressão na resposta do eixo HPA e da expressão gênica do hormônio liberador de corticotrofina (Cole, Kalman *et al.*, 2000) (Pinnock e Herbert, 2001).

As alterações de sensibilidade adrenérgica podem ocorrer por meio de vários mecanismos: alterações da atividade dos processos de recaptção neuronal e captação extraneuronal (Bassani e De Moraes, 1987; Spadari e De Moraes, 1988), modificações na estrutura dos receptores (Callia e De Moraes, 1984; Spadari e De Moraes, 1988); ou da densidade dos adrenoreceptores α e β (Mano, Akbarzadeh *et al.*, 1979; Flugge, 2000), ou mesmo indução de heterogeneidade da população de adrenoceptores β , os quais que medeiam as respostas às catecolaminas (Callia e De Moraes, 1984)(Callia, De Moraes, 1984; (Bassani e De Moraes, 1988).

Modelos Experimentais para Avaliação de Estresse

Na tentativa de compreender as alterações fisiológicas que ocorrem durante a reação de estresse, diferentes modelos experimentais têm sido

utilizados em estudos de laboratório, tais como imobilização (Capaz e De Moraes, 1988); (Capaz e De Moraes, 1988), choques nas patas (Bassani e De Moraes, 1988; Marcondes, Vanderlei *et al.*, 1996), exposição a frio (Harri, Melender *et al.*, 1974; Callia e De Moraes, 1984) e natação forçada (Moura e De Moraes, 1994; Tanno, Bianchi *et al.*, 2002). Os resultados destes estudos mostram diferentes efeitos do estresse sobre a liberação de catecolaminas, sendo tais efeitos dependentes da qualidade, intensidade e frequência do agente estressor.

A natação forçada, além do componente físico, apresenta forte componente emocional, relacionado à novidade que este estímulo representa para o animal de laboratório e à impossibilidade de fuga somada à iminência de morte (Ostman-Smith, 1979; Cox, Hubbard *et al.*, 1985; Garcia-Marquez e Armario, 1987).

Ao ser colocado na água pela primeira vez, o animal rapidamente passa a nadar em torno das bordas do tanque, aparentemente procurando escapar, comportamento este a que denominamos de “tentativa de fuga”. Depois de alguns minutos, seus movimentos passam a ser menos vigorosos e o animal passa a boiar, o maior tempo possível (Bruner e Vargas, 1994).

Bruner, Vargas (1994) mostraram que a atividade de animais durante a sessão de natação varia com a temperatura da água. A movimentação do animal na água parece estar correlacionada com as probabilidades de

sobrevivência. Assim sendo, a diminuição da atividade representaria uma resposta adaptativa. Estes autores observaram que a 25°C a taxa de atividade é maior do que a 39 °C. Desse modo, o nível de estresse parece ser menor a 39°C do que a 25°C.

Asma e estresse e neuroimunomodulação

Como detalhadamente descrito acima o estresse pode ser definido como a reação física e/ou psicológica do organismo a uma variedade de estímulos emocionais ou físicos que ameaçam a homeostase (Forsythe, Ebeling *et al.*, 2004). As crises de pânico e de agorafobia podem contribuir como desencadeantes para as crises de asma (Cowley e Roy-Byrne, 1987). De fato, as desordens de ansiedade são mais predominantes em asmáticos do que na população em geral (Yellowlees e Kalucy, 1990).

Os testes de personalidade que detectam níveis maiores de ansiedade, pânico e medo maiores em pacientes asmáticos são utilizados para confirmar este quadro (Neuhaus, 1958; Dirks, Fross *et al.*, 1977; Dirks, Jones *et al.*, 1977). Além disso, diversos estudos têm afirmado a possibilidade de indução da reação asmática, bem como o alívio de sintomas com placebos e falsos antígenos, demonstrando o importante papel da sugestão psicológica na reatividade asmática (Luparello, Mcfadden *et al.*, 1971).

A resposta inflamatória durante o estresse parece ser também modulada pelo sistema nervoso central. No entanto, os exatos determinantes fisiopatológicos bem como as vias neuronais envolvidas neste processo ainda não estão adequadamente estabelecidas, embora várias hipóteses possam ser aventadas. O eixo HPA em situações de estresse possui grande influência na resposta do sistema imunológico. O hipotálamo recebe informações periféricas e ajusta o sistema nervoso simpático e o sistema endócrino. O hipotálamo influencia a glândula pituitária por meio do fator liberador de corticotropina (CRF), que controla a liberação de corticotropina (ACTH) da porção anterior da glândula pituitária. O hipotálamo e a glândula pituitária podem produzir tanto o efeito imunossupressor como o efeito pró-inflamatório (Black, 1994; Elenkov, Webster *et al.*, 1999).

Recentemente, foi detectada a presença de receptores do hormônio liberador de corticotropina (CRH) em posição periférica, como no sistema imunológico, cardiovascular e em órgãos reprodutores (Elenkov, Webster *et al.*, 1999). Ao estímulo estressor ocorre a liberação de CRH que comanda a descarga de glucocorticóides, epinefrina e norepinefrina sistêmicos, que por sua vez influenciam a resposta imunológica e inflamatória (Black, 1994; Wright, Rodriguez *et al.*, 1998; Elenkov, Webster *et al.*, 1999; Forsythe, Ebeling *et al.*, 2004). A presença de receptores para CRH também em células inflamatórias como linfócitos TH2 e mastócitos, bem como em nervos periféricos sugere um mecanismo pelo qual as reações de estresse

poderiam modificar respostas inflamatórias, como as que ocorrem na asma (Webster, Torpy *et al.*, 1998).

O estresse e a CRH influenciam a resposta imune das células TH1 e TH2 através da liberação de glucocorticóides, catecolaminas e CRH periférico e também alteram a produção de citocinas e histaminas (Irwin, 1994; Elenkov, Webster *et al.*, 1999)(Irwin, 1994; Elenkov *et al.* 1999)(Joachim, Quarcoo *et al.*, 2003). Estudos sugerem que o estresse influencia o desenvolvimento, o curso e as alterações histopatológicas patologia de determinadas doenças alérgicas, predominantemente potencializando a resposta TH2.

A dominância deste tipo de resposta durante o estresse está ligada a liberação de vários mediadores como a IL-12 IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10. O estresse induz a elevação do AMP-cíclico e de glucocorticóides, os quais inibem a produção de IFN- γ e IL-2 pelo TH1, mas não afetam e nem potencializam a IL-4 secretada pelas células TH2. Além disso, a norepinefrina, epinefrina e histamina estimulam a produção de IL-10 sugerindo que as catecolaminas atuam diretamente as células TH2.

Neste laboratório, Capelozzi *et al.* (2007) estudaram o papel da fluoxetina, um anti-depressivo inibidor da recaptção de serotonina, na modulação de alterações morfofuncionais pulmonares decorrentes da indução de estresse induzido por natação forçada (modelo experimental de

natação forçada modificado). Os autores observaram que neste modelo de estresse houve recrutamento de linfomononucleares e eosinófilos para a parede alveolar, embora o principal componente da resposta inflamatória tenha sido representado por linfócitos.

Justificativa do estudo:

Como vimos o estresse pode alterar a homeostase do organismo de acordo com a duração e a intensidade dos estímulos estressores, modulando a resposta de liberação de corticotropina, corticosteróides, adrenalina, noradrenalina.

Estes por sua vez podem ter vários efeitos no controle e/ou perpetuação da resposta inflamatória TH2 presente na asma. É importante lembrar que, mediante a exposição crônica a mesmo estímulo estressor, mecanismos de adaptação são ativados e desta forma existe uma redução da liberação destes mediadores, atenuando a resposta inflamatória. Desta forma torna-se extremamente relevante uma investigação aprofundada sobre o tema.

Não encontramos na literatura estudos que avaliassem a relação entre o papel da indução de estresse crônico e a inflamação alérgica crônica pulmonar em modelos experimentais, particularmente caracterizando a modulação da hiperresponsividade do tecido pulmonar periférico, da

resposta inflamatória e do remodelamento pulmonar. Além disto, é de grande relevância uma melhor compreensão da relação do estresse crônico na modulação das alterações acima citadas como também para a importância da ativação da óxido nítrico sintase induzida nessas respostas. Cabe lembrar que durante a resposta asmática ocorre um aumento da expressão desta enzima, sendo que a produção de grandes quantidades de NO está correlacionada a várias alterações histopatológicas e funcionais nestes pacientes asmáticos.

Objetivos

Avaliar os efeitos da inibição específica da iNOS, em modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica em cobaias, submetidas ao protocolo de natação forçada como indutor de estresse físico repetido, caracterizando o impacto nos seguintes aspectos:

- a- Alterações comportamentais

- b- Mecânica oscilatória de tecido pulmonar periférico tanto basal como após o desafio com antígeno

- c- Peso das adrenais e níveis séricos de cortisol

- d- Conteúdo de actina no parênquima distal

- e- Recrutamento eosinofílico no parênquima distal

- f- Remodelamento da matriz extracelular, particularmente avaliando o conteúdo de colágeno no parênquima pulmonar distal

- g- Resposta de estresse oxidativo, avaliado pela expressão de $\text{PGF2}\alpha$ no parênquima pulmonar distal

- h- A expressão de iNOS no parênquima pulmonar distal

Métodos

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Processo número 0825/07). Foram utilizadas cobaias adultas, do sexo masculino, da linhagem Hartley, mantidos do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais receberam cuidados de acordo com o “guia de cuidados e uso de animais de laboratório”, publicado pelo *National Institute of Health (NIH publication, 1985)*. Em média, o peso corporal dos animais no início do procedimento experimental foi de aproximadamente 300g e de 500g ao término do experimento.

Grupos experimentais:

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- A. Inalações com solução salina 0,9% (SAL – n=8)
- B. Inalações com ovoalbumina (OVA – n=8)
- C. Natação forçada e inalações com solução salina 0,9% (SAL-Estresse, n=8);
- D. Natação forçada e inalações com ovoalbumina (OVA-Estresse n=8)
- E. Inalações com solução salina 0,9% e tratamento com 1400W (SAL-1400W – n=8)
- F. Inalações com ovoalbumina e tratamento com 1400W (OVA-1400W– n=8)
- G. Natação forçada e inalações com solução salina 0,9% e tratamento com 1400W (SAL-Estresse-1400W, n=8);

H. Natação forçada e inalações com ovoalbumina e tratamento com 1400W (OVA-Estresse-1400W n=8)

Protocolo de sensibilização:

Os animais foram colocados, uma a um, em uma caixa de exposição de acrílico (30x15x20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (*Soniclear*, São Paulo, Brasil). Em seguida, foram submetidas à inalação com aerossol de ovoalbumina (OVA) (*Sigma Chemical Corporation, St. Louis, MO, EUA*) diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico) por 15 minutos ou até o aparecimento de sinais de desconforto respiratório. O tempo em que os animais permaneceram em contato com o aerossol foi cronometrado e denominado de tempo de inalação (TI).

O protocolo de inalação constou de sete inalações com doses crescentes de antígeno (1~5 mg.mL⁻¹), sendo que nas quatro primeiras inalações a dose utilizada foi de 1mg.mL⁻¹, na quinta e sexta inalações foi utilizada a dose de 2,5 mg.mL⁻¹ e na última inalação a concentração de antígeno utilizada foi de 5 mg.mL⁻¹. O protocolo de inalação foi repetido duas vezes por semana durante um período de quatro semanas. Animais controle foram submetidos à exposição de aerossol de soro fisiológico seguindo o mesmo protocolo descrito acima (Figura 3) (Tiberio, Turco *et al.*, 1997; Leick-Maldonado, Kay *et al.*, 2004; Prado, Leick-Maldonado *et al.*, 2006).

Tratamento com 1400W – Inibidor específico da enzima óxido nítrico sintase induzida – iNOS

Trinta minutos antes da sétima inalação, ou seja, 72 horas antes do protocolo de Avaliação da Mecânica Pulmonar, teve início o tratamento crônico com (N-3-aminometil-benzil-acetamidina - 1400W) nos animais dos grupos referentes aos mesmos (OVA-1400W, SAL-1400W, OVA-Estresse-1400W e SAL-Estresse-1400W). O tratamento foi administrado diariamente por quatro dias, na dose de 2mg/Kg/dia/animal por via intraperitoneal, como previamente descrito (Prado, Leick-Maldonado *et al.*, 2006; Starling, Prado *et al.*, 2009). Animais controle receberam veículo (soro fisiológico) de 1400W, em volume correspondente (Figura 3).

Protocolo de natação forçada

Após 24h da quarta inalação, teve início o protocolo de natação forçada a fim de evitar interferência com o protocolo de sensibilização, durante cinco dias seguidos, por duas semanas com o intuito de induzir o estresse. Os animais foram colocados em uma caixa plástica (35A x 53L x 31P) contendo água em temperatura de 25°C até o topo, de modo que as cobaias não toquem o fundo do recipiente, impedindo-as de sustentarem o seu peso com suas patas. Foram deste modo, forçadas a nadar por 10 minutos ou até demonstrarem sinais de fadiga muscular e/ou respiratória e risco de afogamento. O tempo de natação foi monitorado por um observador para posterior análise (Figura 3 e 4).

Protocolo experimental

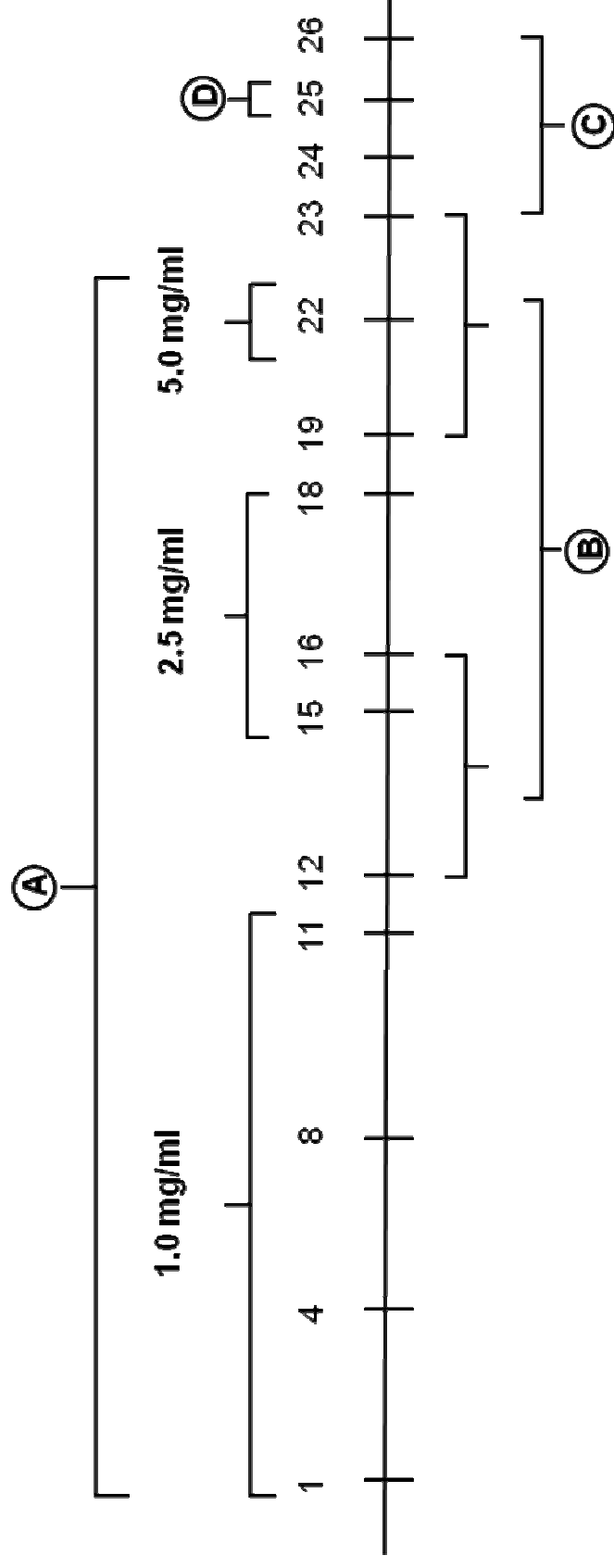


Figura 3: Diagrama do protocolo experimental. **A** - Inalações com Ovoalbumina (OVA) ou Soro Fisiológico (SAL); **B** - Natação Forçada (10 minutos por dia) em dois períodos de 5 dias com um intervalo de dois dias entre os períodos; **C**- Tratamento com 1400W (2mg/kg/dia) ou Veículo; **D** - Avaliação do Comportamento em Campo Aberto

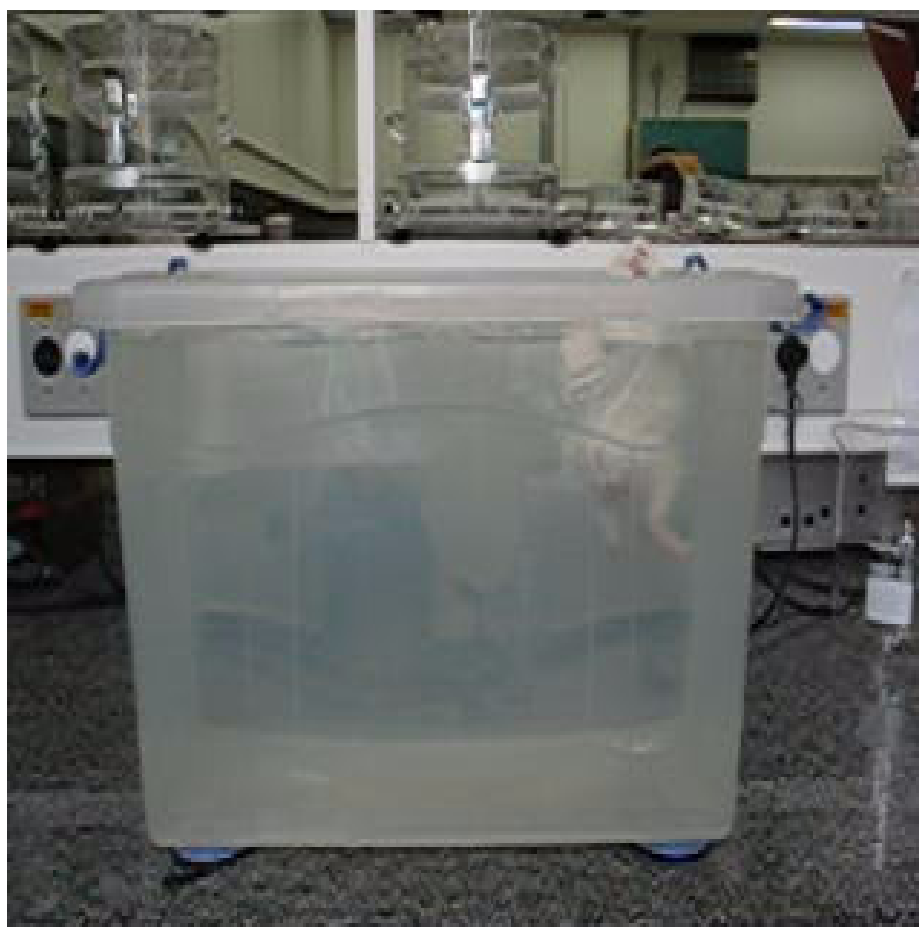


Figura 4 Caixa de natação onde os animais eram submetidos ao protocolo de indução do estresse.

