MARCO ANTONIO CAPELOZZI

**Determinantes funcionais e morfológicos de ação de droga
sobre os pulmões utilizando um modelo experimental em
cobaias sob uso do cloridrato de fluoxetina**

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

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Luiza Capellozzi

Co-Orientadora : Profa. Dra. Iolanda de Fátima
Lopes Calvo Tibério

São Paulo

2004

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Capelozzi, Marco Antonio

Determinantes funcionais e morfológicos de ação de drogas sobre os pulmões utilizando como modelo experimental em cobaias o cloridrato de fluoxetina / Marco Antonio Capelozzi. -- São Paulo, 2004.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientadora: Vera Luiza Capelozzi.

Co-orientadora: Iolanda de Fatima Lopes Calvo Tibério.

Descritores: 1.FLUOXETINA/farmacologia 2. FLUOXETINA/farmacocinética
3.FLUOXETINA/efeitos adversos 4.ANTIDEPRESSIVOS DE SEGUNDA
GERAÇÃO 5.NATAÇÃO 6.COBAIAS 7.INFLAMAÇÃO/induzido quimicamente
8.ÓXIDO NITRICO 9.SISTEMA RESPIRATÓRIO/efeitos de drogas 10.PULMÃO/
efeitos de drogas 11.MECÂNICA RESPIRATÓRIA/efeitos de drogas 12.DOENÇAS
PULMONARES INTERSTICIAIS/patologia

USP/FM/SBD-338/04

Dedico esta tese a meus pais, **Antonio e Helena Branco Capelozzi**.

A Providência articulou um tear em suas vidas para que tecessem o
suporte afetivo e um sustentáculo garantido para poderem criar três
filhos médicos: Vera, Marisa e Marco Antonio.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi, pelo brilhantismo e extrema competência com que conduziu a orientação desta tese.

À Profa. Dra. Iolanda F. L. C. Tibério, co-orientadora desta tese pelo seu entusiasmo contagiante e diário, que motiva-nos a continuar e melhorar sempre.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Saldiva, chefe do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo estímulo constante que têm dado à pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Milton Arruda Martins, por sua participação séria e competente nos projetos de pesquisa que têm acontecido no Laboratório de Investigação Médica 20 (LIM 20) da FM-USP.

Às minhas irmãs, Vera e Marisa, modelos e exemplos de conduta nos quais me espelhei.

Ao Dr. Edwin R. Parra, médico patologista e colega de pós-graduação, pelos vários momentos em que auxiliou-me na realização deste trabalho.

À Dra. Edna Leick-Maldonado, por sua contribuição durante as várias etapas de confecção desta tese.

À Fernanda D.T.Q.S. Lopes, pela contribuição teórico-prática referente à mensuração do óxido nítrico durante os experimentos.

À Beatriz Manguiera Saraiva-Romanholo (a Bia) por ter auxiliado-me nos primeiros escritos e primeiras referências bibliográficas sobre o óxido nítrico.

À Fernanda Magalhães Arantes-Costa (a Fê), por ter prestado os “primeiros socorros” às cobaias desse experimento e por estar sempre pronta a ajudar.

A David Kasahara, pela ajuda nos meus primeiros passos dentro da rotina de um laboratório.

Ao amigos desde “sempre”: Susana (a Su), Ana Paula (a Lêta), Rebecca (a Rêba) e Zé (o “Z”); diz o ditado que “vão-se os anéis, ficam os dedos...”; no nosso caso eu diria: passam os anos, fica a amizade...feito um diamante, cada vez mais lapidado, sem preço...

À amiga Sônia Toledo Carvalho, por sua amizade na concepção mais ampla e verdadeira do termo, e pelo auxílio no levantamento bibliográfico deste trabalho.

Às amigas Nilma Giacoia e Beatriz Albuquerque, pela amizade e pelos momentos de muito “besteiro!”, regados a muitas risadas, impescindíveis na vida cotidiana...

À Dra. Eliana Battaggia Guttierrez, pelo seu incentivo, sempre presente em todos os momentos.

A Júlia Casulari, antiga terapeuta, com quem aprendi a “merecer merecer” e a nunca desistir de buscar- citando suas próprias palavras, “asas efetivas para sair de meus labirintos...”.

À Dra. Vânia de Lara Crelier, psicoterapeuta e supervisora, que ensinou-me que “há penas que apenas a duras penas se vão...”- também palavras suas...

Às secretárias do Departamento de Patologia da FM-USP, Liduvina Barros e Vera Lúcia Noya, sempre prestativas e com um largo sorriso no rosto.

A Ana Luiza Barreiros, fotógrafa da FM- USP responsável pela realização das fotos da macroscopia dos pulmões dos animais desse estudo para a devida documentação científica.

A todas as técnicas da Faculdade de Medicina–USP, responsáveis pela execução dos cortes microscópicos dos espécimes oriundos dos referidos pulmões, e pela confecção das respectivas lâminas com suas diferentes colorações.

Ao Laboratório NOVAQUÍMICA (SIGMA) por ter dividido comigo, solidariamente, seus conhecimentos sobre a medicação-objeto deste estudo, tendo inclusive fornecido espontânea e gratuitamente valiosos

exemplares do Daforin®- a única fórmula comercial do cloridrato de fluoxetina em gotas disponível pela época inicial desse estudo, e portanto muitíssimo útil para sua utilização em animais de pequeno porte.

Aos meus dois fiéis companheiros felinos, Maria Alice e Luis Carlos, pelas horas que não pudemos brincar juntos, mas também pelas horas que bagunçamos bastante; pela dedicação e companhia incondicionais, quer seja junto ao computador e aos livros noites adentro, quer seja dormindo de tão cansados...

A todos que, de alguma maneira, ajudaram e/ou facilitaram na elaboração e confecção desta tese.

Também agradeço àqueles que, de alguma forma, foram obstáculos e/ou dificultaram esta jornada: suas existências e maneiras de participação conferem ao presente trabalho certamente um mérito ainda maior.

ÀS COBAIAS

Um simples “agradecimento” aos animais – cobaias vítimas deste estudo, não é suficiente para redimir ou desculpar a pretensão de usufruir, sem seu consentimento autorizado prévio, das vidas a quem falsamente atribuímos um valor menor. Fica aqui ao menos sua honrosa menção com o respeito devido.