Avaliação de comportamento em campo aberto

A atividade geral dos animais foi avaliada por meio da observação indireta desses animais em um campo aberto, construído com base naquele descrito por Broadhurst (1960). Este aparelho é constituído de uma arena circular de madeira com 100 cm de diâmetro, pintada de preto e uma parede de madeira de 60 cm de altura pintada de branco (Broadhurst, 1960) (Figuras 5 e 6).

As observações foram realizadas com o auxílio de um sistema de rastreamento de imagem computadorizado (*Ethovision – Noldus Information Technology*). Esse sistema inclui o programa *Ethovision Pro-Color 3.1*, câmera filmadora (Sony CCD-iris video camera), monitor de vídeo, placa de captura de vídeo (TARGA + Truevision, 2D, NTSC) e computador pessoal.

A partir de imagens recebidas pela câmera filmadora e digitalizadas na placa de captura, o programa cria coordenadas espaciais (x e y) do centro de gravidade do animal em intervalo de tempo determinado segundo taxa de amostragem pré-configurada. O programa *Ethovision* permite digitalizar o assoalho da arena, sendo dividido em 17 áreas: uma central, 8 pericentrais e 8 periféricas (*Figura 5*).

Para o estudo, cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e sua atividade registrada por períodos de 30 minutos. Entre as

observações de cada animal o campo aberto foi limpo com solução de ácido acético a 5%.

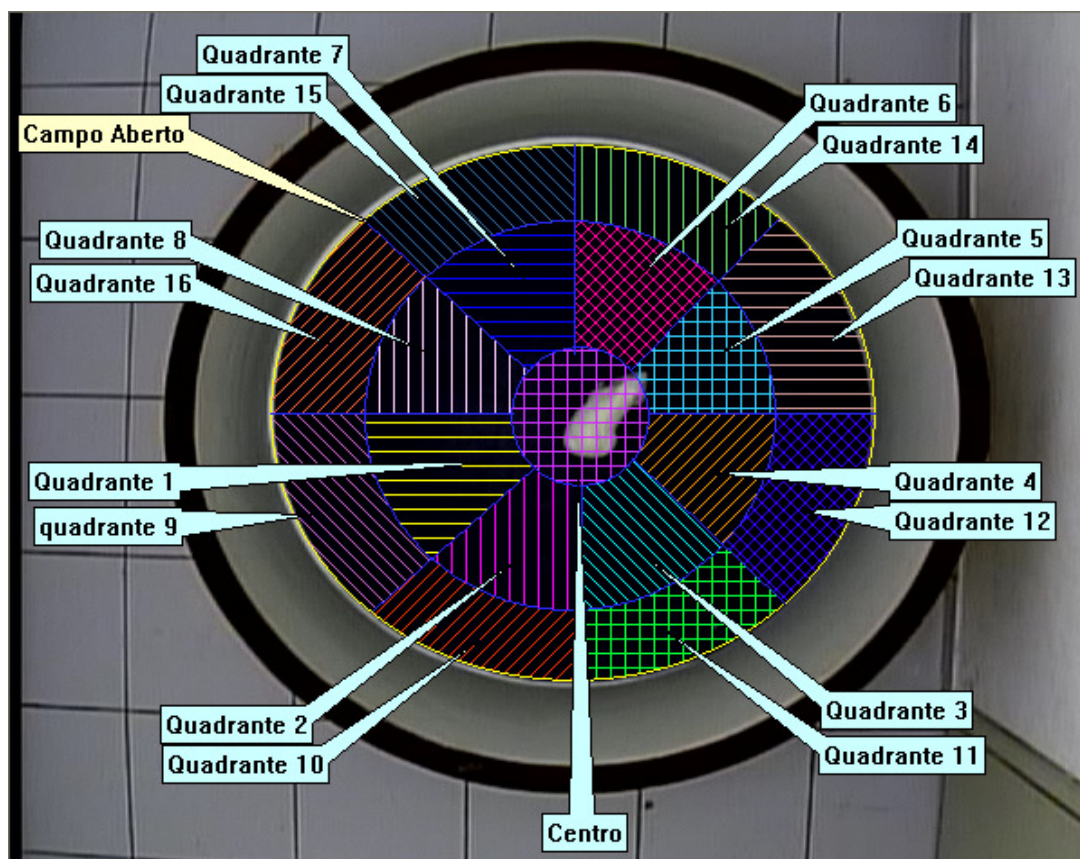


Figura 5. Campo aberto de 1 metro de diâmetro demonstrando as delimitações das áreas, sendo do quadrante 1 ao quadrante 8, consideradas como pericentrais, e do quadrante 9 ao quadrante 16, como periféricas.

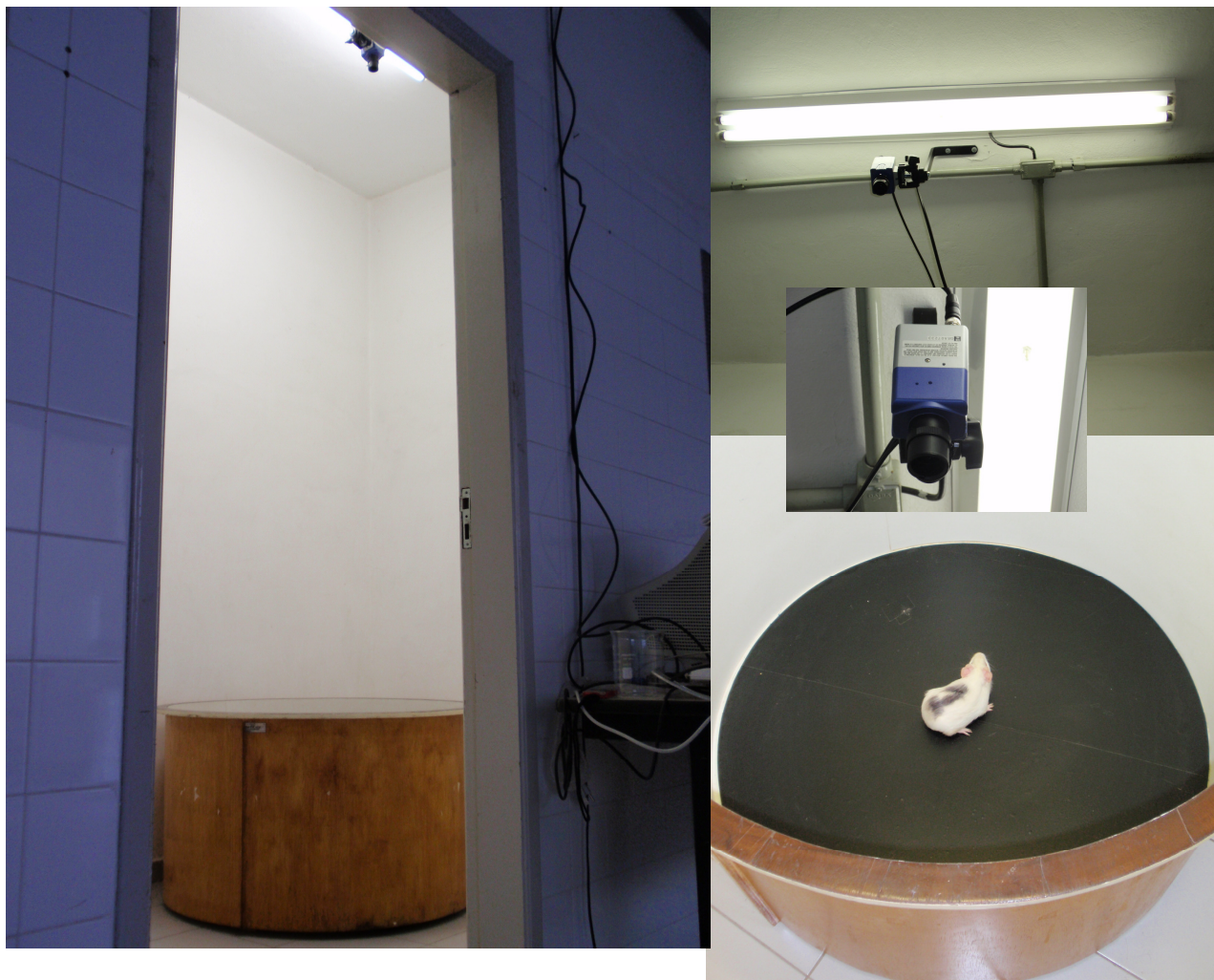


Figura 6. Fotografias do Sistema *Ethovision* e do campo aberto instalados no LIM 20-FMUSP.

Os parâmetros quantificados pelo *Ethovision* foram:

- 1- distância percorrida total (cm), que inclui as zonas centrais e periféricas;
- 2- velocidade média total (cm/s);
- 3- tempo de movimento total (s).

Vale ainda ressaltar, que com a utilização do *Ethovision*, a observação comportamental foi feita sem a presença do observador, minimizando as influências humanas durante o teste. O teste foi realizado 24 horas antes dos animais serem submetidos à avaliação da mecânica oscilatória de tecido pulmonar periférico (Figura 3).

Dosagem de cortisol sérico

Para a análise do cortisol sérico foi coletado aproximadamente 5 ml de sangue de cada animal. Este foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos e o soro deste sangue foi congelado para a análise.

O cortisol foi dosado pelo sistema imunofluorométrico AutoDELFLIA (Perkin Elmer, Turku, Finlândia). Este método se baseia na reação competitiva entre a molécula de cortisol da amostra e a molécula de cortisol ligada ao elemento químico Európio. Cabe lembrar que anticorpos contra o cortisol são limitados e específicos. Após a ligação, é misturada uma solução que dissocia os íons de Európio da molécula de cortisol e produz a

fluorescência. Esta fluorescência é medida pelo sistema, e a sua intensidade é inversamente proporcional à concentração de cortisol da amostra.

Avaliação do Peso das adrenais

As glândulas adrenais foram dissecadas, removidas e pesadas em balança analítica (Mettler Toledo, AG20, Suíça). O peso corporal e o peso das glândulas adrenais estão apresentados como peso total corpóreo e das adrenais.

Avaliação da mecânica oscilatória de tecido pulmonar periférico:

Após 72 horas da sétima inalação, os animais foram anestesiados com Tiopental (50 mg/Kg i.p.), traqueostomizados, submetidos à laparotomia para a retirada das glândulas adrenais, coleta de 10 ml de sangue por intermédio de punção cardíaca, e exsanguinação pela secção da veia cava inferior. O coração e os pulmões foram infundidos com solução de Krebs (em mM: NaCl, 118; KCl, 4.5; NaHCO₃, 25.5; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; glicose 10; *Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA*).

As fatias de tecido pulmonar periférico foram obtidas da região subpleural do lobo inferior esquerdo medindo aproximadamente 10mm x 2mm x 2mm e foram mantidas em solução orgânica de Krebs, borbulhada continuamente com 95% de O₂ e 5% de CO₂ (carbogênio) em um pH de

7,40, após serem pesadas e medidas (L0). Cada uma das pontas do fragmento foi colada com cianocrilato a um pequeno clip metálico fixado em um longo fio de aço de 0,5mm de diâmetro e o conjunto foi suspenso verticalmente e mergulhado num banho de 15ml de solução de Krebs, constantemente aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂, contido em um recipiente de vidro. De um lado, uma das pontas será ligada a um transdutor de força (modelo 400A; *Cambridge Technologies, Watertown, MA*) que opera em torno de 10g, com uma resolução de 200µg e uma complacência de 1µg/g. A outra ponta atravessará um orifício na parte inferior do recipiente, onde será colocada uma gota de mercúrio, pois sua alta tensão superficial previne a perda ou o extravasamento da solução de Krebs contida no recipiente, e conectada a um braço oscilatório de controle de alterações de comprimento (L) (Modelo 300B; *Cambridge Technologies*) (Figura 7).

Este braço é capaz de determinar ponto a ponto, a excursão de 8mm e a resolução de 1 µm de comprimento, que conectado a um gerador (Modelo 3030; *BK Precision, Chicago, IL*), controla a freqüência, amplitude e a forma de onda da oscilação. A tensão (T) foi obtida através do movimento do parafuso que efetua pequenos deslocamentos do transdutor de força. Os sinais de comprimento e força foram captados e filtrados lentamente (8-pole Bessel 902LPF; *Frequency Devices, Haverhill, MA*) com uma freqüência de 30Hz e convertidos de leitura analógica à digital por um conversor (DT2801-A; *Data Translation Inc, Marlborough, MA*) sendo então, gravados num programa de computador. O tecido foi submetido a uma força de 2g por três

vezes (“*stress relaxation*”), retornando para uma força de 1g, com oscilação sinusoidal de 2,5% do comprimento inicial a uma frequência de 1Hz.

Após 50 minutos de estabilização (com trocas de Krebs a cada 15 minutos), foram obtidos os dados de mecânica do tecido sob condições basais (por 5 minutos) e após desafio com ovoalbumina (OVA 0,1%) por 10 minutos para obtenção de uma resposta máxima. Os valores de elastância (Et) e resistência (Rt) do tecido pulmonar periférico e foram estimados através da equação de movimento (Lancas, Kasahara *et al.*, 2006):

$$T = Et\Delta l + Rt(\Delta l / \Delta t) + K$$

onde T é tensão, l é comprimento, $\Delta l / \Delta t$ é a variação do comprimento por unidade de tempo e K é uma constante que reflete a tensão de repouso. Os resultados foram padronizados de acordo com o tamanho de cada fatia de tecido pulmonar. A área de secção transversal (A0) da fatia de tecido pulmonar foi obtida pela fórmula:

$$A0(\text{cm}^2) = W0 / (\rho \times Lr)$$

onde ρ é a densidade de massa do tecido adotado como $1,06 \text{ g/cm}^3$, W0 é o peso úmido em gramas, e Lr é a tensão em repouso em centímetros. Os valores de resistência (Rt) e elastância (Et) foram multiplicados por $Lr/A0$.

A histeresividade, uma variável empiricamente determinada que quantifica a dependência de processos dissipativos nos processos elásticos (Fredberg et al., 1989), foi determinada como:

$$\eta = \tan\theta$$

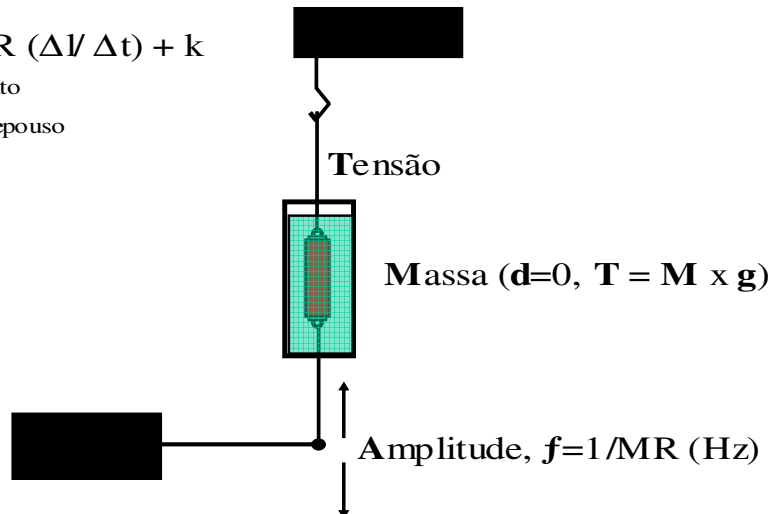
Foi também analisada a porcentagem de aumento da resistância (%Rt) e elastância (%Et) em relação à condição basal. Após a oscilação mecânica, as fatias de tecido pulmonar foram fixadas em formol 10% por 48h e embebidos em parafina para análise histológica.

Esquema do equipamento

$$T = E \cdot \Delta l + R \left(\frac{\Delta l}{\Delta t} \right) + k$$

L = comprimento

k = tensão de repouso



Correção: L_r/A_o onde $A_o = W_o / (\rho \cdot L_r)$, portanto $\alpha = L_r^2 \cdot \rho / W_o$

$\eta = (R/E) 2\pi f$ onde η é a Histeresividade

Figura 7. Esquema do protocolo experimental da mecânica oscilatória do tecido pulmonar periférico, onde Et=elastância, Rt=Resistência, do tecido pulmonar, Lr= comprimento, f = frequência, Wo= peso, As fatias de tecido pulmonar periférico foram conectadas a um transdutor de força e a um braço oscilatório e foram suspensas em um banho orgânico.

Estudo morfométrico do parênquima pulmonar

Depois de terminada a fixação em formol, o material foi submetido às técnicas histológicas habituais com parafina, para obtenção de cortes de 4 μ m de espessura. Este material foi submetido às colorações específicas descritas abaixo.

As avaliações histopatológicas utilizadas neste estudo foram realizadas por meio de duas técnicas, a técnica de contagem de pontos e retas (Weibel, 1963) ou a técnica de análise por medida de densidade óptica. A técnica de contagem de pontos e retas um retículo de 100 pontos e 50 retas com área conhecida foi acoplado à ocular do microscópio óptico comum (CH30, Olympus, Japão). Vários autores já demonstraram previamente que este método é adequado para a quantificação destes índices (Garcia, Paiva *et al.*, 1994; Sakae, Leme *et al.*, 1994; Tiberio, Turco *et al.*, 1997). O observador que realizou todas as análises deste estudo não estava ciente a que grupo pertencia o tecido analisado. A análise por medida de densidade óptica foi realizada por meio de sistema de análise de imagens composto de microscópio (Nikon Eclipse E200, Japão), ligado a uma câmera de vídeo (Infinity X-21C, Canadá) por um adaptador (Nikon Optem 5, Japão), que enviava as imagens por meio de placa digitalizadora de imagens a um computador. Por meio do programa Image Pro-Plus (Versão 4.5.0.29, Media Cybernetics, EUA) as imagens foram adquiridas e processadas obtendo-se a medida de área de positividade nas lâminas submetidas à técnica

imunohistoquímica. Este programa permitiu que lhe fosse informado os tons das cores que representavam as áreas de positividade e assim pode-se calculá-las nas regiões do tecido de interesse previamente delimitadas. Os resultados foram expressos em porcentagem de área.

Avaliação da densidade de eosinófilos

A coloração de LUNA foi utilizada para detecção de eosinófilos (LUNA, 1986). Por meio da técnica de contagem de pontos e retas, foi avaliado o conteúdo de eosinófilos no tecido alveolar. Para tanto, foram quantificados o número de pontos que incidem no tecido alveolar e o número de células presentes nos septos alveolares em cada campo. A densidade de eosinófilos foi determinada pela razão do número de células e da área de tecido, no aumento de 1000x. Foram analisados 10 campos por corte, selecionados de forma randômica e os resultados foram expressos como células por unidade de área ($10^4\mu\text{m}^2$) (Lancas, Kasahara *et al.*, 2006).

Avaliação do remodelamento da matriz extracelular - Coloração de Picro-Sírius:

Esta coloração foi utilizada para a contagem das fibras colágenas na região do parênquima pulmonar. Os cortes foram desparafinados e levados à água. Foram corados por 1 hora no Picro-Sírius à temperatura ambiente e, posteriormente, lavados em água corrente por 5 minutos. Após esta etapa, os cortes foram corados pela Hematoxilina de Harris por 6 minutos e

posteriormente lavados em água corrente por 10 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas. A análise de imagem foi feita através do programa *Image Pro Plus* (versão 4.5), instalado em um microcomputador de padrão IBM acoplado a um microscópio e câmera fotográfica digital. Em cada caso foram capturadas 10 imagens em aumento de 400x vezes. Em cada imagem foi selecionada a área de interesse e aplicado um filtro pré-montado, com base em um número representativo de fotos, marcando as áreas positivas.

Para cada imagem foram coletados:

- (1) área total;
- (2) área positiva com base no padrão estabelecido;
- (3) Densidade média de cor caracterizada pela média da intensidade de cor do padrão RGB (0 a 255), sendo que valores maiores representam áreas mais claras;
- (4) Densidade óptica integrada (IOD) correspondente à densidade média de cada objeto marcado multiplicado pela área do mesmo.

A divisão do valor da somas dos IODs de cada objeto pela área total de positividade fornece um valor entre 0 e 255 correspondente a media ponderada da intensidade de cor.

Imunohistoquímica para detecção de actina

As fatias de parênquima pulmonar foram também submetidas à imunohistoquímica com anticorpo anti-actina. Para tanto, as lâminas foram desparafinadas e uma solução de peroxidase a 0,5% em metanol foi aplicada por 10 minutos para inibir a atividade de peroxidase endógena. A recuperação do antígeno foi realizada com solução citrato por 30 minutos. Os cortes foram incubados com *Anti-Human Smooth Muscle Actin* (1A 4, Dako, Dinamarca) durante toda a noite a 4°C. O kit LSAB® Plus-HRP (K-0690 DAKO Corporation, Carpinteria, CA, EUA) foi usado como anticorpo secundário e, como cromógeno, usamos o 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de *Harris*.

A quantificação da actina no tecido alveolar foi determinada por meio da técnica de contagem de pontos e retas. O conteúdo de actina no parênquima pulmonar foi determinado pela proporção de volume dada pelo número de pontos que coincidem com o tecido positivo para actina e o número total de pontos que incidem no tecido alveolar. Foram analisados todos os campos de cada lâmina no aumento de 200X. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Imunohistoquímica para detecção de 8-iso-PGF2 α

A imunohistoquímica para detecção do 8-iso-PGF2 α (isoprostano 8) foi realizada utilizando o anticorpo Anti-8-epi-PGF2 α (Oxford Biomedical Research, Rochester Hills, MI, EUA) com diluição de 1:500. Os blocos foram desparafinados e lavados 7 vezes por 5 minutos com H₂O₂ 10V 3% para inibir a atividade de peroxidase endógena. Após banhos em PBS e água, a recuperação do antígeno foi realizada com tripsina por 20 minutos. Após isto, 3 banhos de 3 minutos/cada em PBS foram realizados. Os cortes foram incubados com anticorpo Anti-8-epi-PGF2 α diluídos em BSA durante toda a noite. Após lavagem em PBS, Vectastain ABC Kit (Vector Elite PK-6105, Burlingame, CA, EUA) foi usado como anticorpo secundário e 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) foi usado como cromógeno. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris (Merck, Rio de Janeiro, Brasil).

A análise da expressão de 8-iso-PGF2 α no parênquima pulmonar foi realizada como previamente descrito na avaliação de fibras colágenas. Determinamos a proporção de volume de 8-iso-PGF2 α como a relação entre o número de pontos sobre a área do tecido corada com 8-iso-PGF2 α e o número total de pontos sobre o tecido pulmonar (Montuschi, Corradi *et al.*, 1999). As medidas foram realizadas em 10 campos/animal no aumento de 400X, sendo os resultados expressos em porcentagem.

Imunohistoquímica para detecção de iNOS

A imunohistoquímica utilizada para a pesquisa do anticorpo em tecido foi realizada pelo método Biotina-estreptavidina peroxidase para o anticorpo iNOS. Os cortes histológicos a 5 µm de espessura foram colocados em lâminas silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano- *Sigma*). As lâminas foram desparafinadas e hidratadas e, na seqüência, o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) 10V 3% 7 vezes de 5 minutos cada. Foi então feita a lavagem com água e PBS. A recuperação antigênica foi obtida através de alta temperatura. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS. Finalizada a etapa dos bloqueios, a solução com o anticorpo primário iNOS título 1:400 (*LabVision, NeoMarkers, Fremont CA* cód. *RB-9242-P*) foi aplicada nos cortes histológicos dos animais em estudo assim como nos controles, tanto positivo quanto negativo (aplicado apenas BSA) e, em seguida, as lâminas foram incubadas durante todo o período da noite. As lâminas então foram lavadas em PBS e incubadas com o kit Vector ABC Elite (*HRP, cód. PK-6101, Vector Laboratories, INC, Burlingame, CA*). Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em PBS e seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidina (DAB) (*DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA, Cód. K3468*). As lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com Hematoxilina de Harris (*Merck, Darmstadt, Alemanha*). Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina para microscopia Entellan (*Merck, Darmstadt, Alemanha*).

A contagem de eosinófilos positivos para a expressão de iNOS foi realizada conforme descrito no item análise avaliação da densidade de eosinófilos. As células positivas para iNOS foram analisadas no aumento de 1000X em 10 campos por tecido e expressas como células/ $10^4\mu\text{m}^2$ (Angeli, Prado *et al.*, 2008; Starling, Prado *et al.*, 2009).

Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa *SigmaStat* (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Foi utilizada a análise de variância para um fator nos animais sensibilizados. A comparação dos grupos OVA com os seus respectivos controles foi feita utilizando o Mann-Whitney. Os resultados não paramétricos foram expressos em mediana e percentis [mediana (percentil 25% - percentil 75%)] e a representação gráfica na forma de "Box-Plots", enquanto os resultados paramétricos foram expressos na forma de média e erro padrão (\pm erro padrão) e os gráficos na forma de barras. Foi considerado significativo um $P < 0,05$ para todas as análises (Zar, 1984).

Resultados

Avaliação de Comportamento

A Figura 8 mostra a velocidade de deslocamento dos animais no campo aberto para os quatro grupos experimentais (SAL, OVA, SAL-Estresse e OVA-Estresse). Houve diferença significativa na velocidade de movimentação dos animais sensibilizados (OVA e OVA-Estresse: $1,67 \pm 0,19$; $1,61 \pm 0,17$ cm/seg) comparativamente aos animais controle (SAL e SAL-Estresse: $0,88 \pm 0,17$; $1,12 \pm 0,19$ cm/seg, $P < 0,05$). Não houve um efeito da indução de estresse neste parâmetro.

A Figura 9 mostra o tempo de movimentação dos animais no campo aberto para os quatro grupos experimentais (SAL, OVA, SAL-Estresse e OVA-Estresse). Houve diferença significativa no tempo de movimentação somente nos animais sensibilizados e submetidos ao estresse físico repetido (OVA-Estresse: $76,03 \pm 7,83$ seg) comparativamente aos demais grupos (OVA: $54,50 \pm 10,07$; SAL: $39,15 \pm 8,82$; SAL-Estresse: $53,89 \pm 9,66$ seg, $P < 0,05$).

Não houve diferença significativa na distância percorrida, no campo aberto, pelos animais dos quatro grupos experimentais (SAL: $262,94 \pm 38,79$, OVA: $305,99 \pm 30,88$, SAL-Estresse: $274,99 \pm 39,70$ e OVA-Estresse: $324,89 \pm 26,25$ cm).

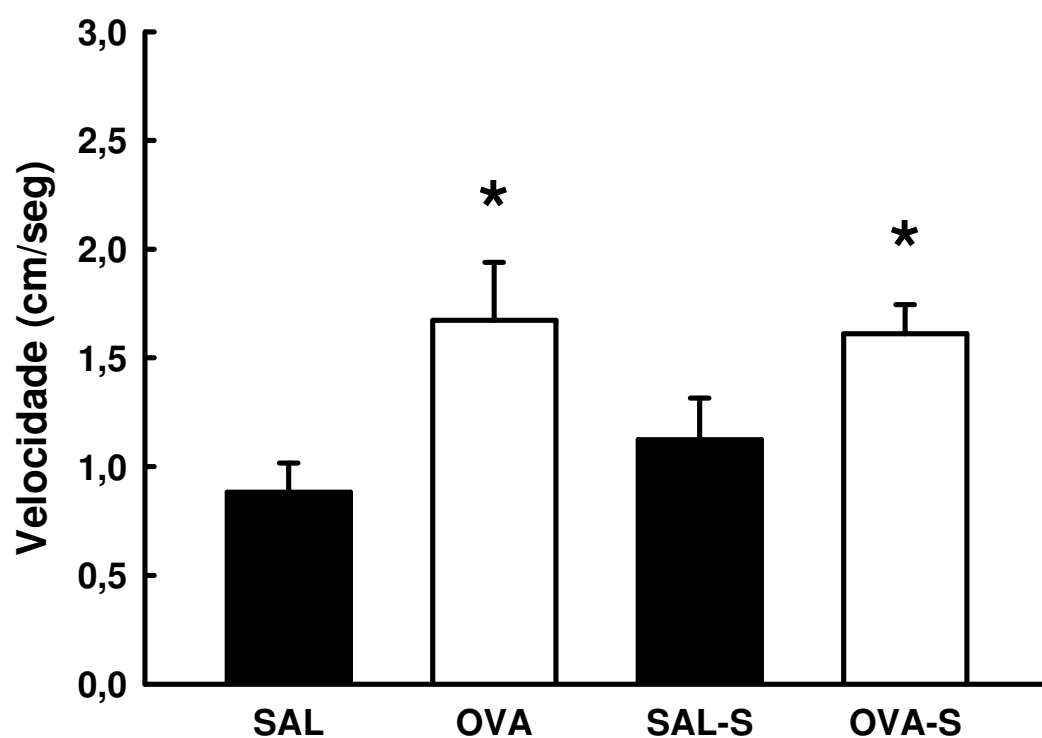


Figura 8. Gráfico de barras representando a média \pm EP da velocidade de deslocamento dos animais no campo aberto para os quatro grupos experimentais (SAL, OVA, SAL-Estresse e OVA-Estresse). * $P < 0,05$ comparados aos grupos controle.

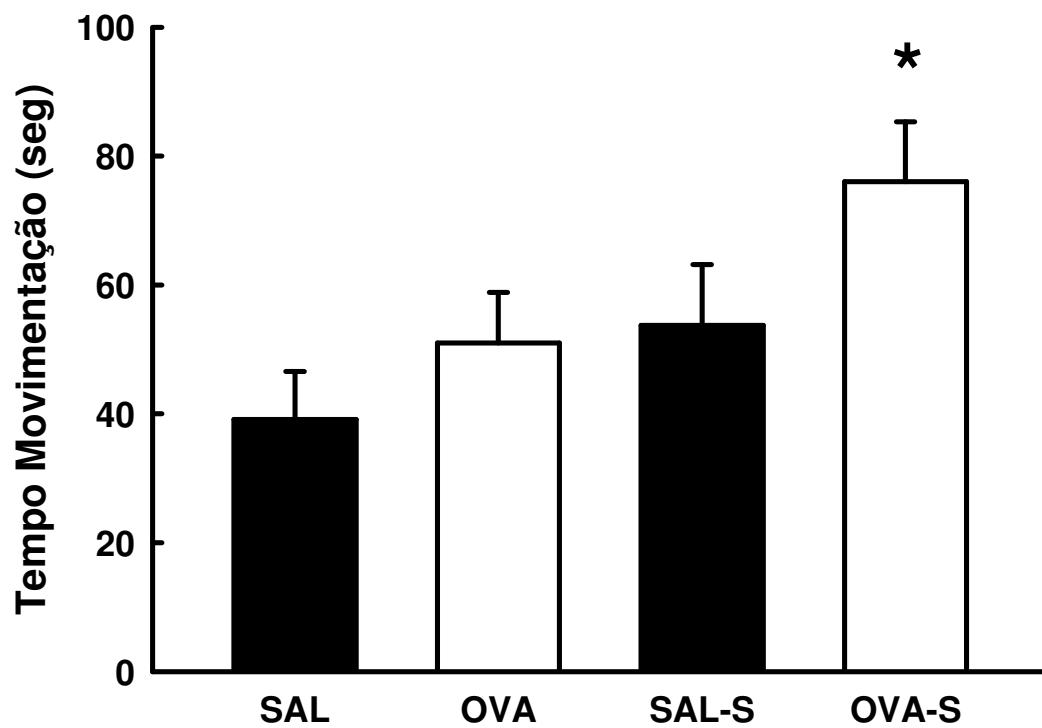


Figura 9. Gráfico de barras representando a média \pm EP do tempo de movimentação dos animais no campo aberto para os quatro grupos experimentais (SAL, OVA, SAL-Estresse e OVA-Estresse). * $P < 0,05$ comparados aos demais grupos experimentais.

Avaliação das Adrenais

Considerando a avaliação do peso das adrenais (Figura 10), os grupos foram divididos segundo os seguintes critérios: 1. Animais somente tratados com salina (grupos SAL e OVA), 2. Animais submetidos ao tratamento com 1400W (SAL-1400W e OVA-1400W), 3. Animais submetidos ao estresse físico (SAL-Estresse e OVA-Estresse); 4. Animais submetidos ao estresse e ao tratamento com 1400W (SAL-estresse-1400W e OVA-Estresse-1400W).

Os animais submetidos a estímulo estressor [Estresse: 0,297 (0,238-0,361g)] apresentaram adrenais com peso maior que os grupos veículo e 1400W [Veículo: 0,218 (0,205-0,249g), 1400W: 0,231 (0,189-0,252g), (P<0,001 para ambos)]. O tratamento de animais estressados com 1400W mostrou diminuir o ganho de peso das adrenais [Estresse+1400W: 0,216 (0,199-0,244g), P<0,001 em comparação ao grupo submetido ao estresse físico]

Avaliação do Cortisol

Para avaliação dos níveis séricos de cortisol os animais foram divididos de acordo com os mesmos critérios utilizados para a avaliação das adrenais. Observamos então aumento significativo nos níveis de cortisol sérico nos animais submetidos ao estresse da natação forçada [SAL-

Estresse e OVA-Estresse 32,40: (29,42-40,70 μ g/dL)] comparativamente aos controles [SAL e OVA: 27,15 (18,20-33,10 μ g/dL), $p < 0.004$]. O tratamento com o 1400W não alterou os níveis de cortisol sérico em nenhum dos grupos [SAL-1400W e OVA-1400W: 32,70 (25,05-40,55 μ g/dL); SAL-Estresse-1400W e OVA-Estresse-1400W: (29,70 (23,90-35,50 μ g/dL)].

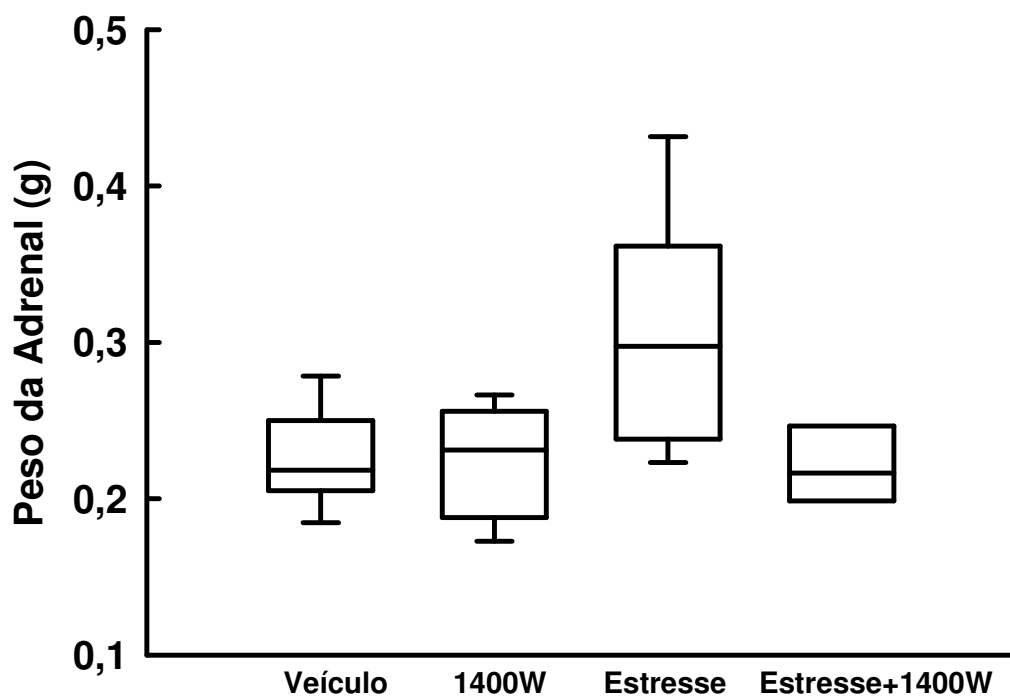


Figura 10. *Box Plots* dos valores do peso das adrenais de grupos veículo não-estressados (SAL e OVA), animais não-estressados que receberam 1400W (SAL-W e OVA-W), estressados (SAL-Estresse e OVA-Estresse) e animais estressados e tratados com 1400W (SAL-Estresse-1400W e OVA-Estresse-1400W). *P<0,001 em comparação aos grupos veículo e 1400W; **P<0,001 em comparação ao grupo estresse.