De tudo ficaram três coisas:

a certeza de que estava sempre começando,

a certeza de que era preciso continuar

e a certeza de que seria interrompido antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo,

fazer da queda, um passo de dança,

do medo, uma escada,

do sonho, uma ponte,

da procura, um encontro.

Fernando Pessoa

Normalização adotada

Esta dissertação 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 dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Organização Histoarquitetural e Mecanismos de Defesa do Aparelho Respiratório	2
1.1.1 Mecanismos de Defesa das Vias Aéreas	9
1.1.2 Mecanismos de Agressão	12
1.1.3 Interstício Pulmonar	13
1.2 Sistema Respiratório e as Emoções	16
1.2.1 Aspectos Gerais e Correlações	16
1.2.2 Perturbações Funcionais da Respiração	21
1.2.3 Outros Processos Patológicos Frequentemente Associados a Aspectos Emocionais	22
1.3 Ação de Drogas sobre os Pulmões	26
1.3.1 Definição	26
1.3.2 Síndromes clínicas	28
1.3.3 Padrões histopatológicos	31
1.4 Sistema Nervoso Autônomo no Aparelho Respiratório	35
1.5 Fluoxetina	36
1.5.1 Dados Farmacológicos e Mecanismo de Ação	36
1.5.2 Indicações Clínicas	38
1.6 Fluoxetina e Sistema Respiratório	42
1.7 Métodos de avaliação de estresse em animais	42
1.8 Modelo Experimental Utilizado	46
2. JUSTIFICATIVAS PARA O PRESENTE ESTUDO	48
3. OBJETIVOS	50

4. MÉTODOS.....	52
4.1 Natação Forçada.....	53
4.2 Grupos Experimentais.....	56
4.3 Mecânica Respiratória	58
4.4 Concentração de Óxido Nítrico Exalado	59
4.5 Análise Macroscópica	60
4.6 Estudo Morfométrico	61
4.7 Método Cianeto-Resistente para Peroxidase de Eosinófilo	62
4.8 Análise Estatística.....	65
4.9 Reagentes.....	65
5. RESULTADOS	67
5.1 Tempo de Natação.....	68
5.2 Mecânica Pulmonar	70
5.2.1 Elastância (Ers)	70
5.2.2 Resistência (Rrs)	72
5.3 Concentrações de Óxido Nítrico Exalado (E _{NO})	73
5.4 Aspectos Macroscópicos dos Pulmões.....	75
5.5 Estudos Morfométricos (Análise Quantitativa)	80
5.5.1 Células Mononucleadas (MN)	80
5.5.2 Células Polimorfonucleadas (PMN).....	82
5.6 Estudo Histoquímico – EPO+ (peroxidase para eosinófilos).....	84
5.7 Aspectos Microscópicos (Análise Qualitativa).....	86
6. DISCUSSÃO.....	91
7. CONCLUSÕES.....	101
8. REFERÊNCIAS	104
APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS

- ♦ CO₂ – Gás Carbônico
- ♦ DPI – Doença Pulmonar Intersticial
- ♦ E_{NO} – Óxido Nítrico Exalado (do inglês “exhaled nitric oxide”)
- ♦ EPO – do inglês “Eosinophil Peroxidase”
- ♦ Ers - Elastância
- ♦ FI - Fluoxetina
- ♦ FST – do inglês “Forced Swimming Test”
- ♦ GP - Guinea Pigs
- ♦ HE – Hematoxilina-Eosina
- ♦ ISRS- Inibidor Seletivo da Recaptação da Serotonina
- ♦ LBA – Lavado broncoalveolar
- ♦ MN – Mononucleadas (de células)
- ♦ Nat - Natação
- ♦ NO – Óxido Nítrico, ou do inglês “nitric oxide”
- ♦ O₂ - Oxigênio
- ♦ PMN – Polimorfonucleadas (de células)
- ♦ Rrs - Resistência
- ♦ Sal - Salina, ou referente a grupo controle
- ♦ SNC – Sistema Nervoso Central
- ♦ SSRI - do inglês “selective serotonin reuptake inhibitor”

RESUMO

CAPELOZZI MA. *Determinantes funcionais e morfológicos de ação de droga sobre os pulmões utilizando um modelo experimental em cobaias sob uso do cloridrato de fluoxetina* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004. 114p.

Muito se tem pesquisado sobre os efeitos adversos dos antidepressivos tricíclicos (p.e. imipramina) sobre o sistema respiratório, embora pouco ou quase nada se encontre com relação a tal aspecto na literatura médica sobre a fluoxetina (Prozac®)– um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, até porque esta droga começou a ser utilizada somente há cerca de quinze anos. Ambas substâncias (fluoxetina e imipramina, ou seus congêneres) agem basicamente sobre quadros depressivos, fóbicos e obsessivo-compulsivos, obesidade, anorexia, e outras indicações de várias naturezas, indo desde a ansiedade até a síndrome do pânico. Nota-se entretanto, que na maioria dos pacientes com tais quadros (sob tratamento com a fluoxetina ou não), são muito frequentes as queixas de natureza respiratória, como tosse, falta de ar, “angústia” no peito etc. Alguns efeitos adversos da fluoxetina e seus derivados são descritos na literatura, embora raros. Entre eles, destaca-se o comprometimento do aparelho respiratório na forma de doença pulmonar intersticial, pneumonia de hipersensibilidade e fosfolipidose. Apresentamos a seguir um projeto de trabalho experimental em cobaias com intuito de verificar a ação da fluoxetina sobre o aparelho respiratório, com relação à mecânica pulmonar, influência sobre o óxido nítrico exalado e resposta histopatológica pulmonar frente a possíveis injúrias, comparados a animais controles sem efeito da droga. Nosso modelo descreve um protocolo em que os animais foram submetidos ao cloridrato de fluoxetina por via oral durante 30 dias consecutivos, sendo ainda submetidos a uma reação de estresse tipo pânico– a natação forçada.

SUMMARY

CAPELOZZI MA. *Functional and morphological determinants of drug action on the lungs through an experimental model in guinea pigs under use of fluoxetine* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2004. 114p.