Avaliação da mecânica pulmonar

Não houve diferenças significativas nos valores basais de resistência tecidual nos grupos inalados com soro fisiológico e com ovoalbumina. A Figura 11 mostra o gráfico do percentual de aumento dos valores de resistência tecidual (%Rt) após desafio antigênico nos 8 grupos experimentais estudados. A %Rt após o desafio antigênico aumentou no grupo exposto à ovoalbumina [OVA: 84,97 (66,26–121,24)%] comparativamente ao grupo exposto às inalações com soro fisiológico [SAL: 10,09 (6,61–19,20)%, $P < 0,001$].

Nos grupos somente tratados com 1400W, a %Rt foi maior no grupo exposto à ovoalbumina [OVA-1400W: 56,84 (26,73-85,15)%] em comparação aos animais expostos às inalações com soro fisiológico [SAL-1400W: 10,00 (13,51-46,35)%, $P < 0,05$]. Nos grupos submetidos somente à natação forçada, houve aumento de %Rt no grupo exposto à ovoalbumina [OVA-Estresse: 98,54 (47,23-147,51)%] em comparação ao grupo exposto à inalação com soro fisiológico [SAL-Estresse: 36,14 (30,09-75,33)%, $P < 0,001$]. Nos grupos submetidos à natação forçada e ao tratamento com 1400W, não houve diferença na %Rt entre o grupo exposto à ovoalbumina e o grupo exposto à inalação com soro fisiológico. Houve aumento da resistência tecidual após o desafio antigênico no grupo exposto à ovoalbumina e submetido à natação forçada (OVA-Estresse) em comparação ao grupo somente exposto à ovoalbumina (OVA, $P < 0,05$).

Observamos que o tratamento com 1400W reduziu a %Rt após o desafio antigênico dos animais expostos à ovoalbumina (OVA-1400W) em relação ao grupo não-tratado com 1400W (SAL-1400W; $P < 0,05$). O mesmo ocorreu com o grupo exposto à ovoalbumina e submetido à natação forçada [OVA-Estresse-1400W 26,94 (22,39-44,46)%] em relação ao grupo exposto à ovoalbumina não-tratado com 1400W e sem natação (OVA; $P < 0,001$), assim como em relação ao grupo exposto à ovoalbumina submetido à natação forçada (OVA-Estresse; $P < 0,001$).

Não houve diferenças significativas nos valores basais de elastância tecidual nos grupos inalados com soro fisiológico e com ovoalbumina. A figura 12 mostra o gráfico dos valores de percentagem de aumento de elastância tecidual (%Et) após desafio antigênico nos 8 grupos experimentais estudados. A %Et após o desafio antigênico foi maior no grupo exposto à ovoalbumina [OVA: 56,62 (38,61 – 78,59)%] comparativamente aos animais expostos às inalações com soro fisiológico [SAL: 9,56 (6,02 – 11,74)%, $P < 0,001$].

Nos grupos somente tratados com 1400W, a %Et foi maior no grupo exposto à ovoalbumina [OVA-1400W: 34,29 (14,34-63,78)%] em comparação aos expostos à inalação com soro fisiológico [SAL-1400W: 3,030 (1,32–9,030)%, $P < 0,001$]. Nos grupos submetidos somente ao estímulo estressor (natação forçada), houve aumento de %Et no grupo exposto à ovoalbumina [OVA-Estresse: 76,45 (61,57-101,74)] em

comparação ao grupo exposto à inalação com soro fisiológico [SAL-Estresse: 17,92 (3,17-26,52)%, $P < 0,001$]. Nos grupos submetidos ao estímulo estressor e ao tratamento com 1400W, não houve diferença estatística na %Et entre o grupo exposto à ovoalbumina e o grupo exposto à inalação com soro fisiológico.

Houve aumento da %Et após o desafio antigênico no grupo exposto à ovoalbumina e ao estímulo estressor (OVA-Estresse) em comparação ao grupo somente exposto à ovoalbumina ($P < 0,05$). Observou-se que o tratamento com 1400W reduziu a %Et dos animais expostos à ovoalbumina (OVA-W) em relação ao grupo não-tratado com 1400W (OVA, $P < 0,05$). O mesmo ocorreu com o grupo exposto à ovoalbumina e submetido a estímulo estressor [OVA-Estresse-1400 21,50 (15,08-37,14)%] em relação ao grupo exposto à ovoalbumina não-tratado com 1400W e sem estímulo estressor (OVA; $P < 0,05$) e em relação ao grupo exposto à ovoalbumina submetido ao estímulo estressor (OVA-Estresse; $P < 0,001$).

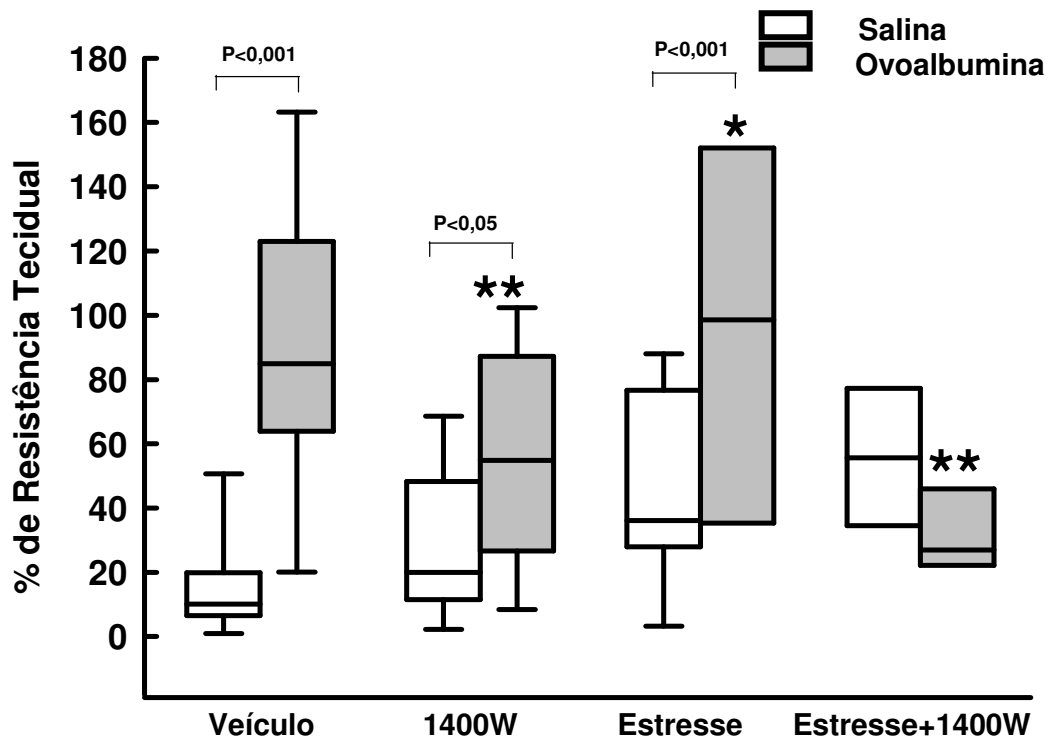


Figura 11. *Box Plots* dos valores da porcentagem de aumento da resistência tecidual após desafio antigênico submetidos à inalação de soro fisiológico (salina) ou à ovoalbumina somente (Veículo), que receberam tratamento de 1400W (1400W), que foram submetidos à natação forçada (Estresse) e que foram submetidos a 1400W e natação forçada (Estresse+1400W). *P<0,05 em comparação ao grupo exposto à ovoalbumina e não submetido a estresse. ** P<0,05 em comparação aos grupos expostos à ovoalbumina que não foram tratados com 1400W.

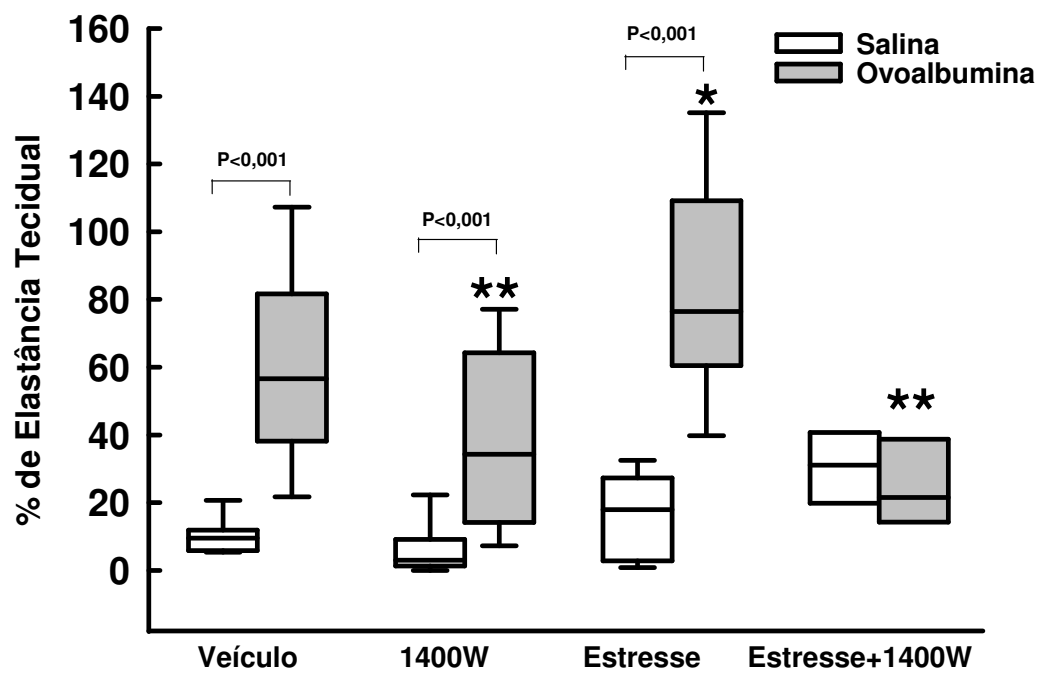


Figura 12. *Box Plots* dos valores da percentagem de aumento da elastância tecidual após desafio antigênico dos grupos que foram submetidos à inalação de soro fisiológico (salina) ou ovoalbumina somente (Veículo), que receberam tratamento de 1400W (1400W), que foram submetidos à natação forçada (Estresse) e que foram submetidos a 1400W e estresse (Estresse+1400W). Valores são expressos em média e erro padrão. *P<0,05 em comparação ao grupo exposto à ovoalbumina e não submetido a estresse. **P<0,05 em comparação aos grupos expostos à ovoalbumina que não foram tratados com 1400W.

Avaliação da densidade de eosinófilos

A Figura 13 representa o gráfico da densidade de eosinófilos nos grupos analisados. Houve aumento da densidade de eosinófilos em animais inalados com OVA [OVA: 9,78 (6,98-13,33), OVA-Estresse: 11,11 (7,45-16,66), OVA-S-W: 11,69 (7,95–15,30) células/ $10^4\mu\text{m}^2$] em comparação àqueles inalados com salina em todos os grupos, [SAL: 5,06 (2,44-8,11), SAL-Estresse: 8,22 (4,35-8,11); SAL-1400W: 6,19 (4,35-10,26); SAL-Estresse-1400W: 8,22 (5,71-13,16) células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,05$ para todas as comparações, exceto no grupo não-estressado tratado com 1400W, SAL-1400W x OVA-1400W]. Houve aumento da densidade de eosinófilos nos grupos tratados com ovoalbumina e submetidos ao estresse físico (OVA-Estresse e OVA-Estresse-1400W) em relação aos grupos não-estressados (OVA e OVA-1400W; $P < 0,05$).

O tratamento com 1400W de animais submetidos à inalação de ovoalbumina (OVA-1400W) diminuiu a densidade de eosinófilos em comparação ao grupo exposto à ovoalbumina (OVA; $P < 0,05$). Entretanto, em animais estressados e expostos à ovoalbumina, o tratamento com 1400W (OVA-Estresse-1400W) não diminuiu a densidade de eosinófilos em relação ao grupo estressado, exposto à ovoalbumina e não-tratado (OVA-Estresse).

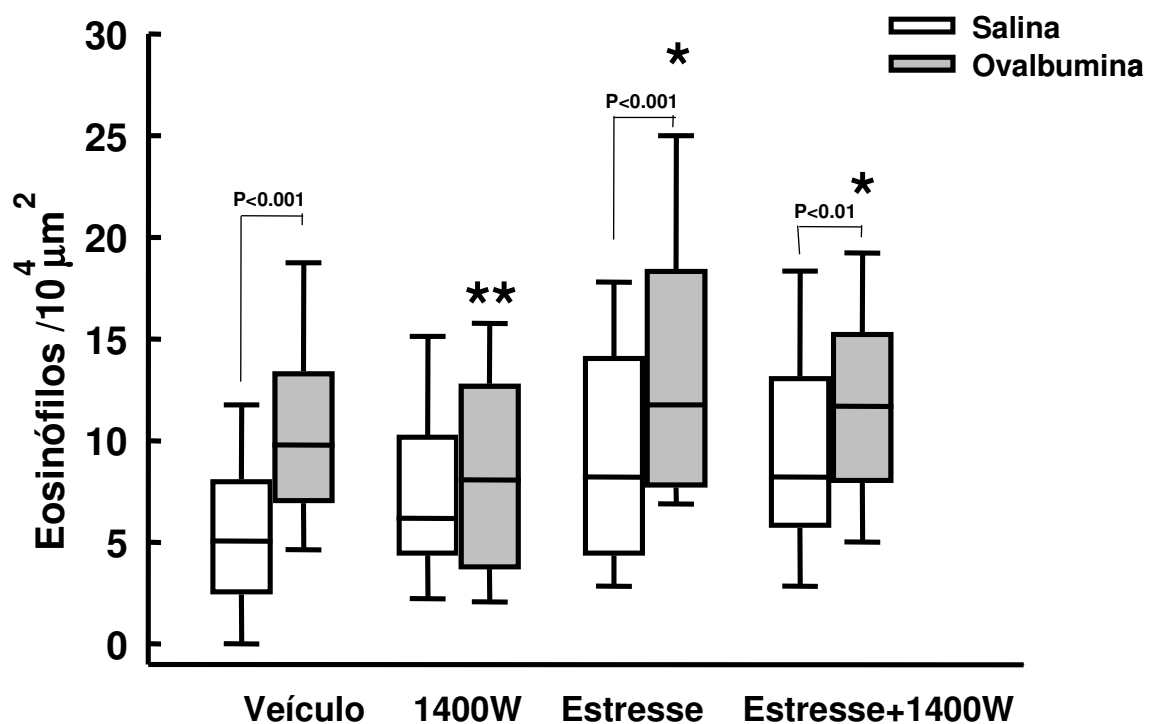


Figura 13 *Box Plots* dos valores da densidade eosinofílica em tecido pulmonar de cobaias previamente expostas a sete inalações com ovoalbumina ou salina e submetidas ou não a estresse repetido e que receberam 1400W ou veículo. *P<0,05 em comparação a animais expostos a ovoalbumina que receberam veículo (OVA-veículo) e 1400W (OVA-1400W). **P<0,05 em comparação ao grupo OVA-veículo.

Avaliação da Expressão de 8-iso-PGF2 α

Na Figura 14 apresentamos os valores da densidade de 8-iso-PGF2 α no septo alveolar. Observamos um aumento na expressão de 8-iso-PGF2 α no septo alveolar das cobaias expostas à ovoalbumina [OVA: 4,93 (3,84–7,50), OVA-1400W: 2,75 (1,90–5,06), OVA-Estresse: 10,61 (5,71–21,09), OVA-Estresse-1400W: 4,07 (3,15–6,93)%] comparativamente aos animais expostos a inalações com salina [(SAL: 4,52 (3,48–5,22), SAL-1400W: 2,83 (1,44–3,42), SAL-Estresse: 4,58 (3,53–6,75), SAL-Estresse-1400W: 3,76 (3,18–4,31)%].

Considerando os animais expostos à ovoalbumina, aqueles submetidos ao estresse apresentaram um aumento na expressão de 8-iso-PGF2 α em comparação aos grupos não estressados ($P < 0,05$ para todas as comparações). O tratamento com 1400W reduziu esta resposta nos animais expostos à ovoalbumina comparativamente aos animais expostos à ovoalbumina que receberam o veículo de 1400W ($P < 0,05$ para todas as comparações).

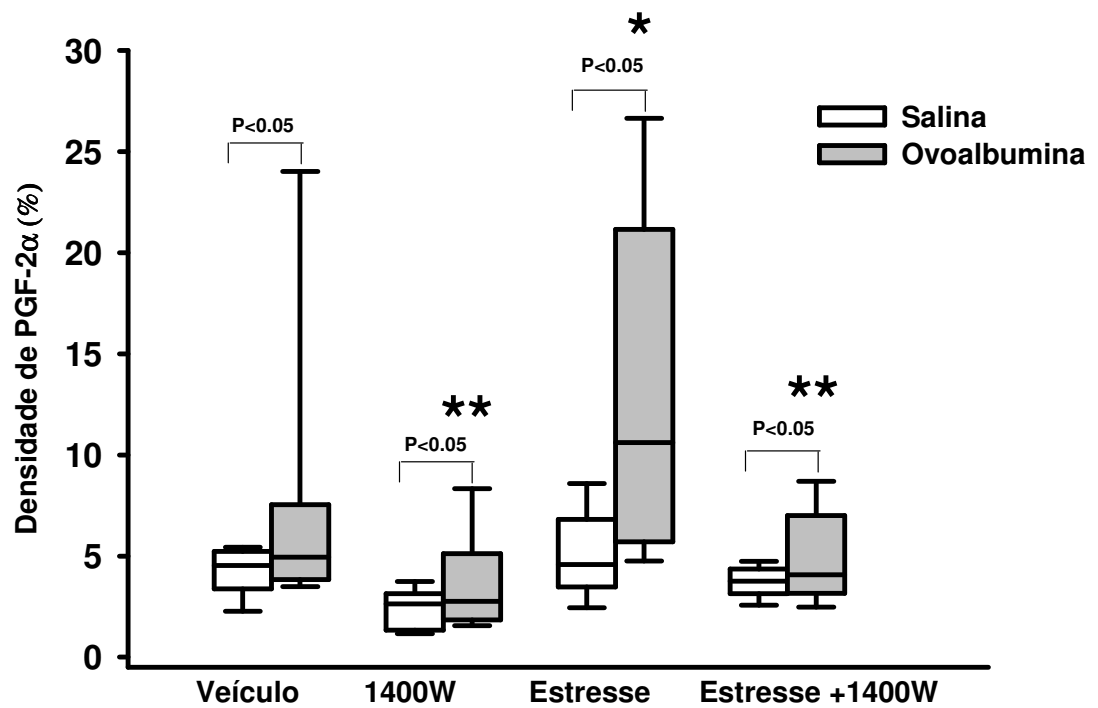


Figura 14. *Box Plots* da densidade de 8-iso-PGF₂α (expresso em percentagem de área) no septo alveolar de cobaias expostas a sete inalações de ovoalbumina ou salina submetidas ou não a estresse repetido e que receberam 1400W ou veículo. *P<0,05 comparado ao grupo ovoalbumina **P<0,05 comparado ao grupo OVA-estresse.