Although high-affinity imipramine binding sites have been reported in both rat and human lung, the role of the lungs in the pharmacokinetics of antidepressants like fluoxetine has not received much attention. Imipramine and fluoxetine have their action in depression, obesity, panic and anxiety among other indications. However, accumulation of selective serotonin-reuptake inhibitors- like fluoxetine, in the human lungs has been reported. Besides, it is very frequent to most patients (under fluoxetine treatment or not) present respiratory symptoms and/or signs, just like dyspnea, cough, chest anguish and so on. There also have been some adverse effects of fluoxetine described in the literature, although being few and isolated ones, related to hypersensitivity pneumonitis, phospholipidosis and interstitial lung disease. The purpose of this project is to investigate the fluoxetine action in respiratory tract, more specifically over the pulmonary interstitium, using an experimental model in guinea-pigs. Our project comprehends an experimental model with the animals under treatment of fluoxetine so that we could evaluate the substance effects on the respiratory system, concerning the mechanics and the lung histopathological aspects, compared to the control animals. We created then a protocol where the animals were treated with fluoxetine for 30 consecutive days and submitted to the forced swimming test, a kind of panic-like reaction.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Organização Histoarquitetural e Mecanismos de Defesa do Aparelho Respiratório

Pode-se dividir os elementos histoarquiteturais participantes do sistema de defesa pulmonar em (Saldiva et al., 2000):

1. Papel das grandes vias aéreas;
2. Sistema ou aparelho muco-ciliar;
3. Barreira alvéolo-capilar;
4. Sistema macrofágico.

A estrutura dos brônquios modifica-se progressivamente nos diferentes níveis do trato respiratório, sendo que as vias aéreas vão tornando-se cada vez mais delicadas à medida que se caminha para o interior dos pulmões. Esta adaptação progressiva visa permitir o processo de troca gasosa, diminuindo a interface que se interpõe entre o meio interno e o ar inspirado. Os bronquíolos respiratórios marcam a transição entre o compartimento de vias aéreas comprometido com o condicionamento do ar e o território de trocas gasosas. Antes de atingir o final desse sistema tubular (ductos alveolares e átrio alveolar), os bronquíolos respiratórios apresentam cerca de 2 a 3 divisões - bronquíolos respiratórios de segunda e terceira ordem, respectivamente (Figura 1).

O território pulmonar ventilado por um bronquíolo respiratório de primeira ordem é denominado *ácino pulmonar*, que representa a unidade funcional dos pulmões.

O epitélio de revestimento das vias aéreas modifica-se ao longo dos seus diferentes segmentos. A Figura 2 mostra um esquema representando uma simplificação da estrutura celular das vias aéreas.

Nos brônquios, o epitélio é pseudo-estratificado colunar ciliado, com células secretoras de muco de permeio. Nos bronquíolos, existe uma diminuição da altura do epitélio e dos cílios, com menor número de cílios por célula, aparecendo ainda um tipo especial de célula secretora – a célula de Clara. Atribui-se a esta célula duas funções principais:

- a produção da substância surfactante dos bronquíolos;
- a inativação de xenobióticos, por meio de reações de oxidação dos mesmos (dependentes do citocromo P450).

Os alvéolos são revestidos por 2 tipos de células denominadas pneumócitos tipos I e II. Compete ao pneumócito I revestir a maior superfície alveolar com a menor espessura possível, sendo células de diferenciação terminal, ou seja, incapazes de dividirem-se. Os pneumócitos II funcionam como as células de reserva do epitélio alveolar, além de possuir a função de produção do surfactante alveolar. A implicação disso é que, em condições de agressão ao epitélio alveolar, deve ocorrer uma transdiferenciação celular de pneumócitos II para I, com prejuízo da produção do surfactante e, conseqüentemente, risco de instabilidade mecânica dos alvéolos (Saldiva et al., 2000).

A presença de células ciliadas ao lado de células produtoras de muco deve-se à necessidade de um mecanismo de remoção das partículas inaladas e depositadas sobre as vias aéreas: o *aparelho mucociliar*.

Ao longo de seu trajeto, a árvore brônquica sofre um processo de segmentação, dicotomizando-se progressivamente, de forma a constituir-se no sistema inicial de defesa ao reter o material particulado inalado – impactação inercial. Este mecanismo filtra grande parte das partículas inaladas com diâmetro entre 5 e 10 micrômetros. Para as partículas menores, os mecanismos mais importantes que podem concorrer para sua deposição são a sedimentação gravitacional e os movimentos denominados “brownianos”.

Estes dois fenômenos físicos explicam a deposição de pequenas partículas e são mais importantes à medida em que caminha-se para as regiões mais distais do pulmão e onde a velocidade linear das partículas é menor.

O sistema respiratório é constituído por uma interação entre os meios externo e interno do indivíduo, uma vez que tem de ocorrer uma troca gasosa entre o ar e o sangue. Através de uma área de troca de aproximadamente 100 m² (em um indivíduo adulto), ocorre a absorção de O₂ e sua ligação à hemoglobina (presente no interior da hemácea), efetuando-se ainda a liberação da maior parte do gás carbônico (CO₂) produzido pelo organismo para dentro dos alvéolos e sua eliminação para o meio exterior; nesta área de troca são realizadas ainda importantes reações fundamentais para o metabolismo de hormônios (por exemplo,

conversão de angiotensina I a II) e a inativação de xenobióticos. Todos esses processos são possíveis somente graças a uma grande especialização celular e histoarquitetural do sistema, que propicia então:

- a filtragem do ar inspirado;
- a manutenção da estabilidade mecânica de centenas de milhões de alvéolos;
- o fluxo de fluidos e gases através da barreira alvéolo-capilar;
- uma adequada distribuição de todo o débito cardíaco proveniente das câmaras cardíacas direitas ao longo do parênquima alveolar, de forma a permitir uma eficiente relação entre ventilação e perfusão.

O ar inspirado necessita de um condicionamento prévio antes de atingir o território de trocas gasosas, a saber:

- 1- O aquecimento do ar até 37 graus Celsius;
- 2- A saturação do ar com vapor de água;
- 3- A esterilização do ar obtido do meio externo.

São, portanto, as 3 condições necessárias para a manutenção da homeostase alveolar.

Tais processos ocorrem no território de condução de gases, que se inicia nas vias aéreas superiores e termina com o aparecimento dos primeiros alvéolos, nos bronquíolos respiratórios de primeira ordem. Considerando-se a traquéia como ponto de referência, o ser humano possui, em média, 16 gerações de vias aéreas até que o último segmento do

território envolvido exclusivamente com condução de gases – o bronquíolo terminal – seja alcançado. A partir do bronquíolo terminal, aparece a unidade funcional do território de troca gasosa – o ácino pulmonar – representado pelo conjunto de vias aéreas e alvéolos ventilados pelo bronquíolo respiratório de primeira ordem.