Avaliação da densidade de fibras colágenas

A densidade de fibras colágenas do septo alveolar nos oito grupos experimentais está representada no gráfico da Figura 15. Houve aumento na densidade de fibras colágenas de animais expostos à ovoalbumina [OVA: 5,35 (4,19-7,39), OVA-Estresse: 5,67 (3,26–7,98)%] em relação aos expostos à salina [SAL: 2,13 (1,15–4,21), SAL-Estresse: 4,47 (2,07–5,69)%, $P < 0,05$] apenas quando não foram tratados com 1400W. Nos grupos tratados com 1400W, não houve diferença estatística entre aqueles expostos à ovoalbumina e salina [SAL-1400W x OVA-1400W e SAL-Estresse-1400W x OVA-Estresse-1400W).

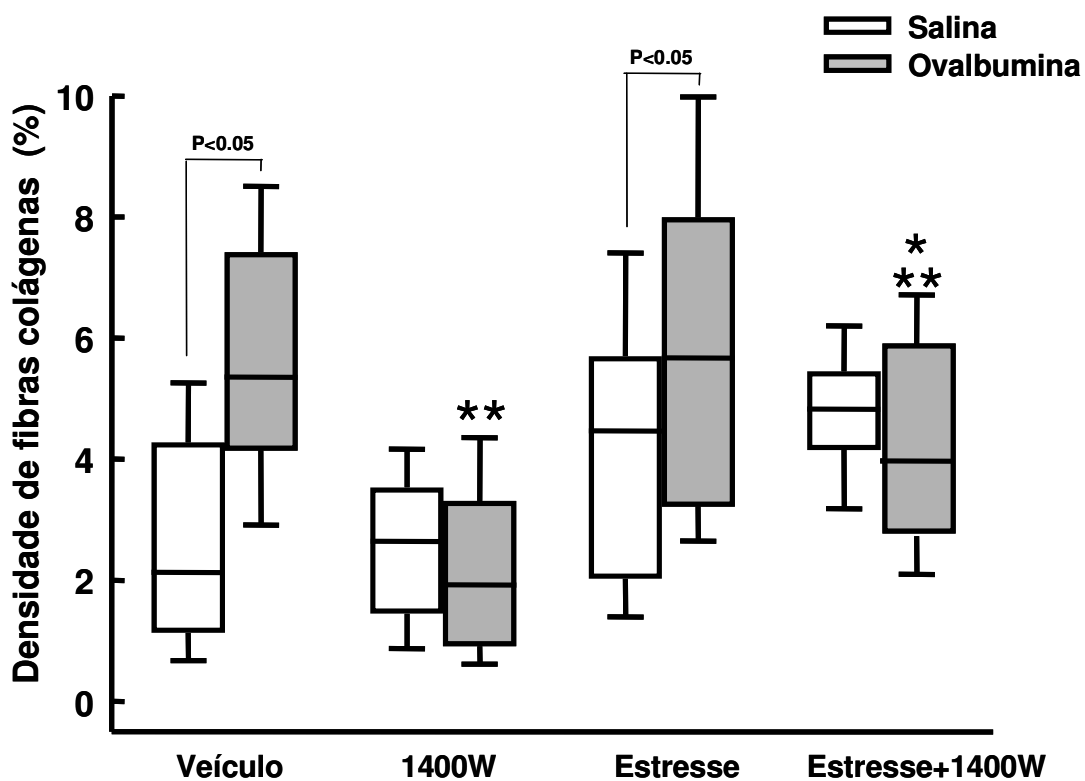
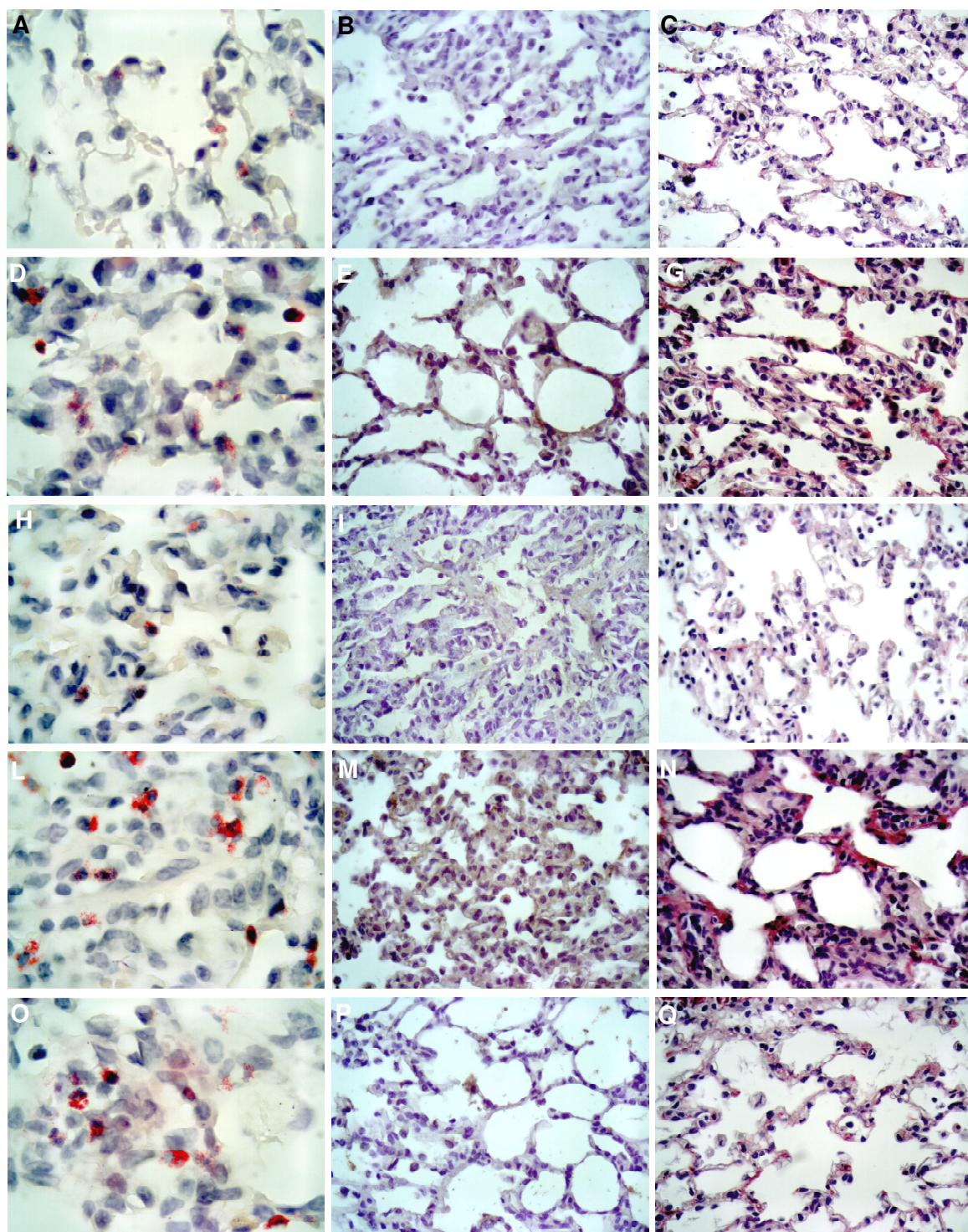


Figura 15. *Box Plots* dos valores de conteúdo de colágeno de septo alveolar de cobaias previamente expostas a sete inalações com ovoalbumina ou salina e submetidas ou não a estresse repetido e que receberam 1400W ou veículo. *P<0,05 em comparação a OVA-1400W; **P<0,05 em comparação aos grupos OVA-veículo e OVA-estresse.



A *Figura 16* mostra fotomicrografias de tecido pulmonar coradas com LUNA (painéis A, D, G, J e M), para expressão de 8-iso-PGF2 α (painéis B, E, H, K, e N), para Picrosirius (painéis C, F, I, L e O), dos animais inalados com salina (painéis A-C) ou os expostos repetidamente à ovoalbumina (painéis D-O), daqueles não estressados e tratados com veículo (D-F), não estressados e tratados com 1400W (G-I), estressados e tratados com veículo (J-L) e estressados e tratados com 1400W (M-O).

Notamos que os animais expostos à ovoalbumina apresentaram uma intensa infiltração eosinofílica, depósito de colágeno e aumento da expressão de 8-iso-PGF2alfa no septo alveolar. O estresse amplificou a resposta eosinofílica e a expressão de 8-iso-PGF2alfa no tecido pulmonar periférico. Embora o tratamento com 1400W reduziu todas alterações nos animais expostos à ovoalbumina mas não submetidos ao estresse, a inibição iNOS reduziu apenas a expressão de 8-iso-PGF2alfa no tecido pulmonar periférico nos animais do grupo OVA-Estresse-1400W.

Avaliação da densidade de células iNOS positivas

A Figura 17 representa o gráfico da densidade de células iNOS positivas na parede alveolar nos grupos analisados. Houve aumento da densidade de células iNOS positivas em animais inalados com OVA [OVA: 35,42 (22,74-51,50), OVA-Estresse: 43,85 (31,69-63,22), OVA-Estresse-1400W: 31,40 (22,43-46,32) células/ $10^4\mu\text{m}^2$] em comparação àqueles inalados com salina em todos os grupos, [SAL: 20,20 (8,05-31,58), SAL-Estresse: 38,74 (29,71-53,59): SAL-1400W: 17,70 (8,13-28,92), SAL-Estresse-1400W: 33,37 (27,42-41,07) células/ $10^4\mu\text{m}^2$, $P < 0,05$ para todas as comparações, exceto no grupo não-estressado tratado com 1400W, SAL-1400W x OVA-1400W]. Houve aumento da densidade de células iNOS positivas nos grupos tratados com ovoalbumina e submetidos ao estresse físico (OVA-Estresse e OVA-Estresse-1400W) em relação aos grupos não-estressados (OVA e OVA-1400W; $P < 0,05$).

O tratamento com 1400W de animais submetidos à inalação de ovoalbumina (OVA-1400W) diminuiu a densidade de células iNOS positivas em comparação ao grupo exposto à ovoalbumina (OVA; $P < 0,05$). Entretanto, em animais estressados e expostos à ovoalbumina, o tratamento com 1400W (OVA-Estresse-1400W) não diminuiu a densidade de eosinófilos em relação ao grupo estressado, exposto à ovoalbumina e não-tratado (OVA-Estresse).

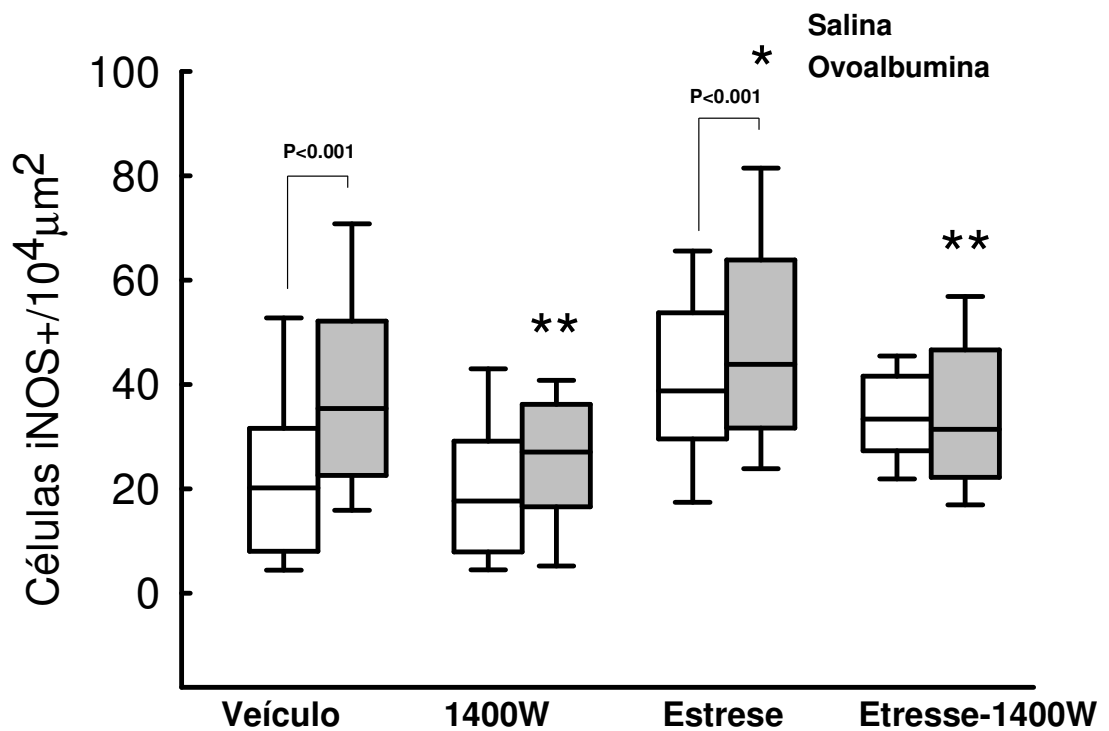


Figura 17. *Box Plots* dos valores da contagem de células iNOS positivas no septo alveolar de cobaias previamente expostas a sete inalações com ovoalbumina ou salina e submetidas ou não a estresse repetido e que receberam 1400W ou veículo. *P<0,05 em comparação a OVA-1400W; **P<0,05 em comparação aos grupos OVA-veículo e OVA-estresse.

Avaliação do conteúdo de actina

Na Figura 18 apresentamos a avaliação do conteúdo de actina no septo alveolar. Observamos um aumento na expressão de actina nas cobaias expostas à ovoalbumina [OVA: 7,21 (4,8–10,44), OVA-1400W: 4,65 (2,39–7,06), OVA-Estresse: 10,44 (7,10–13,03), OVA-Estresse-1400W: 8,85 (6,59–12,25)%] comparativamente aos animais expostos às inalações com salina (SAL: 4,51 (1,96–7,58), SAL-1400W: 4,31 (2,06–7,92), SAL-Estresse: 4,26 (1,65 – 8,49), SAL-Estresse-1400W: 11,47 (9,30–12,50)%].

Considerando os animais expostos à ovoalbumina, aqueles submetidos ao estresse apresentaram um aumento no conteúdo de actina em comparação aos grupos não estressados ($P < 0,05$ para todas as comparações). O tratamento com 1400W reduziu esta resposta nos animais expostos à ovoalbumina comparativamente aos animais expostos à ovoalbumina que receberam o veículo de 1400W ($P < 0,05$ para todas as comparações).

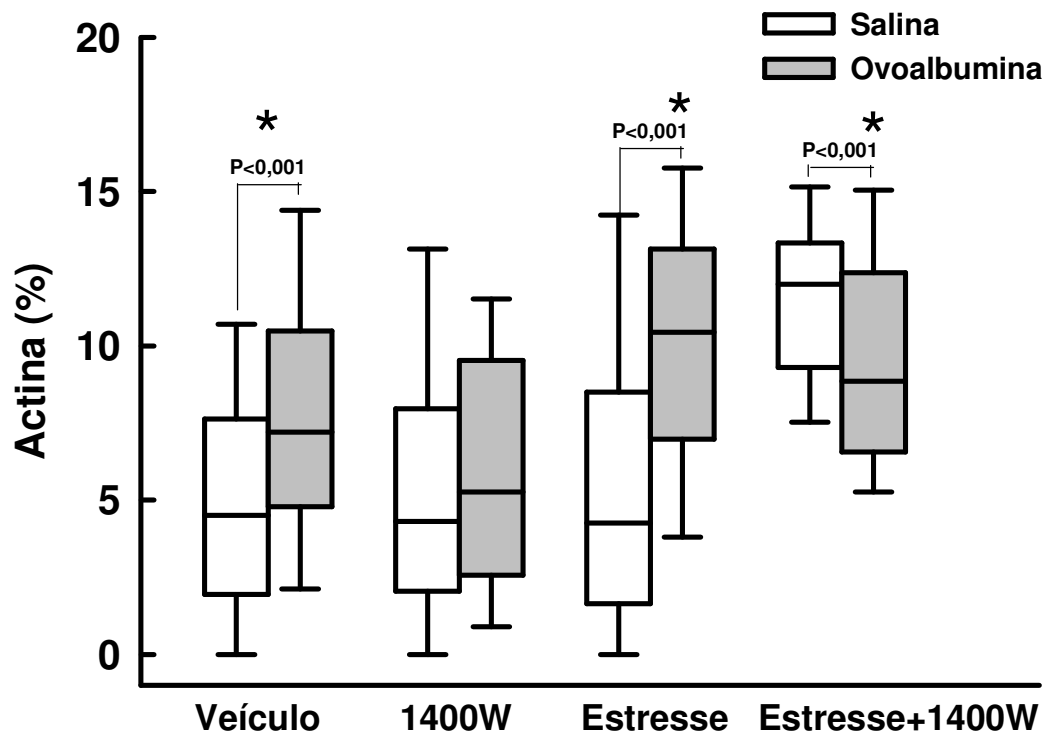
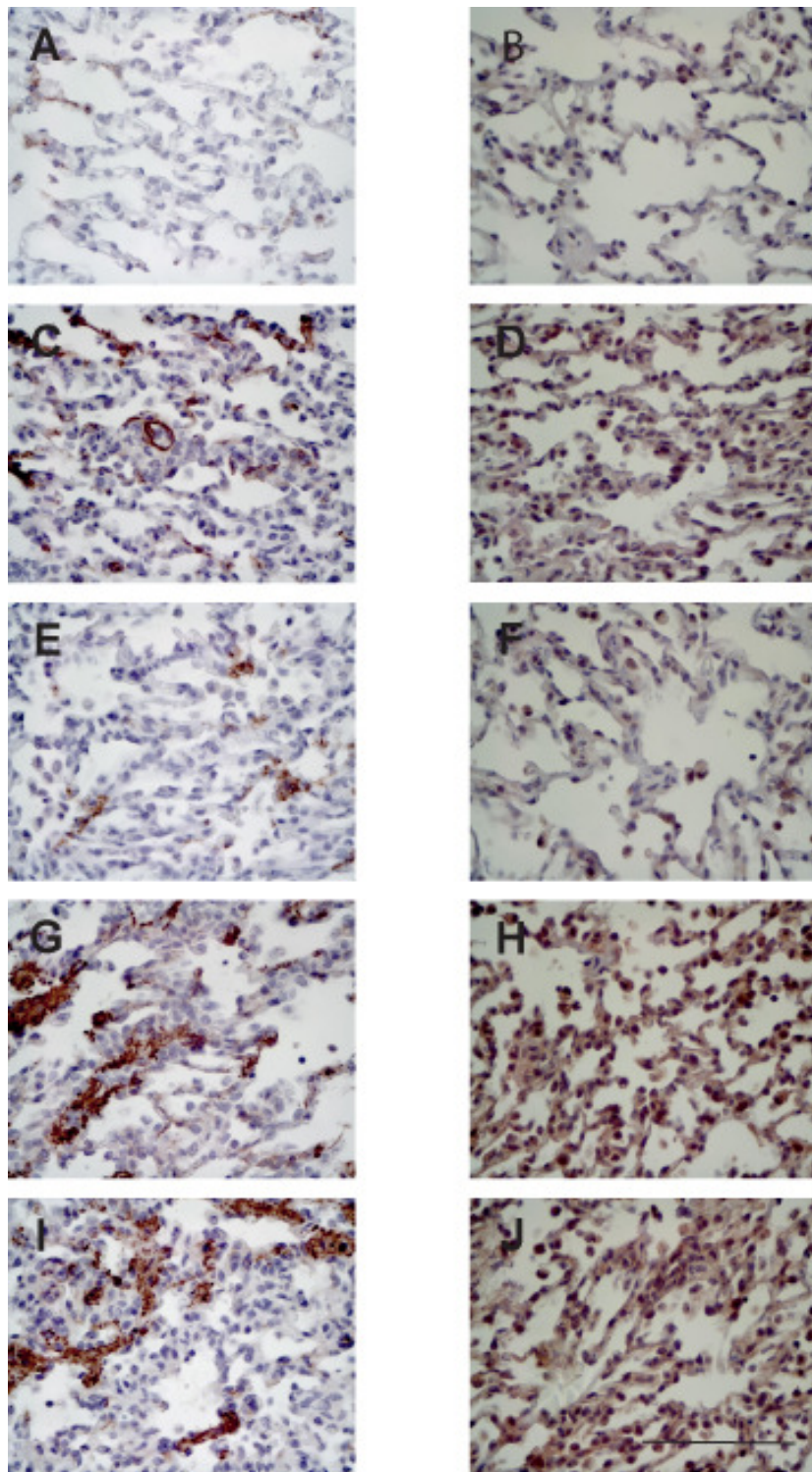


Figura 18. *Box Plots* da percentagem de expressão de actina no septo alveolar de cobaias expostas a sete inalações de ovoalbumina ou salina submetidas ou não a estresse repetido e que receberam 1400W ou veículo. *P<0,05 comparado ao respectivo grupo controle.