Este ponto de demarcação de funções entre troca e difusão de gases é importante em patologia pulmonar, pois doenças dos segmentos proximais aos bronquíolos respiratórios de primeira ordem geralmente levam a prejuízos da ventilação pulmonar, ao passo que os processos patológicos do território de troca causam transtornos fisiopatológicos por distúrbios da difusão ou alteração da relação entre ventilação e perfusão (Saldiva et al., 2000).

A arquitetura das vias aéreas de condução é fundamental para suas funções de condicionamento do ar inspirado. A disposição de bifurcações em série, propiciada pelo padrão de divisões dicotômicas sucessivas, faz com que um número significativo das partículas inaladas e transportadas pelo fluxo inspiratório para o interior dos pulmões possa chocar-se com as paredes das vias aéreas e, conseqüentemente, ser retido antes de atingir o território de troca gasosa.

O sistema de bifurcação dicotômica resulta também no aumento progressivo da área de seção transversa do território de condução. Este aumento de área ocorre pelo fato de que, embora os segmentos originários da bifurcação de uma via aérea matriz tenham calibre cerca de 70-80% menor do que a via aérea original, a soma da área das duas vias aéreas por ela originada representa um aumento seqüencial absoluto de cerca de 40-

60% de área aerodinâmica efetiva para cada bifurcação. Esta situação faz com que o fluxo aéreo seja progressivamente reduzido à medida que se caminha para os segmentos mais internos dos pulmões, propiciando às partículas inaladas perda de movimento cinético e deposição na parede pela ação da gravidade, antes de atingirem os alvéolos (Saldiva et al., 2000).

Uma vez que as vias aéreas tomam a si muitas das tarefas de defesa dos pulmões, pressupõe-se que devam, ao mesmo tempo, possuir mecanismos de remoção de agentes agressores nelas retidos. A composição celular das vias aéreas possui um repertório suficientemente vasto para contribuir com a defesa pulmonar, representado pelos seguintes tipos celulares:

- ♦ **Células ciliadas** : responsáveis pela motilidade do aparelho mucociliar, sendo bastante especializadas e mais comuns nos segmentos proximais das vias aéreas;
- ♦ **Células mucossecretoras**: existentes no epitélio e nas glândulas da lâmina própria, são responsáveis pela secreção de mucinas para a luz das vias aéreas, exercendo importante efeito citoprotetor, tanto do ponto de vista de barreira mecânica como pela presença de outros agentes em sua composição (como receptores para microrganismos, imunoglobulinas, anti-oxidantes e tampões orgânicos);
- ♦ **Células serosas**: responsáveis pela maior parte dos componentes orgânicos que compõem o fluido que reveste internamente as vias aéreas. Estão presentes tanto na superfície epitelial como nas glândulas

da lâmina própria, sendo responsáveis pela secreção de componentes importantes para a defesa pulmonar (tais como lisozima, lactoferrina e a peça secretora da imunoglobulina A produzida pelas células linfóides presentes na mucosa);

- ♦ **Células de Clara:** são mais freqüentes nos segmentos distais das vias aéreas, onde o fluxo aéreo é mais lento, permitindo maior interação com os componentes químicos inalados. Sua função mais importante é a metabolização de xenobióticos, dado que estas células possuem oxidases e outros sistemas enzimáticos. Em algumas situações, as células de Clara podem participar da ativação de substâncias por reações de óxido-redução, contribuindo para a geração de intermediários carcinogênicos;
- ♦ **Células neuroendócrinas:** estão intimamente relacionadas com as terminações nervosas existentes na mucosa respiratória, tendo ativação tanto sensitiva quanto secretora. São células capazes de responder a estímulos variados, como hipóxia, variações de temperatura e osmolaridade do fluido brônquico. Seus produtos de secreção atuam de maneira a serem capazes de modular o crescimento celular, a reparação brônquica, a permeabilidade vascular e o tônus da musculatura dos vasos e brônquios. Exercem papel importante por exemplo na patogênese da asma, e quando transformadas por agentes carcinogênicos originam a neoplasia mais agressiva das vias aéreas: o carcinoma indiferenciado de pequenas células.

- ♦ **Células do sistema imunitário:** representadas por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, estão normalmente presentes no fluido que reveste as vias aéreas, permeando o epitélio respiratório ou organizando-se em estruturas linfóides similares a linfonodos. O conjunto dessas células é conhecido como sistema linfóide associado aos brônquios, que é elemento fundamental na defesa dos pulmões contra infecções.

1.1.1 Mecanismos de Defesa das Vias Aéreas

O conjunto das células descritas anteriormente exerce uma ação coordenada de defesa das vias aéreas, os assim chamados mecanismos de defesa pulmonar. Dentre eles, os principais são:

- ♦ **tosse:** reflexo mediado pela estimulação de receptores de irritação dispostos preferencialmente nas vias aéreas proximais;
- ♦ **broncoconstrição:** secundária à estimulação das terminações nervosas presentes nas vias aéreas através de mecanismos reflexos vagais ou pela secreção de mediadores inflamatórios;
- ♦ **secreção de muco e outras substâncias citoprotetoras,** como lisozima, lactoferrina e anti-oxidantes, produzidas pelas células secretoras existentes ao longo do trato respiratório;
- ♦ **transporte mucociliar:** consiste no batimento ordenado do epitélio ciliar que propule as secreções respiratórias em direção à orofaringe;

- ♦ **resposta imunitária:** produto da ação do sistema linfóide associado às vias aéreas, análogo ao existente no sistema digestivo;
- ♦ **ativação de células inflamatórias,** presentes na secreção que recobre as vias aéreas, provenientes do recrutamento local (diapedese transepitelial) ou trazidas do compartimento alveolar pelo transporte mucociliar.

Cada um desses mecanismos representa um sistema de defesa fisiológico, cuidadosamente selecionado ao longo da escala evolutiva e muito eficiente para, isolada ou conjuntamente, efetivar a manutenção da higidez dos pulmões.

A lógica do sistema é impedir o acesso de agentes patológicos externos ao microambiente alveolar, dada a grande interação deste último com o meio interno. A eficiência do modelo é grande, como demonstrado pelo fato de obter-se ar estéril, umidificado e aquecido após cinco ou seis gerações de vias aéreas. Como os primeiros alvéolos surgem, em média, após 16 gerações a partir da traquéia, pode-se caracterizar o sistema respiratório como possuidor de uma grande reserva funcional de defesa.

No entanto, quando existe disfunção desses mecanismos ou, alternativamente, extrema solicitação dos mesmos por agentes agressores, formam-se condições para o desenvolvimento de doenças respiratórias.

O território de trocas gasosas dos pulmões também possui notável especialização estrutural, de forma a cumprir sua função. Nos alvéolos, existe íntima interação entre sangue e ar, através de uma barreira muito

delgada – a barreira alvéolo-capilar – que possui uma espessura média inferior a 1 μm . Em nenhum outro compartimento do organismo existe limitação estrutural tão tênue entre os meios externo e interno, tornando clara a necessidade de mecanismos de controle homeostático eficientes.

A Figura 3 mostra esquema onde encontra-se representada a estrutura dos alvéolos, que é representada pelos seguintes componentes:

- ♦ **Pneumócitos do tipo I.** Constituem as células que revestem a maior parte da superfície alveolar (ao redor de 95%), possuem citoplasma bastante extenso e pobre em organelas, uma vez que revestem a maior superfície possível com a menor espessura compatível com a impermeabilização do sistema. Os pneumócitos do tipo I são células de diferenciação terminal, sendo, portanto, incapazes de dividir-se.
- ♦ **Pneumócitos do tipo II.** São células sofisticadas do ponto de vista de repertório enzimático. Compete aos pneumócitos II a reposição das células epiteliais, provendo não somente novos pneumócitos II como também sua diferenciação em pneumócitos I, quando necessário. Os pneumócitos II secretam tanto a fase protéica como a lipídica do surfactante pulmonar. A substância surfactante possui a função de controlar as forças de tensão superficial da interface ar-líquido alveolar, além de facilitar a fagocitose de microrganismos pelos macrófagos alveolares.
- ♦ **Macrófagos Alveolares.** Derivam de monócitos circulantes ou são provenientes dos próprios pulmões, originados provavelmente dos remanescentes mielopoiéticos existentes no território alveolar.

Diferentemente dos macrófagos de outras regiões, os macrófagos alveolares possuem metabolismo aeróbico bastante desenvolvido. Cada alvéolo possui dois ou três macrófagos residentes, que representam a primeira linha de defesa do compartimento alveolar. Nesse sentido, os pulmões fogem um pouco dos padrões descritos na patologia geral, que demonstram que os neutrófilos seriam as primeiras células presentes nos focos inflamatórios. Nos pulmões, os macrófagos exercem esta função por já estarem no interior dos alvéolos.

- ♦ **Células Endoteliais.** O endotélio pulmonar possui características peculiares. As junções dos capilares alveolares são muito resistentes à abertura induzida por mediadores inflamatórios. Esta propriedade deve-se à necessidade de minimizar a possibilidade de inundação do território de trocas gasosas por fluidos. Além disso, o endotélio pulmonar é metabolicamente muito ativo, justificando a situação do pulmão como órgão endócrino; a maior parte da conversão da angiotensina I para angiotensina II, por exemplo, ocorre pela ação da enzima conversora existente no endotélio pulmonar.

1.1.2 Mecanismos de Agressão / Injúria do Sistema Respiratório

Alguns fatores e situações podem alterar os mecanismos de defesa descritos propiciando o aparecimento de injúrias com consequentes doenças do aparelho respiratório (Saldiva et al., 2000):

- distúrbios do transporte mucociliar e incremento da remoção de secreções pela tosse: são o marcador clínico mais importante tanto da bronquite crônica como de outras doenças inflamatórias crônicas das vias aéreas, tais como as que geram bronquiectasia;
- ativação excessiva da resposta broncoconstritora: representa o evento mais característico da asma brônquica;
- proliferação de células das vias aéreas em resposta a um estímulo patológico persistente.

1.1.3 Interstício Pulmonar

O interstício é o compartimento situado entre as membranas basais do endotélio e do epitélio alveolares, possuindo além dos componentes celulares, características peculiares fundamentais para o adequado desempenho das funções de trocas gasosas. É composto por fibras colágenas, elásticas e proteoglicanos altamente hidrofílicos que possuem a capacidade de absorver o fluido absorvido a partir da luz alveolar ou dos capilares alveolares.

O espaço intersticial é preenchido por elementos celulares diversos, tais como células inflamatórias, fibroblastos, células mioepiteliais, pericitos, entre outros. A histoarquitetura do território alveolar prevê que uma das faces do septo alveolar seja comprometida com as trocas gasosas, sendo o interstício constituído por uma pequena camada de substância amorfa entre as membranas basais endotelial e epitelial. A outra face do septo alveolar está envolvida na sustentação mecânica do alvéolo, abrigando as fibras elásticas e colágenas (Figura 3).

(Reproduzido da Apostila da Disciplina de Patologia Pulmonar- 2004 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo)*

FIGURA 1. Representação esquemática das porções distais do parênquima pulmonar. Os bronquíolos respiratórios desembocam no ducto alveolar que abre-se em direção a diversos alvéolos. A geração de alvéolos permite a amplificação da área de troca gasosa nos pulmões.

(Reproduzido da Apostila da Disciplina de Patologia Pulmonar- 2004 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo)*

FIGURA 2. Esquema da estrutura de revestimento das vias aéreas e alvéolos.

* Elaborada pelos professores Paulo H.N. Saldiva, Vera L. Capelozzi e Marisa Dohnikoff.

(Reproduzido da Apostila da Disciplina de Patologia Pulmonar- 2004 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo)

FIGURA 3. Representação esquemática do território alveolar. Existe um favorecimento de uma das faces do capilar (a mais delgada) para a realização da troca gasosa (barreira ar-sangue), enquanto a outra face do septo alveolar fica responsável pelo interstício de sustentação, com suas fibras elásticas e colágenas. **C** representa o capilar, **End** representa a célula endotelial, **H** representa uma hemácia, **P I** e **P II** indicam os pneumócitos I e II, respectivamente. Está também representada a célula de defesa do território alveolar, o macrófago luminal.

* Elaborada pelos professores Paulo H.N. Saldiva, Vera L. Capelozzi e Marisa Dohnikoff.