A *Figura 19* mostra fotomicrografias de tecido pulmonar coradas com anticorpo para detecção da expressão de iNOS (painéis A, C, E, G, I) e actina (B, D, F, H e J) dos animais inalados com salina (painéis A-B) ou os expostos repetidamente à ovoalbumina (painéis C-J), daqueles não estressados e tratados com veículo (C e D), não estressados e tratados com 1400W (E-F), estressados e tratados com veículo (G-H) e estressados e tratados com 1400W (I-J).

Notamos que os animais expostos à ovoalbumina apresentaram maior expressão de iNOS e actina. O estresse amplificou o número de células positivas para iNOS e a área de actina no septo alveolar. O tratamento 1400W reduziu apenas a expressão de iNOS, não modificando a positividade para actina no parênquima pulmonar distal.

Discussão

Nos últimos anos, um número considerável de estudos tem enfatizado a importância de vários mediadores e moduladores inflamatórios na fisiopatologia da asma (Bousquet, Chané *et al.*, 1992; Bousquet, Jeffery *et al.*, 2000; Holgate, 2001). No entanto, poucos estudos têm-se dedicado a avaliar os efeitos das emoções e estresse na reatividade e histopatologia das vias aéreas e no tecido pulmonar distal (Ritz e Steptoe, 2000; Ritz, Steptoe *et al.*, 2000; Liu, Coe *et al.*, 2002; Wright, Cohen *et al.*, 2005; Miller, Cho *et al.*, 2006). Embora a asma tenha sido considerada inicialmente uma doença das vias aéreas, a contribuição das alterações do parênquima pulmonar na resposta inflamatória e funcional asmática vem sendo proposta recentemente (Montuschi, Corradi *et al.*, 1999; Rocco, Negri *et al.*, 2001).

Considerando que a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) foi detectada em várias células inflamatórias incluindo macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, fibroblastos pulmonares e células epiteliais alveolares do tipo II, elementos celulares estes presentes no parênquima distal e envolvidas na fisiopatologia da asma brônquica (Ricciardolo, 2003; Ricciardolo, Sterk *et al.*, 2004), torna-se relevante, como discutido anteriormente, avaliar o papel da ativação desta isoenzima na modulação das respostas morfofuncionais do parênquima pulmonar decorrentes da presença de um processo inflamatório crônico associado ou não ao estresse físico repetido.

No presente estudo, avaliamos a natação forçada repetida, como agente estressor, em um modelo experimental de inflamação crônica alérgica pulmonar desencadeada por repetidas exposições inalatórias à ovoalbumina e determinamos o papel da inibição da óxido nítrico sintase induzida nestas alterações.

Para tanto, os animais foram submetidos ao tratamento com 1400W, inibidor específico desta óxido nítrico sintase. O 1400W apresenta uma seletividade *in vivo* pelo menos 100 vezes maior que a de outros inibidores, como a aminoguanidina. Considerando que altas doses de 1400W (50 mg/kg i.p.) podem causar efeitos tóxicos, como acometimento cardíaco e neurológico, optamos por utilizar uma dose menor (2 mg/kg i.p. por quatro dias), cuja eficácia terapêutica já foi previamente demonstrada (Prado, Leick-Maldonado *et al.*, 2006; Starling, Prado *et al.*, 2009). No presente estudo notamos que o tratamento com 1400W reduziu as células iNOS positivas nos animais sensibilizados submetidos ou não ao estímulo estressor resultado que, corrobora a eficácia do tratamento com esta droga.

Observamos que as cobaias sensibilizadas e submetidas ao protocolo de estresse apresentaram potencialização da resposta de mecânica de tecido pulmonar periférico, da infiltração eosinofílica, do estresse oxidativo, da expressão de células iNOS positivas, do conteúdo de actina no parênquima distal, do tempo de movimentação destes animais, do peso das adrenais e dos níveis de cortisol sérico. O tratamento com 1400W nestes

animais atenuou todas as respostas com exceção dos níveis de cortisol do conteúdo de actina e do número de eosinófilos.

Em relação à avaliação de comportamento destes animais observamos que houve diferença significativa na velocidade de movimentação dos animais sensibilizados submetidos ou não ao protocolo de estresse físico repetido, comparativamente aos animais controle. Não houve um efeito da indução de estresse neste parâmetro. Estes resultados sugerem que a resposta inflamatória crônica pulmonar e suas repercussões funcionais são capazes de modificar o comportamento destes animais.

Considerando o tempo de movimentação destes animais, somente os animais sensibilizados e submetidos ao estresse físico repetido apresentaram um aumento em relação aos demais grupos. Estes dados sugerem que a natação forçada foi capaz de potencializar as alterações de comportamento induzidas pelo processo inflamatório crônico pulmonar. Por fim, não houve diferença significativa na distância percorrida, no campo aberto, pelos animais dos quatro grupos experimentais. Por problemas técnicos não foi possível avaliar o comportamento dos animais submetidos ao tratamento com 1400W e estes estudos estão sendo repetidos para complementação do estudo

Estudos que avaliam a resposta comportamental desencadeada pelo estresse sugerem que, na avaliação em campo aberto, haveria uma

tendência ao imobilismo destes animais (Portela Cde, Tiberio Ide *et al.*, 2002; Portela, Leick-Maldonado *et al.*, 2007). Em nosso estudo a distância percorrida não foi diferente entre os grupos. Contudo, os animais apresentavam um aumento na velocidade de deslocamento, que é detectada pelo deslocamento do centro de massa do animal. Cabe ressaltar que os estudos de comportamento do presente trabalho foram realizados 48 horas após a última inalação com ovoalbumina e 24 horas antes da realização da mecânica pulmonar. Nesse momento, os animais sensibilizados encontram-se na primeira resposta tardia, ou seja, com aumento da resposta inflamatória e constrição pulmonar tanto de vias aéreas quanto de parênquima distal (Lancas, Kasahara *et al.*, 2006). Sendo assim, consideramos que este desconforto respiratório pode ter justificado esta agitação dos animais sensibilizados, a qual parece, em vários aspectos, potencializada pela exposição ao estresse repetido.

Em estudo anterior observamos que o estresse físico repetido modulava a resposta de mecânica do sistema respiratório em cobaias com inflamação alérgica pulmonar. Em relação à avaliação de elastância do sistema respiratório (Ers) pudemos concluir que o estresse crônico induzido pela natação forçada, não alterou os valores basais. Contudo, observamos uma potencialização da resposta máxima da Ers após o desafio antigênico nos animais sensibilizados e submetidos ao protocolo de natação forçada em relação aos animais apenas sensibilizados.

Neste mesmo estudo em relação à resistência do sistema respiratório também notamos que os valores basais de resistência do sistema respiratório (Rrs) já estavam aumentados, tanto nos animais apenas sensibilizados, quanto nos sensibilizados e submetidos ao estresse físico repetido. No entanto, não houve potencialização da resposta máxima de Rrs após o desafio com ovoalbumina nos animais sensibilizados e submetidos ao protocolo de natação forçada.

No presente trabalho, confirmamos nossos resultados anteriores que mostravam que a exposição à ovoalbumina induz responsividade do tecido pulmonar tanto específica quanto inespecífica ao antígeno. Isto se associou a um aumento na inflamação tecidual pulmonar, principalmente caracterizada por eosinófilos, e a um processo reparador causado por deposição de fibras colágenas nos septos alveolares (Angeli, Prado *et al.*, 2008; Nakashima, Prado *et al.*, 2008).

Em relação à mecânica do tecido pulmonar periférico, os efeitos do estresse físico repetido também foram previamente avaliados em cobaias com inflamação alérgica crônica. Notamos que as cobaias sensibilizadas e submetidas ao estresse físico repetido apresentaram uma potencialização da resposta de resistência e elastância tecidual após desafio antigênico em relação aos animais não estressados, mas com processo inflamatório crônico pulmonar.

Como citado inicialmente, no grupo de animais sensibilizados, o tratamento com 1400W atenuou a resposta de elastância e resistência tecidual nos animais estressados em relação aos seus controles sensibilizados e estressados. Em relação à resposta constritora de parênquima pulmonar distal descrita é interessante notar que a avaliação imunohistoquímica para detecção do conteúdo de actina demonstrou um aumento nos animais sensibilizados, o qual foi potencializado pelo estímulo representado pelo estresse físico repetido mas não foi atenuado pelo tratamento com 1400W.

Podemos aventar algumas hipóteses para explicar os efeitos de atenuação das respostas de mecânica tecidual pulmonar nos animais tratados com 1400W. Neste sentido, a diminuição da produção do NO derivado da iNOS, provavelmente secundária a uma redução no número de células positivas para iNOS, poderia atenuar as respostas do estresse oxidativo, assim como reduzir o número de eosinófilos, o conteúdo de fibras colágenas, o que já foi demonstrado previamente em vias aéreas e em parênquima pulmonar periférico (Prado, Leick-Maldonado *et al.*, 2006). Em conjunto, estas alterações podem ter contribuído para as alterações funcionais observadas.

Outro aspecto a ser discutido se refere à potencialização da produção de peroxinitritos pelo aumento da expressão de iNOS. Este agente oxidante é formado pela interação entre o NO e o superóxido. Os peroxinitritos

contribuem para a peroxidação lipídica e geração de isoprostanos a partir do ácido araquidônico. Os isoprostanos contribuem para a contração do músculo liso agindo por intermédio da tirosina quinase, Rho and Rho quinase levando a diminuição da atividade da fosfatase de cadeia leve da miosina, aumentando o nível de miosina fosforilada de cadeia leve e a contração de células musculares lisas e miofibroblastos (Morris, 2003).

Neste sentido, Angeli et al. (2008) demonstraram que o tratamento com L-NAME, falso substrato para todas as óxido nítrico sintases, foi capaz de reduzir as respostas de estresse oxidativo, marcadas pela expressão do isoprostanos $\text{PGF2}\alpha$, e reduzir o conteúdo de fibras elásticas no parênquima pulmonar, previamente aumentadas pelo estímulo inflamatório crônico. Estas alterações se associaram à atenuação da resposta contrátil do parênquima pulmonar periférico. Starling et al. (2009) demonstraram que o tratamento com 1400W atenuou as respostas de mecânica pulmonar, a infiltração eosinofílica, a expressão de iNOS, de isoprostanos $\text{PGF2}\alpha$ e o conteúdo de fibras elásticas no parênquima pulmonar em cobaias com inflamação alérgica crônica.

Vários estudos sugerem uma interação do estresse e a resposta funcional e inflamatória presente em asmáticos (Weil, Wade *et al.*, 1999). A maior parte dos autores conclui que o estresse desempenha um importante papel na fisiopatologia da asma, porém os mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos, sendo ainda necessários estudos clínicos e

experimentais para o melhor entendimento da importância do estresse. Aventa-se que o tipo de evento estressor e a sua duração podem modular a resposta inflamatória de diferentes formas(Chen e Miller, 2007).

Em estudos experimentais, Portela et al. (2007) avaliaram os efeitos de choques elétricos como agente estressor, na mecânica pulmonar de ratos sensibilizados à ovoalbumina. Além disso, avaliaram a influência de neuropeptídios na resposta mecânica de vias aéreas destes animais. Os autores concluíram que o tônus da musculatura lisa pulmonar foi influenciado pelo estresse e pelos neuropeptídios. Chida et al. (2007) estudaram camundongos BALB/C submetidos a estresse psicológico ou físico (durante a quarta semana de vida). Na oitava e décima semana de vida os ratos foram sensibilizados à ovoalbumina. Este estudo mostrou que o estresse psicológico e físico nas primeiras semanas de vida destes animais agravou a reatividade à metacolina e a inflamação brônquica.

Forsythe et al. (2004) estudaram o efeito do estresse agudo (3 dias) e crônico (7 dias), em camundongos, utilizando a restrição de movimento e a natação forçada como indutores do estresse. Os autores observaram diminuição de células inflamatórias e aumento na expressão de IL-6, IL-9 e IL-13 nos animais estressados agudamente. Nos animais estressados cronicamente houve aumento no número de células inflamatórias, porém não houve alteração do perfil de citocinas produzidas. A responsividade

inespecífica à metacolina não apresentou alteração quando acessada pela pletismografia de corpo inteiro.

Utilizando um antagonista do receptor de neurocinina-1, Joachim et al. (2004), observaram aumento na hiperresponsividade brônquica em camundongos sensibilizados com ovoalbumina e estressados. Os autores avaliaram a hiperresponsividade *in vitro* e avaliaram a resposta inflamatória utilizando o lavado broncoalveolar. Os animais estressados tiveram aumento, tanto na hiperresponsividade brônquica, quanto no número de células inflamatórias (linfócitos, eosinófilos, granulócitos e macrófagos). Porém, o tratamento com o antagonista do receptor de neurocinina-1 bloqueou este aumento no grupo estressado, sugerindo um importante papel deste neuropeptídeo na modulação dos efeitos do estresse na inflamação alérgica pulmonar.

Em humanos, Ritz et al. (2000) induziram diferentes emoções, por meio de pequenos filmes, e avaliaram a resistência de vias aéreas de pacientes asmáticos, utilizando a técnica de oscilação forçada. Os autores observaram que a depressão e o estresse estão associados a aumento na resistência das vias aéreas em asmáticos.

McQuaid *et al.* (2000) também estudaram a resistência de vias aéreas em crianças asmáticas submetidas a uma situação estressante, de caráter psicológico e de leve intensidade. Como ferramenta de estudo para

avaliação das alterações funcionais, os autores utilizaram a técnica de oscilação forçada. Tanto os asmáticos, quanto os não asmáticos tiveram variações na resistência quando submetidos ao estresse. Porém, os indivíduos asmáticos apresentaram aumento maior do que 20%, em relação aos valores basais (Mcquaid, Fritz *et al.*, 2000).

Laube *et al.* (2003) verificaram o efeito do estresse agudo em mulheres asmáticas. Os autores observaram uma diminuição do VEF₁, quando relatavam algum evento “traumático” de suas vidas durante a consulta (Laube, Curbow *et al.*, 2003).

No presente estudo, observamos aumento na densidade de eosinófilos no parênquima pulmonar distal de cobaias sensibilizadas por ovoalbumina (grupo OVA). O estresse físico repetido aumentou esta resposta. Apesar da inibição da iNOS ter reduzido o número de eosinófilos em animais sensibilizados (grupo OVA-1400W), não observamos este efeito em animais sensibilizados e estressados (grupo OVA-Estresse-1400W).

Alguns estudos investigaram os efeitos do estresse sobre inflamação e função das vias aéreas (Liu, Coe *et al.*, 2002; Forsythe, Ebeling *et al.*, 2004; Hoglund, Axen *et al.*, 2006; Chida, Sudo *et al.*, 2007; Portela, Leick-Maldonado *et al.*, 2007). No entanto, os efeitos do estresse sobre o recrutamento de eosinófilos ainda não estão adequadamente esclarecidos. Há alguns estudos avaliando os efeitos da inflamação crônica sobre o

recrutamento eosinofílico no parênquima pulmonar distal, embora não houvesse estudos prévios analisando os efeitos da inibição da iNOS nas respostas funcionais e histopatológicas induzidas pelo do estresse no tecido pulmonar distal. Neste sentido, Lanças et al. (2006) demonstraram que exposição repetida à ovoalbumina em cobaias induz um aumento na densidade eosinofílica alveolar em respostas precoces e tardias. Nakashima et al. (2008) demonstraram que a tolerância oral reduziu o recrutamento de eosinófilos induzido por exposição repetida à ovoalbumina no parênquima pulmonar distal. Tibério et al. (2003) demonstraram que tanto substância P (SP) quanto neurocinina A (NKA) contribuem para o recrutamento de eosinófilos nas vias aéreas distais e na parede alveolar. Em concordância com esses estudos, Prado et al. (2006) demonstraram que a inibição da iNOS por 1400W atenuou o recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas.