1.2 Sistema Respiratório e as Emoções

1.2.1 Aspectos Gerais e Correlações

Ao falarmos sobre o Sistema Respiratório devemos considerar primeiramente que, ao nascer, a criança atinge um climax de intensidade e de adaptação, e que exige rápidas e espontâneas respostas frente a um mundo até então desconhecido – adaptação *vital* frente a um novo ambiente (Moreno, 1987) para adquirir defesas para enfrentar resistências (Kaufman, 1983).

Durante a vida intra-uterina o aparelho respiratório apenas está em formação e não em atividade. A nutrição, bem como as funções das necessárias trocas gasosas, ocorrem por via sanguínea através dos vasos umbilicais e placenta. Com o nascimento, esses vasos colabam (ou são clampeados), e a partir de então as veias e artérias que entram e saem dos pulmões entram em ação: os pulmões recebem pela primeira vez ar diretamente do meio ambiente; inicia-se toda uma *interação de caráter vital da criança com o meio externo* através da ativação do sistema respiratório, que por esta ocasião deve estar pronto para exercer suas funções de maneira efetiva.

A regulação desta função fundamental é complexa, e depende do estado do organismo, do seu metabolismo e de suas necessidades energéticas.

Tais funções estão diretamente ligadas às diferentes organizações funcionais do sistema nervoso central, e também aos diferentes estados psíquicos. Deve-se pensar que o ato de nascer representa e exige uma rápida (autônoma) e adequada resposta ao grande estresse representado pelo nascimento em si, além da questão de sobrevivência e capacidade de adaptação dessa criança.

O ato de respirar representa então, em fase mesmo anterior às funções do sistema digestivo (comer *versus* prazer/desprazer, e respirar/suspirar/sufocar *versus* satisfação/alívio/desprazer etc), uma verdadeira e primeira *ligação* da criança com o mundo exterior.

A partir do momento do nascimento as funções respiratórias estarão portanto muito ligadas aos aspectos afetivos deste indivíduo.

Segundo Haynal et al. (1998), existe toda uma *semiologia* da respiração ligada aos estados afetivos: a emoção que faz arquejar, a angústia que sufoca, a surpresa que corta a respiração, a depressão que arranca suspiros, e por outro lado a serenidade faz-se acompanhar de uma respiração tranquila. A respiração situa-se então num patamar entre o automático e o voluntário: a ultrapassagem deste limite ocorre quando por exemplo inicia-se (por interesse) um exercício respiratório, que usualmente é de natureza automática, com a intenção de provocar prazer ou suscitar fantasias. Desta maneira é comum inspirar-se profundamente “o ar puro” quando se está numa montanha. Vale lembrar que os níveis de oxigênio e de ozônio conferem sensação agradável, ao contrário de certos poluentes do ar, podendo aqui citar-se ainda, como exemplo, o fato de muitos

mergulhadores voluntariamente quererem repetir a experiência da sensação de embriaguês em baixas profundidades ocasionada pela elevação dos níveis de dióxido de carbono. Outro exemplo, para não deixar de mencionar outra finalidade na manipulação da atividade respiratória, é o exercício da ioga, através do qual desenvolve-se a atenção e concentração sobre a respiração com inúmeras aplicações, inclusive de caráter terapêutico.

Os psicanalistas estudaram intensamente o papel do tubo digestivo na formação psíquica do indivíduo, e estudaram bem menos o papel da respiração. Kreisler et al. (1974), citados por Haynal et al. (1998), dizem que a criança tem uma representação da inspiração baseada no modelo digestivo que conhece: “engole-se” o ar como se engolem os alimentos e conserva-se no interior. Entretanto, para o adulto, comparar o tabagismo por exemplo a um movimento oral, parece por demais simplista, não reconhecendo entre outras coisas a excitação da mucosa respiratória. Deve existir para a respiração, segundo o autor, “uma libido fixada por escalões da função respiratória”.

Numerosas formas de expressão humana organizam-se em torno dos movimentos inspiratórios e/ou expiratórios: artistas, desportistas, terapeutas de linha corporal (como o psicodrama) inspiram para “se aquecerem”, um “preparo” para a ação; outras formas de expressão organizam-se após a expiração como o grito, o suspiro, o soluço e o riso, e ainda a forma mais evoluída – a palavra.

A mecânica respiratória está subordinada a um substrato nervoso central regulador: tronco cerebral, sistema reticular ascendente, hipotálamo, gânglios nervosos moduladores localizados no interior das artérias carótidas.

Desta maneira o sistema respiratório atua e reage segundo os mecanismos das inervações e seus neurotransmissores presentes: as vias utilizadas mais evidentes (em termos de atuação) são as noradrenérgicas e dopaminérgicas (que estimulam a broncodilatação), colinérgicas (estimulam a broncoconstrição) e as não-adrenérgicas (sabe-se da papel ativo dos neuropeptídeos, da serotonina, peptídeo G, entre outros). Tem-se então que o sistema respiratório é susceptível à ação dos mais variados agentes ou situações existentes em diferentes partes do organismo, sendo sistêmicos ou não, pela comunicação do trato respiratório com outros sistemas, via hematogênica ou através do ar. Uma alteração metabólica originária no sistema urinário, por exemplo, pode levar a uma resposta pulmonar por reação fisiológica compensatória de hiperventilação; e também ocorre o contrário: uma substância utilizada para fins terapêuticos no combate aos sintomas da asma (um agonista adrenérgico comum nas “bombinhas” por exemplo) agirá não somente nos receptores neurais objetivados, mas também em outros locais - não tão seletivamente quanto se poderia desejar, levando então a efeitos colaterais, como constipação intestinal, taquicardia etc.

De maneira análoga, este mecanismo de dupla via ocorre também com relação aos aspectos emocionais e o sistema respiratório. Isso seria de se esperar uma vez que as áreas do sistema nervoso central responsáveis pelo controle deste sistema estão intimamente relacionadas com as áreas envolvidas com a emoção: hipocampo, amígdalas, núcleos da base etc, além dos neurotransmissores citados (Figura 5). Está presente também aqui a dupla função de ação-reação, ou de causa-efeito. Por exemplo, num

quadro depressivo observa-se que os baixos níveis de dopamina e serotonina estão relacionados a uma função de hipoventilação, ou então uma ansiedade que produz hiperventilação.

Assim, é comum observarem-se queixas de natureza respiratória em pessoas com alterações emocionais as mais diversas e vice-versa: “falta de ar”, “sufoco”, “fôlego trava”, “respiração acelerada” etc.

Por outro lado, uma alteração gasosa gerada por modificações da mecânica respiratória pode causar mudança no humor: inalação de determinados níveis de dióxido de carbono desencadeia ataques de pânico (Nardi et al., 2000); o monóxido de carbono presente no ar poluente, por sua atividade depressora do sistema central, causa sonolência e certa melancolia, ou o inverso, uma substância que provoca euforia. Através deste mecanismo, e justamente por causa dele, chegou-se a utilização de várias substâncias ou situações com finalidade terapêutica, indo da simples recomendação do uso de um saco plástico na respiração nos casos de insônia por ansiedade leve (gera leve acidose respiratória pelo aumento dos níveis de CO₂, deprimindo os centros nervosos centrais) até o uso dos chamados psicofármacos, como os antidepressivos – por exemplo aqueles que impedem a recaptação de serotonina nas junções sinápticas, ou os estabilizadores do humor utilizados como anti-psicóticos que agem diretamente sobre as áreas do sistema límbico.

No caso dos psicofármacos, estuda-se bastante sua atuação sobre os diversos sistemas (como o circulatório, o digestivo, ação sobre o SNC, sistema motor etc) mas pouco se sabe sobre seus efeitos no aparelho

respiratório, salvo alguns casos de efeitos colaterais mais intensos e evidentes. No entanto, pouco se estudou até o momento sobre o que ocorre histoquimicamente, a nível celular tecidual, bioquímico e fisiopatológico no sistema respiratório com o uso dos psicofármacos.

1.2.2 Perturbações Funcionais da Respiração

Como todos os sintomas *funcionais*, as perturbações da respiração podem acompanhar as emoções, assumindo um caráter de *comunicação* (não verbal). Desta maneira, a angústia (em geral resultante de *raiva e/ou medo* mascarados) pode exprimir-se por hiperpnéia (aumento na frequência e amplitude respiratórias), com agitação (inquietação), sensação de opressão depressiva, estridor (suspiro), sufoco (como nos ataques de pânico).

Os suspiros convulsivos, a “tosse nervosa” e a “bola na garganta” estão associados a certos estados afetivos, tanto quanto a sensação de falta de ar que traduz o medo específico dos que sofrem de claustrofobia. Pode-se citar ainda o espasmo do choro do bebê e, durante a mamada a apnéia da asfixia que permitem “atingir a embriaguês e a beatitude” da satisfação oral sem limites e da fusão com a mãe, como o sedento que bebe de uma nascente até perder o fôlego, não se importando ou se interrompendo sem ser forçado, arquejante e à beira da asfixia.

Certas perturbações respiratórias, como por exemplo os bocejos compulsivos e irreprimíveis, permitem transmitir simultaneamente o sentimento de aborrecimento e a agressividade em relação ao ambiente.

As perturbações funcionais podem, por vezes, organizar-se na Síndrome de Hiperventilação. Tal crise pode fazer parte do quadro clínico de um ataque de pânico, nem sempre sendo o sentimento de angústia conscientemente associado aos sintomas somáticos, ou constituindo uma reação a uma situação conflituosa. Esta síndrome comporta alterações das funções fisiológicas sem lesão anatômica, e que são desencadeadas a partir de emoções. Essas alterações *patológicas* das funções do corpo são induzidas por estados psíquicos particulares, angústia¹ qualitativa ou quantitativamente patológica. As expressões corporais estão simbolicamente ligadas à angústia originária.

Na maioria dos casos descritos acima recomenda-se a psicoterapia, e se necessário associada ao uso de ansiolíticos e/ou anti-depressivos, exercícios respiratórios.

1.2.3 Outros Processos Patológicos Frequentemente Associados a Aspectos Emocionais

- ***Vias Respiratórias Superiores : Fobias***

Pacheco e Silva (1976) diz que uma pessoa pode, em virtude de um abalo emocional ver-se repentinamente impossibilitada de utilizar sua voz, que pode tornar-se rouca, tonalidade baixa, de timbre diferente, pouco clara

¹ Angústia – aqui o termo é utilizado com o significado de qualquer sensação ou sentimento pessoal de *desconforto*, não necessariamente denotando aspecto depressivo, mas sim uma queixa geral sem qualquer correlação com sua causa.

e inteligível, quando antes a dicção era perfeita e a clareza absoluta. A partir daí podem instalar-se fobias vocais, um medo de não recuperar mais a voz, levando a um “treino” constante dela, com desgaste ainda maior dos órgãos do aparelho fonador. Alguns pacientes apresentam ainda fenômenos espasmódicos acompanhados de constrição na garganta, sufocação, esgasgo, aflição, dispnéia, impressão da presença de corpo estranho, etc. Nesses casos indica-se tratamento medicamentoso e psicoterapia.

- **Asma Brônquica**

Há muito que os clínicos gerais conhecem a influência do sistema nervoso no desencadeamento dos acessos asmáticos (até já se utilizou anteriormente o termo “asma nervosa”). Pacheco e Silva (1976), citando Gillespie, afirma que é preciso reconhecer a importância dos fatores alérgicos na gênese da asma e também os fatores emocionais cunhando a clássica frase “um conflito psíquico pode acarretar uma crise de asma tanto quanto o pólen ou o pêlo de um animal”. Por vezes, os fatores emocionais e os alérgicos atuam conjuntamente, mas é indiscutível a influência, na deflagração das crises asmáticas, do ambiente, da constituição e dos componentes emotivos, particularmente na infância. Em muitos casos, a simples mudança de ambiente, a separação da criança de pais hiperemotivos, o repouso e a psicoterapia são suficientes para debelar crises de asma brônquica, onde antialérgicos e até corticosteróides mostraram-se ineficazes.

- ***Doenças Infecciosas das Vias Aéreas Superiores***

As doenças infecciosas das vias aéreas superiores, nomeadamente as rinites, as bronquites e as sinusites recidivantes estão muitas vezes ligadas a uma diminuição da resistência inespecífica. Os estudos de Cohen et al. (1991) mostraram uma relação dose-efeito entre o *estresse psicológico* e a taxa de infecções respiratórias e de “constipações” banais, independentemente de considerações relativas à idade, sexo, educação e mesmo estado alérgico.