Portela et al. (2002) observaram que em ratos sensibilizados e estressados houve aumento significativo no edema na parede de vias aéreas e no recrutamento de células linfomononucleares em vias aéreas, e tais efeitos foram atenuados por tratamento com diazepam. Os autores não encontraram diferenças no número de eosinófilos encontrados nas paredes de vias aéreas. Por outro lado, Capelozzi et al. (2007) encontraram aumento da densidade de eosinófilos nas paredes alveolares de animais submetidos à natação forçada. O tratamento com fluoxetina reduziu a infiltração de eosinófilos. Em humanos Liu et al. (2002) observaram aumento no nível de eosinófilos de escarro após 6 e 24 horas de desafio antigênico em 20

estudantes universitários com asma leve. Este efeito foi potencializado durante um período de estresse (semana de provas finais).

Sabe-se que alguns moduladores da resposta do estresse podem ter diferentes efeitos no recrutamento e apoptose de eosinófilos. Com a ativação do eixo HPA, os glicocorticóides podem induzir apoptose de eosinófilos, mesmo na presença de citocinas liberadas pela resposta inflamatória asmática que, como se sabe, podem prolongar a sobrevivência de eosinófilos como, por exemplo, IL-3, IL-5 e GM-CSF (Nittoh, Fujimori *et al.*, 1998; Machida, Inoue *et al.*, 2005). Por outro lado, concentrações elevadas dessas citocinas pró-inflamatórias inibem os efeitos pró-apoptóticos dos glicocorticóides (Nittoh, Fujimori *et al.*, 1998). Machida *et al.* (2005) demonstraram que a incubação de eosinófilos humanos com isoproterenol ou formoterol (agonistas β_2 -adrenérgico) foi capaz de inibir a apoptose espontânea de eosinófilos e a apoptose induzida pela ativação de *Fas*.

Considerando os efeitos de diferentes mediadores sobre inflamação eosinofílica induzida por situações estressantes, é importante notar que a complexidade destas interações enfatiza a necessidade de estudos futuros que possam esclarecer quais os mecanismos celulares envolvidos.

Apesar de, neste estudo, termos encontrado aumento da densidade de colágeno nos septos alveolares nos animais expostos à ovoalbumina em comparação aos expostos à salina, não houve diferença significativa entre

os grupos sensibilizados submetidos ou não ao protocolo de estresse físico repetido. Estes resultados sugerem que, embora a natação forçada tenha aumentado a infiltração eosinofílica no tecido pulmonar, isso não afetou o remodelamento tecidual pulmonar. A inibição da iNOS reduziu a densidade de colágeno em animais expostos à ovoalbumina, tanto naqueles estressados quando nos não-estressados.

Alguns estudos mostram que as catecolaminas, moduladores de resposta aguda ao estresse, podem atuar como moduladores da expressão de metaloproteinases (MMPs) (Briest, Holzl *et al.*, 2003). (Yang, Sood *et al.*, 2006) demonstraram que o tratamento com norepinefrina aumentou os níveis de MMP-2, MMP-9 e VEGF. Briest *et al.* (2003) estudaram a importância de MMPs no remodelamento cardíaco induzido por norepinefrina em ratos. Após três dias de infusão contínua de norepinefrina, a atividade de MMP-2 estava elevada em ambos os ventrículos.

Como, no presente estudo avaliamos os efeitos do estresse físico crônico, é possível que corticosteróides e os neuropeptídeos estejam mais diretamente envolvidos nestas respostas morfológicas. Nesse sentido, Miller *et al.* (2006) demonstraram que os corticosteróides inibem a expressão de TGF- β 1 em eosinófilos e macrófagos. Isso seria uma possível explicação para o que parece ser um paradoxo, já que o estresse físico crônico aumentou o recrutamento de eosinófilos sem causar efeito significativo na quantidade de fibras colágenas. Tais dados reafirmam a idéia de que a

modulação das alterações da matriz extracelular induzidas por resposta crônica ao estresse ainda necessita de esclarecimentos quanto aos mecanismos envolvidos.

As vias de ativação do estresse oxidativo têm um papel importante na regulação dos mediadores inflamatórios envolvidos com a atopia (Torres, Torres *et al.*, 2004); (Wright, Cohen *et al.*, 2005; Umetsu e Dekruyff, 2006). O estresse oxidativo ocorre quando o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes pende a favor das substâncias pró-oxidantes (Torres, Torres *et al.*, 2004). Torres *et al.* (2004) demonstraram que ratos submetidos a estresse crônico variável apresentaram aumento na peroxidação lipídica pulmonar.

Em humanos, (Sivonova, Zitnanova *et al.*, 2004) investigaram uma conexão entre estresse psicológico causado por provas em estudantes universitários e estresse oxidativo. Os autores demonstraram que condições de estresse induzem dano oxidativo ao DNA, aumento da oxidação lipídica e queda na atividade plasmática antioxidante. (Fitzpatrick, Teague *et al.*, 2009) demonstraram que crianças com asma persistente grave apresentam aumento de vários biomarcadores de estresse oxidativo no fluido do lavado broncoalveolar, sinalizando um aumento na resposta oxidativa.

A produção de óxido nítrico derivada da iNOS levando à potencialização da mecânica tecidual é pouco compreendida, mas pode

estar relacionada à promoção da produção de peroxinitritos. Este agente oxidativo é formado através da interação de NO e superóxido, que causa peroxidação lipídica e geração de isoprostanos (8-iso-PGF 2α). Com estudos imunohistoquímicos é possível identificar PGF- 2α , a principal substância da família dos isoprostanos produzida pela peroxidação de ácido araquidônico, como marcador da resposta de estresse oxidativo (Pryor e Squadrito, 1995; Muijsers, Folkerts *et al.*, 1997).

Neste trabalho também avaliamos a expressão de 8-iso-PGF 2α no septo alveolar. Houve aumento no grupo sensibilizado e estressado comparativamente ao grupo de animais apenas sensibilizados. A inibição de iNOS reduziu a densidade de 8-isoprostane nestes dois grupos. Outros autores já demonstraram previamente que a inibição de todas as óxido nítrico sintases pelo tratamento com L-NAME e 1400W reduziram a expressão de 8-iso-isoprostano no septo alveolar em cobaias com inflamação alérgica crônica (Angeli, Prado *et al.*, 2008; Starling, Prado *et al.*, 2009).

Em modelos experimentais,(Jonasson, Hjoberg *et al.*, 2009) demonstraram em modelo de inflamação pulmonar aguda que os níveis de isoprostano PGF 2α no fluido do lavado broncoalveolar apresentavam-se aumentados assim como a reatividade brônquica. No entanto, estes animais não receberam tratamentos específicos ou foram submetidos à exposição ao estresse físico repetido. Embora haja estudos avaliando o papel do

exercício, particularmente excessivo e repetido, como potencializador das respostas do estresse oxidativo (Gomez-Cabrera, Domenech *et al.*, 2008) que como vimos também pode ser dependente da ativação de iNOS, não encontramos na literatura estudos que avaliassem os efeitos do tratamento com inibidor seletivo da iNOS na repercussões morfofuncionais desencadeadas pela potencialização da inflamação crônica induzida pelo estresse físico repetido.

Conclusões

Deste modo podemos concluir que:

1. O estresse físico repetido potencializou a alterações de comportamento destes animais, caracterizadas por agitação psicomotora, previamente aumentadas pela resposta inflamatória crônica pulmonar induzida por repetidas inalações com ovoalbumina. Bem como o aumento do infiltrado eosinofílico, actina, células iNOS positivas, níveis de cortisol sérico e as respostas de mecânica pulmonar oscilatória de tecido pulmonar periférico.
2. Não houve potencialização pelo estresse físico repetido do remodelamento de matriz extracelular, no que se refere ao conteúdo total de colágeno, neste modelo animal de inflamação alérgica crônica.
3. A inibição da óxido nítrico sintase induzida contribui para o controle da resposta de mecânica oscilatória de tecido pulmonar periférico, do número de células iNOS positivas e do conteúdo de isoprostano $PGF2\alpha$ no parênquima pulmonar distal dos animais submetidos ao estresse e às inalações repetidas de ovoalbumina.

Referências

Angeli, P., C. M. Prado, *et al.* Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.294, n.6, Jun, p.L1197-205. 2008.

Annau, Z. e L. J. Kamin. The conditioned emotional response as a function of intensity of the US. J Comp Physiol Psychol, v.54, Aug, p.428-32. 1961.

Armario, A., O. Marti, *et al.* Long-term effects of a single exposure to immobilization on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: neurobiologic mechanisms. Ann N Y Acad Sci, v.1018, Jun, p.162-72. 2004.

Armario, A., A. Valles, *et al.* A single exposure to severe stressors causes long-term desensitisation of the physiological response to the homotypic stressor. Stress, v.7, n.3, Sep, p.157-72. 2004.

Bachofen, H. Lung tissue resistance and pulmonary hysteresis. J Appl Physiol, v.24, n.3, Mar, p.296-301. 1968.

Barnes, P. J. Molecular mechanisms of glucocorticoid action in asthma. Pulm Pharmacol Ther, v.10, n.1, p.3-19. 1997.

Bassani, R. A. e S. De Moraes. Effects of footshock stress on the sensitivity of the isolated rat pacemaker to catecholamines. Braz J Med Biol Res, v.20, n.3-4, p.467-70. 1987.

_____. Functional beta 2-adrenoceptors in right atria isolated from footshock-stressed rats. Braz J Med Biol Res, v.21, n.3, p.557-9. 1988.

Belvisi, M., P. J. Barnes, *et al.* Nitric oxide synthase activity is elevated in inflammatory lung disease in humans. Eur J Pharmacol, v.283, n.1-3, Sep 5, p.255-8. 1995.

Bergeron, C. e L. P. Boulet. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. Chest, v.129, n.4, Apr, p.1068-87. 2006.

Black, P. H. Central nervous system-immune system interactions: psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. Antimicrob Agents Chemother, v.38, n.1, Jan, p.1-6. 1994.

Bousquet, J., P. Chanez, *et al.* Eosinophilic inflammation in asthma. N Engl J Med, v.323, n.15, Oct 11, p.1033-9. 1990.

_____. Asthma: a disease remodeling the airways. Allergy, v.47, n.1, Feb, p.3-11. 1992.

Bousquet, J., P. K. Jeffery, *et al.* Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. Am J Respir Crit Care Med, v.161, n.5, May, p.1720-45. 2000.

Brenner, B. E. Where have we been? The history of acute asthma.: Marcel Dekker. 1999 (Emergency Asthma)

Briest, W., A. Holzl, *et al.* Significance of matrix metalloproteinases in norepinephrine-induced remodelling of rat hearts. Cardiovasc Res, v.57, n.2, Feb, p.379-87. 2003.

Broadhurst, P. L. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. Fortschr Psychosom Med, v.1, p.63-9. 1960.

Bruner, C. A. e I. Vargas. The activity of rats in a swimming situation as a function of water temperature. Physiol Behav, v.55, n.1, Jan, p.21-8. 1994.

Cabral, A. L., G. M. Conceicao, *et al.* Exercise-induced bronchospasm in children: effects of asthma severity. Am J Respir Crit Care Med, v.159, n.6, Jun, p.1819-23. 1999.

Callia, M. L. e S. De Moraes. Heterogeneity of beta adrenoceptors in right atria isolated from cold-exposed rats. J Pharmacol Exp Ther, v.230, n.2, Aug, p.450-4. 1984.

Capaz, F. R. e S. De Moraes. Reduction by acute restraint stress of noradrenaline sensitivity in the isolated pacemaker of the rat. Eur J Pharmacol, v.147, n.2, Mar 1, p.295-8. 1988.

Carroll, N., C. Cooke, *et al.* The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large and small airways of asthmatics. Eur Respir J, v.10, n.2, Feb, p.292-300. 1997.

Chen, E. e G. E. Miller. Stress and inflammation in exacerbations of asthma. Brain Behav Immun, v.21, n.8, Nov, p.993-9. 2007.

Chida, Y., N. Sudo, *et al.* Early-life psychological stress exacerbates adult mouse asthma via the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. Am J Respir Crit Care Med, v.175, n.4, Feb 15, p.316-22. 2007.

Chrousos, G. P. e P. W. Gold. A healthy body in a healthy mind--and vice versa--the damaging power of "uncontrollable" stress. J Clin Endocrinol Metab, v.83, n.6, Jun, p.1842-5. 1998.

Cohen, S. G. Asthma in antiquity: the Ebers Papyrus. Allergy Proc, v.13, n.3, May-Jun, p.147-54. 1992.

Cole, M. A., B. A. Kalman, *et al.* Selective blockade of the mineralocorticoid receptor impairs hypothalamic-pituitary-adrenal axis expression of habituation. J Neuroendocrinol, v.12, n.10, Oct, p.1034-42. 2000.

Cowley, D. S. e P. P. Roy-Byrne. Hyperventilation and panic disorder. Am J Med, v.83, n.5, Nov, p.929-37. 1987.

Cox, R. H., J. W. Hubbard, *et al.* Cardiovascular and sympathoadrenal responses to stress in swim-trained rats. J Appl Physiol, v.58, n.4, Apr, p.1207-14. 1985.

Culotta, E. e D. E. Koshland, Jr. NO news is good news. Science, v.258, n.5090, Dec 18, p.1862-5. 1992.

De Sanctis, G. T., J. A. Maclean, *et al.* Contribution of nitric oxide synthases 1, 2, and 3 to airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of asthma. J Exp Med, v.189, n.10, May 17, p.1621-30. 1999.

Deykin, A., O. Halpern, *et al.* Expired nitric oxide after bronchoprovocation and repeated spirometry in patients with asthma. Am J Respir Crit Care Med, v.157, n.3 Pt 1, Mar, p.769-75. 1998.

Dirks, J. F., K. H. Fross, *et al.* Panic-fear in asthma: generalized personality trait vs. specific situational state. J Asthma Res, v.14, n.4, Jul, p.161-7. 1977.

Dirks, J. F., N. F. Jones, *et al.* Panic-fear: a personality dimension related to intractability in asthma. Psychosom Med, v.39, n.2, Mar-Apr, p.120-6. 1977.

Djukanovic, R., W. R. Roche, *et al.* Mucosal inflammation in asthma. Am Rev Respir Dis, v.142, n.2, Aug, p.434-57. 1990.

Djukanovic, R., J. W. Wilson, *et al.* Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. Am Rev Respir Dis, v.142, n.4, Oct, p.863-71. 1990.

Elenkov, I. J., E. L. Webster, *et al.* Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. Ann N Y Acad Sci, v.876, Jun 22, p.1-11; discussion 11-3. 1999.

Fitzpatrick, A. M., W. G. Teague, *et al.* Airway glutathione homeostasis is altered in children with severe asthma: evidence for oxidant stress. J Allergy Clin Immunol, v.123, n.1, Jan, p.146-152 e8. 2009.

Flugge, G. Regulation of monoamine receptors in the brain: dynamic changes during stress. Int Rev Cytol, v.195, p.145-213. 2000.

Forsythe, P., C. Ebeling, *et al.* Opposing effects of short- and long-term stress on airway inflammation. Am J Respir Crit Care Med, v.169, n.2, Jan 15, p.220-6. 2004.

Furchgott, R. F. e J. V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature, v.288, n.5789, Nov 27, p.373-6. 1980.

Gao, P. S., H. Kawada, *et al.* Variants of NOS1, NOS2, and NOS3 genes in asthmatics. Biochem Biophys Res Commun, v.267, n.3, Jan 27, p.761-3. 2000.

Garcia-Marquez, C. e A. Armario. Chronic stress depresses exploratory activity and behavioral performance in the forced swimming test without altering ACTH response to a novel acute stressor. Physiol Behav, v.40, n.1, p.33-8. 1987.

Garcia, M. L., P. S. Paiva, *et al.* Airway and pulmonary tissue responses to platelet-activating factor in rats. Exp Lung Res, v.20, n.3, May-Jun, p.169-84. 1994.

Gina. GINA - the Global Initiative For Asthma 2008.

Glavin, G. B., W. P. Pare, *et al.* Restraint stress in biomedical research: an update. Neurosci Biobehav Rev, v.18, n.2, Summer, p.223-49. 1994.

Gomez-Cabrera, M. C., E. Domenech, *et al.* Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. Free Radic Biol Med, v.44, n.2, Jan 15, p.126-31. 2008.

Haley, K. J., M. E. Sunday, *et al.* Inflammatory cell distribution within and along asthmatic airways. Am J Respir Crit Care Med, v.158, n.2, Aug, p.565-72. 1998.

Hamid, Q. A. Peripheral inflammation is more important than central inflammation. Respir Med, v.91 Suppl A, Nov, p.11-2. 1997.

Harri, M. N., L. Melender, *et al.* Changed chronotropic sensitivity to sympathomimetic amines in isolated atria from rats following cold acclimation. Experientia, v.30, n.9, Sep 15, p.1041-3. 1974.

Hoglund, C. O., J. Axen, *et al.* Changes in immune regulation in response to examination stress in atopic and healthy individuals. Clin Exp Allergy, v.36, n.8, Aug, p.982-92. 2006.

Holgate, S. T. Inflammatory and structural changes in the airways of patients with asthma. Respir Med, v.94 Suppl D, Sep, p.S3-6. 2000.

_____. What does inflammation and airway remodeling mean? Clin Exp Allergy Rev, v.1, n.2, p.59-61. 2001.

Hunt, L. W., Jr., M. D. Silverstein, *et al.* Accuracy of the death certificate in a population-based study of asthmatic patients. JAMA, v.269, n.15, Apr 21, p.1947-52. 1993.

Ignarro, L. J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. J Physiol Pharmacol, v.53, n.4 Pt 1, Dec, p.503-14. 2002.

Irwin, M. Stress-induced immune suppression: role of brain corticotropin releasing hormone and autonomic nervous system mechanisms. Adv Neuroimmunol, v.4, n.1, p.29-47. 1994.

Joachim, R. A., D. Quarcoo, *et al.* Stress enhances airway reactivity and airway inflammation in an animal model of allergic bronchial asthma. Psychosom Med, v.65, n.5, Sep-Oct, p.811-5. 2003.

Jonasson, S., J. Hjoberg, *et al.* Allergen-induced formation of F2-isoprostanes in a murine asthma model identifies oxidative stress in acute

airway inflammation in vivo. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, v.80, n.1, Jan, p.1-7. 2009.

Kalen, P., E. Rosegren, *et al.* Hippocampal Noradrenaline and Serotonin Release over 24 Hours as Measured by the Dialysis Technique in Freely Moving Rats: Correlation to Behavioural Activity State, Effect of Handling and Tail-Pinch. Eur J Neurosci, v.1, n.3, May, p.181-188. 1989.

Katz, R. J. e S. Hersh. Amitriptyline and scopolamine in an animal model of depression. Neurosci Biobehav Rev, v.5, n.2, Summer, p.265-71. 1981.

Keeney, E. L. The History of Asthma from Hippocrates to Meltzer. J Allergy Clin Immunol, v.35, May-Jun, p.215-26. 1964.

Kennett, G. A., S. L. Dickinson, *et al.* Central serotonergic responses and behavioural adaptation to repeated immobilisation: the effect of the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone. Eur J Pharmacol, v.119, n.3, Dec 17, p.143-52. 1985.

Kips, J. C., G. P. Anderson, *et al.* Murine models of asthma. Eur Respir J, v.22, n.2, Aug, p.374-82. 2003.

Kips, J. C., C. A. Cuvelier, *et al.* Effect of acute and chronic antigen inhalation on airway morphology and responsiveness in actively sensitized rats. Am Rev Respir Dis, v.145, n.6, Jun, p.1306-10. 1992.

Kraft, M., R. Djukanovic, *et al.* Alveolar tissue inflammation in asthma. Am J Respir Crit Care Med, v.154, n.5, Nov, p.1505-10. 1996.

Kumar, R. K. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy? Pharmacol Ther, v.91, n.2, Aug, p.93-104. 2001.

Lacza, Z., J. A. Snipes, *et al.* Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. Free Radic Biol Med, v.35, n.10, Nov 15, p.1217-28. 2003.

Lancas, T., D. I. Kasahara, *et al.* Comparison of early and late responses to antigen of sensitized guinea pig parenchymal lung strips. J Appl Physiol, v.100, n.5, May, p.1610-6. 2006.

Laube, B. L., B. A. Curbow, *et al.* Early pulmonary response to allergen is attenuated during acute emotional stress in females with asthma. Eur Respir J, v.22, n.4, Oct, p.613-8. 2003.

Leick-Maldonado, E. A., F. U. Kay, *et al.* Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatments in an experimental

model of chronic airway inflammation in guinea-pigs. Clin Exp Allergy, v.34, n.1, Jan, p.145-52. 2004.

Levine, S., L. Goldman, *et al.* Expectancy and the pituitary-adrenal system. Ciba Found Symp, v.8, p.281-91. 1972.

Liu, L. Y., C. L. Coe, *et al.* School examinations enhance airway inflammation to antigen challenge. Am J Respir Crit Care Med, v.165, n.8, Apr 15, p.1062-7. 2002.

Louis, R., L. C. Lau, *et al.* The relationship between airways inflammation and asthma severity. Am J Respir Crit Care Med, v.161, n.1, Jan, p.9-16. 2000.

Lugogo, N. L. e M. Kraft. Epidemiology of asthma. Clin Chest Med, v.27, n.1, Mar, p.1-15, v. 2006.

Luparello, T. J., E. R. Mcfadden, Jr., *et al.* Psychologic factors and bronchial asthma, laboratory model for investigation. N Y State J Med, v.71, n.8, Sep 15, p.2161-5. 1971.

Machida, K., H. Inoue, *et al.* Activation of PI3K-Akt pathway mediates antiapoptotic effects of beta-adrenergic agonist in airway eosinophils. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.288, n.5, May, p.L860-7. 2005.

Major, R. H. A history of medicine.: Springfield Charles C. Thomas. 1954

Mano, K., A. Akbarzadeh, *et al.* Effect of hydrocortisone on beta-adrenergic receptors in lung membranes. Life Sci, v.25, n.22, Nov 26, p.1925-30. 1979.

Marcondes, F. K., L. C. Vanderlei, *et al.* Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. Can J Physiol Pharmacol, v.74, n.6, Jun, p.663-9. 1996.

Marketos, S. G. e C. N. Ballas. Bronchial asthma in the medical literature of Greek antiquity. J Asthma, v.19, n.4, p.263-9. 1982.

Mathewson, A. M. e R. M. Wadsworth. Induction of iNOS restricts functional activity of both eNOS and nNOS in pig cerebral artery. Nitric Oxide, v.11, n.4, Dec, p.331-9. 2004.

Mcfadden, E. R., Jr. e I. A. Gilbert. Asthma. N Engl J Med, v.327, n.27, Dec 31, p.1928-37. 1992.

Mcquaid, E. L., G. K. Fritz, *et al.* Stress and airway resistance in children with asthma. J Psychosom Res, v.49, n.4, Oct, p.239-45. 2000.

Michel, T. e O. Feron. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? J Clin Invest, v.100, n.9, Nov 1, p.2146-52. 1997.

Miller, M., J. Y. Cho, *et al.* Corticosteroids prevent myofibroblast accumulation and airway remodeling in mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.290, n.1, Jan, p.L162-9. 2006.

Minshall, E. M., J. C. Hogg, *et al.* Cytokine mRNA expression in asthma is not restricted to the large airways. J Allergy Clin Immunol, v.101, n.3, Mar, p.386-90. 1998.

Moncada, S. The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, v.28, p.97-9. 1993.

Moncada, S., R. M. Palmer, *et al.* Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. Biochem Pharmacol, v.38, n.11, Jun 1, p.1709-15. 1989.

Montuschi, P., M. Corradi, *et al.* Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. Am J Respir Crit Care Med, v.160, n.1, Jul, p.216-20. 1999.

Motzer, S. A. e V. Hertig. Stress, stress response, and health. Nurs Clin North Am, v.39, n.1, Mar, p.1-17. 2004.

Moura, M. J. e S. De Moraes. Forced swim stress: supersensitivity of the isolated rat pacemaker to the chronotropic effect of isoprenaline and the role of corticosterone. Gen Pharmacol, v.25, n.7, Nov, p.1341-7. 1994.

Muijsers, R. B., G. Folkerts, *et al.* Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. Life Sci, v.60, n.21, p.1833-45. 1997.

Nakashima, A. S., C. M. Prado, *et al.* Oral tolerance attenuates changes in in vitro lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling induced by chronic allergic inflammation in guinea pigs. J Appl Physiol, v.104, n.6, Jun, p.1778-85. 2008.

Neuhaus, E. C. A personality study of asthmatic and cardiac children. Psychosom Med, v.20, n.3, May-Jun, p.181-6. 1958.

Nittoh, T., H. Fujimori, *et al.* Effects of glucocorticoids on apoptosis of infiltrated eosinophils and neutrophils in rats. Eur J Pharmacol, v.354, n.1, Jul 31, p.73-81. 1998.

Ostman-Smith, I. Adaptive changes in the sympathetic nervous system and some effector organs of the rat following long term exercise or cold

acclimation and the role of cardiac sympathetic nerves in the genesis of compensatory cardiac hypertrophy. Acta Physiol Scand Suppl, v.477, p.1-118. 1979.

Palmer, R. M., A. G. Ferrige, *et al.* Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature, v.327, n.6122, Jun 11-17, p.524-6. 1987.

Pare, W. P. An Operant Water-Feeder for Rats. J Exp Anal Behav, v.7, Jan, p.78. 1964.

_____. Frequency and probability of US-shock and adrenal hypertrophy in the rat. Physiol Behav, v.6, n.5, May, p.493-6. 1971.

Pare, W. P. e G. B. Glavin. Restraint stress in biomedical research: a review. Neurosci Biobehav Rev, v.10, n.3, Fall, p.339-70. 1986.

Pare, W. P. e E. Redei. Depressive behavior and stress ulcer in Wistar Kyoto rats. J Physiol Paris, v.87, n.4, p.229-38. 1993a.

_____. Sex differences and stress response of WKY rats. Physiol Behav, v.54, n.6, Dec, p.1179-85. 1993b.

Pare, W. P. e L. J. Temple. Food deprivation, shock stress and stomach lesions in the rat. Physiol Behav, v.11, n.3, Sep, p.371-5. 1973.

Pearce, N., J. Pekkanen, *et al.* How much asthma is really attributable to atopy? Thorax, v.54, n.3, Mar, p.268-72. 1999.

Pinnock, S. B. e J. Herbert. Corticosterone differentially modulates expression of corticotropin releasing factor and arginine vasopressin mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus following either acute or repeated restraint stress. Eur J Neurosci, v.13, n.3, Feb, p.576-84. 2001.

Platts-Mills, T. A. e L. M. Wheatley. The role of allergy and atopy in asthma. Curr Opin Pulm Med, v.2, n.1, Jan, p.29-34. 1996.

Portela Cde, P., F. Tiberio Ide, *et al.* Effects of diazepam and stress on lung inflammatory response in OVA-sensitized rats. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.282, n.6, Jun, p.L1289-95. 2002.

Portela, C. P., E. A. Leick-Maldonado, *et al.* Effects of stress and neuropeptides on airway responses in ovalbumin-sensitized rats. Neuroimmunomodulation, v.14, n.2, p.105-11. 2007.

Prado, C. M., E. A. Leick-Maldonado, *et al.* Neurokinins and inflammatory cell iNOS expression in guinea pigs with chronic allergic airway inflammation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.288, n.4, Apr, p.L741-8. 2005.

_____. Effects of acute and chronic nitric oxide inhibition in an experimental model of chronic pulmonary allergic inflammation in guinea pigs. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.289, n.4, Oct, p.L677-83. 2005.

_____. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and remodeling. Am J Respir Cell Mol Biol, v.35, n.4, Oct, p.457-65. 2006.

Pryor, W. A. e G. L. Squadrito. The chemistry of peroxyxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. Am J Physiol, v.268, n.5 Pt 1, May, p.L699-722. 1995.

Ricciardolo, F. L. Multiple roles of nitric oxide in the airways. Thorax, v.58, n.2, Feb, p.175-82. 2003.

Ricciardolo, F. L., P. J. Sterk, *et al.* Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. Physiol Rev, v.84, n.3, Jul, p.731-65. 2004.

Rio, E. B. M., P. R. Gallo, *et al.* Mortalidade por asma no município de São Paulo, Brasil. Rev. Saúde Pública, v.36, n.2, p.146-54. 2002.

Ritz, T. e A. Steptoe. Emotion and pulmonary function in asthma: reactivity in the field and relationship with laboratory induction of emotion. Psychosom Med, v.62, n.6, Nov-Dec, p.808-15. 2000.

Ritz, T., A. Steptoe, *et al.* Emotions and stress increase respiratory resistance in asthma. Psychosom Med, v.62, n.3, May-Jun, p.401-12. 2000.

Robbins, R. A. e M. B. Grisham. Nitric oxide. Int J Biochem Cell Biol, v.29, n.6, Jun, p.857-60. 1997.

Robinson, D. S., Q. Hamid, *et al.* Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. N Engl J Med, v.326, n.5, Jan 30, p.298-304. 1992.

Rocco, P. R., E. M. Negri, *et al.* Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med, v.164, n.6, Sep 15, p.1067-71. 2001.

Saavedra-Delgado, A. M. e S. G. Cohen. Huang-Ti, the Yellow Emperor and the Nei Ching: antiquity's earliest reference to asthma. Allergy Proc, v.12, n.3, May-Jun, p.197-8. 1991.

Sakae, R. S., A. S. Leme, *et al.* Neonatal capsaicin treatment decreases airway and pulmonary tissue responsiveness to methacholine. Am J Physiol, v.266, n.1 Pt 1, Jan, p.L23-9. 1994.

Sakula, A. A history of asthma. The FitzPatrick lecture 1987. J R Coll Physicians Lond, v.22, n.1, Jan, p.36-44. 1988.

Salerno, F. G., M. Dallaire, *et al.* Does the anatomic makeup of parenchymal lung strips affect oscillatory mechanics during induced constriction? J Appl Physiol, v.79, n.1, Jul, p.66-72. 1995.

Salerno, F. G., P. Pare, *et al.* A comparative study of elastic properties of rat and guinea pig parenchymal strips. Am J Respir Crit Care Med, v.157, n.3 Pt 1, Mar, p.846-52. 1998.

Sangiorgi, P. [History of medical thinking on the etiology and the pathology of bronchial asthma from Hippocrates to our time]. Maroc Med, v.45, n.496, Nov, p.675-80. 1966.

Seligman, M. E. e S. F. Maier. Failure to escape traumatic shock. J Exp Psychol, v.74, n.1, May, p.1-9. 1967.

Selye, H. Endocrine reactions during stress. Curr Res Anesth Analg, v.35, n.3, May-Jun, p.182-93. 1956a.

_____. The stress-concept as it presents itself in 1956. Antibiot Chemother, v.3, p.1-17. 1956b.

_____. Stress and psychobiology. J Clin Exp Psychopathol, v.17, n.4, Oct-Dec, p.370-5. 1956c.

_____. What is stress? Metabolism, v.5, n.5, Sep, p.525-30. 1956d.

Selye, H. e C. Fortier. Adaptive reactions to stress. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis, v.29, Dec, p.3-18. 1949.

Shay, H. Stress and gastric secretion. Gastroenterology, v.26, n.2, Feb, p.316-9. 1954.

Shay, H. e D. C. Sun. Stress and gastric secretion in man. I. A study of the mechanisms involved in insulin hypoglycemia. Am J Med Sci, v.228, n.6, Dec, p.630-42. 1954.

Sinha, R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? Psychopharmacology (Berl), v.158, n.4, Dec, p.343-59. 2001.

Sivonova, M., I. Zitnanova, *et al.* Oxidative stress in university students during examinations. Stress, v.7, n.3, Sep, p.183-8. 2004.

Sole, D., E. Yamada, *et al.* International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): prevalence of asthma and asthma-related symptoms among Brazilian schoolchildren. J Investig Allergol Clin Immunol, v.11, n.2, p.123-8. 2001.

Spadari, R. C. e S. De Moraes. Repeated swimming stress and responsiveness of the isolated rat pacemaker to the chronotropic effect of noradrenaline and isoprenaline: role of adrenal corticosteroids. Gen Pharmacol, v.19, n.4, p.553-7. 1988.

Spielberger, C. D., H. F. O'neil, Jr., *et al.* Anxiety, drive theory, and computer-assisted learning. Prog Exp Pers Res, v.6, p.109-48. 1972.

Stacciarini, J. M. e B. T. Troccoli. [Stress in nursing]. Rev Lat Am Enfermagem, v.9, n.2, Mar, p.17-25. 2001.

Stamp, J. e J. Herbert. Corticosterone modulates autonomic responses and adaptation of central immediate-early gene expression to repeated restraint stress. Neuroscience, v.107, n.3, p.465-79. 2001.

Starling, C. M., C. M. Prado, *et al.* Inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates lung tissue responsiveness and remodeling in a model of chronic

pulmonary inflammation in guinea pigs. Respir Physiol Neurobiol, v.165, n.2-3, Feb 28, p.185-94. 2009.

Sullivan, S. D. e K. B. Weiss. Health economics of asthma and rhinitis. II. Assessing the value of interventions. J Allergy Clin Immunol, v.107, n.2, Feb, p.203-10. 2001.

Tanno, A. P., F. J. Bianchi, *et al.* Atrial supersensitivity to noradrenaline in stressed female rats. Life Sci, v.71, n.25, Nov 8, p.2973-981. 2002.

Tayeh, M. A. e M. A. Marletta. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. J Biol Chem, v.264, n.33, Nov 25, p.19654-8. 1989.

Tiberio, I. F., G. M. Turco, *et al.* Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. Am J Respir Crit Care Med, v.155, n.5, May, p.1739-47. 1997.

Torres, R. L., I. L. Torres, *et al.* Lipid peroxidation and total radical-trapping potential of the lungs of rats submitted to chronic and sub-chronic stress. Braz J Med Biol Res, v.37, n.2, Feb, p.185-92. 2004.

Toyoshima, M. T., G. M. Ito, *et al.* [Trends in morbidity for respiratory diseases among hospitalized patients in the city of Sao Paulo]. Rev Assoc Med Bras, v.51, n.4, Jul-Aug, p.209-13. 2005.

Tulic, M. K. e Q. Hamid. Contribution of the distal lung to the pathologic and physiologic changes in asthma: potential therapeutic target Roger S. Mitchell lecture. Chest, v.123, n.3 Suppl, Mar, p.348S-55S. 2003.

Umetsu, D. T. e R. H. Dekruyff. Immune dysregulation in asthma. Curr Opin Immunol, v.18, n.6, Dec, p.727-32. 2006.

Vignola, A. M., P. Chanez, *et al.* Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. Am J Respir Crit Care Med, v.157, n.2, Feb, p.403-9. 1998.

Von Mutius, E. The environmental predictors of allergic disease. J Allergy Clin Immunol, v.105, n.1 Pt 1, Jan, p.9-19. 2000.

Wagner, E. M., E. R. Bleeker, *et al.* Direct assessment of small airways reactivity in human subjects. Am J Respir Crit Care Med, v.157, n.2, Feb, p.447-52. 1998.

Wagner, E. M., M. C. Liu, *et al.* Peripheral lung resistance in normal and asthmatic subjects. Am Rev Respir Dis, v.141, n.3, Mar, p.584-8. 1990.

Wardlaw, A. J., C. E. Brightling, *et al.* New insights into the relationship between airway inflammation and asthma. Clin Sci (Lond), v.103, n.2, Aug, p.201-11. 2002.

Warth Mdo, P., E. A. Maldonado, *et al.* Neurokinin depletion attenuates pulmonary changes induced by antigen challenge in sensitized guinea pigs. Am J Physiol, v.268, n.5 Pt 1, May, p.L781-8. 1995.

Webster, E. L., D. J. Torpy, *et al.* Corticotropin-releasing hormone and inflammation. Ann N Y Acad Sci, v.840, May 1, p.21-32. 1998.

Weibel, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. Lab Invest, v.12, Feb, p.131-55. 1963.

Weil, C. M., S. L. Wade, *et al.* The relationship between psychosocial factors and asthma morbidity in inner-city children with asthma. Pediatrics, v.104, n.6, Dec, p.1274-80. 1999.

Wright, R. J., R. T. Cohen, *et al.* The impact of stress on the development and expression of atopy. Curr Opin Allergy Clin Immunol, v.5, n.1, Feb, p.23-9. 2005.

Wright, R. J., M. Rodriguez, *et al.* Review of psychosocial stress and asthma: an integrated biopsychosocial approach. Thorax, v.53, n.12, Dec, p.1066-74. 1998.

Xisto, D. G., L. L. Farias, *et al.* Lung parenchyma remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. Am J Respir Crit Care Med, v.171, n.8, Apr 15, p.829-37. 2005.

Yanai, M., K. Sekizawa, *et al.* Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure. J Appl Physiol, v.72, n.3, Mar, p.1016-23. 1992.

Yang, E. V., A. K. Sood, *et al.* Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. Cancer Res, v.66, n.21, Nov 1, p.10357-64. 2006.

Yellowlees, P. M. e R. S. Kalucy. Psychobiological aspects of asthma and the consequent research implications. Chest, v.97, n.3, Mar, p.628-34. 1990.

Zar, J. H. Biostatistical Analysis., v.2.ed. 1984

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](#)