- ***Tosse Psicógena***

A tosse – tentativa de expulsão pelas vias aéreas de um objeto estranho irritante, pode ser induzida pela angústia, tendo um significado na “linguagem do corpo” e tornar-se a expressão de uma situação interior intolerável. Este sintoma pode amplificar-se até atingir verdadeiros acessos de tosse que duram minutos ou horas. Seu carácter expressivo pode englobar significados como o protesto, a agressividade, embaraço, aborrecimento, procura de contato, apelo etc. A tosse pode preceder um ataque de asma. Muitos pacientes podem ainda desenvolver sensação de “prurido”, irritação, secura na mucosa da faringe, o que os obriga a tossirem ainda mais incessantemente. Através da psicoterapia é comum este sintoma desaparecer após mobilização da agressividade para outro foco.

- ***Tiques Respiratórios***

Os tiques são caracterizados por respiração ruidosa, fungar frequente, emissão de roncos, sibilos, com a participação do diafragma, dos músculos

torácicos, acompanhando-se na maioria das vezes de movimentos sinérgicos dos músculos do nariz e dos lábios. Há casos de transtornos do ritmo respiratório de origem nervosa dos mais variados tipos – taquipnéia, bradipnéia, etc. Incluem-se nesse grupo os distúrbios respiratórios histéricos, uma vez que caracterizam-se por uma taquipnéia pura, sem sinais objetivos de dispnéia, cianose, ou a utilização dos músculos acessórios da respiração.

- ***Tabagismo***

Segundo Angst et al. (1970), citados por Haynal et al.(1998), os fumantes sofrem de maior instabilidade emocional, são mais sensíveis e sensíveis do que os não-fumantes, mais susceptíveis, desconfiados, imbuídos de si próprios, atormentados, inibidos; ao mesmo tempo, são menos desportistas, bebem mais álcool e são mais extrovertidos do que os não-fumantes.

Um fumante multiplica por dois os seus riscos de morrer antes dos 65 anos de idade, em função do número de cigarros, da precocidade do hábito de fumar e da taxa de inalação das substâncias carcinogênicas (benzopireno, níquel, arsênio entre outras), do alcatrão e das outras substâncias ativas (nicotina, gases tóxicos, etc).

Os quadros descritos acima podem ser causa de indicação de terapêutica medicamentosa para alívio ou como coadjuvante no tratamento dos sintomas e sinais. Entretanto, ocorre que a maioria das substâncias ingeridas, inaladas ou injetadas têm o sistema pulmonar obrigatoriamente em seu trajeto, quer seja seu local de ação ou não, pois como mencionado

anteriormente o sistema respiratório representa um importante meio de intercomunicação com o exterior. Dessa maneira qualquer droga utilizada para qualquer finalidade, e independentemente de sua dosagem, passará pelo aparelho respiratório podendo deixar marcas, seqüelas etc.

1.3 Ação de Drogas sobre os Pulmões

1.3.1 Definição

Estima-se que de 2 a 5% dos pacientes que são hospitalizados têm como causa de internação “reação à droga”. Além disso, 0,3% das mortes de pacientes hospitalizados são decorrentes exclusivamente de reações a drogas (Rosenow, 1994).

As reações pulmonares a drogas são o resultado de efeitos diretos ou indiretos de uma substância no pulmão. Os efeitos diretos podem ser divididos entre aqueles que representam reação tóxica e aqueles que são reações idiossincrásicas.

Os critérios para um diagnóstico de reação por droga são bastante rigorosos (Travis et al., 1976):

- a substância deve ter sido administrada num tempo consistente com a reação adversa e outras possíveis causas devem ter sido excluídas;

- a reação diminui quando o uso da droga é interrompido e recorre quando reiniciada;
- o padrão da doença (clínico, radiológico, e/ou patológico) é característico da droga em questão;
- e, em alguns casos, as drogas estão presentes em níveis anormais (Irey, 1976).

As reações a drogas nos pulmões representam um problema clínico significativo, e sua frequência têm aumentado muito, sendo que há uma grande variedade de substâncias que têm sido implicadas na causa de doenças pulmonares.

Os grupos farmacológicos relacionados com toxicidade pulmonar incluem antimicrobianos, agentes antiinflamatórios, quimioterápicos, drogas cardiovasculares e drogas ilícitas.

Geralmente, as reações pulmonares por drogas são resultado de efeitos diretos ou indiretos da substância em questão (Rosenow et al., 1992).

As reações devidas a efeitos diretos podem ser divididas naquelas que são reações tóxicas (e que em parte são associadas à dose, tais como os agentes quimioterápicos) e aquelas que não o são, embora essa seja uma divisão artificial, além do que as reações nem sempre são claramente distinguíveis.

Como reações do tipo que exerce efeito direto no pulmão cita-se a amiodarona, através de fosfolipidose adquirida e a bleomicina (Colby et al., 1995).

Alguns exemplos de efeitos indiretos de drogas nos pulmões incluem as complicações tromboembólicas, depressão do SNC induzida por droga e seus efeitos no pulmão (aspiração, por exemplo) e, mais importante, imunossupressão induzida com infecção pulmonar oportunista.

Poucas drogas produzem achados histológicos únicos e exclusivos, sendo que essa falta de especificidade complica o diagnóstico. Além disso, uma droga pode estar associada a mais de um padrão clínico e/ou patológico de doença, como por exemplo, a nitrofurantoína que pode manifestar pneumonite intersticial aguda, hemorragia pulmonar, broncoconstrição, anafilaxia (Zitnik et al., 1990), etc.

1.3.2 Síndromes clínicas associadas a reações pulmonares por drogas

A identificação de doença pulmonar induzida por droga requer uma consideração sobre qualquer mudança no curso clínico do paciente como sendo devida a uma possível resposta a medicações. Não há sinais patognomônicos, sintomas, exames laboratoriais, ou características patológicas que identifiquem uma substância como a causa da doença. Além disso, a doença pulmonar induzida por droga deve ser distinguida de doenças mais comuns ou causas de exacerbação da doença em curso tais como asma, infecção, insuficiência cardíaca congestiva, tromboembolismo pulmonar, ou malignidade.

Entretanto, existem algumas peculiaridades marcantes de reações pulmonares por drogas (Zitnik et al., 1990). Talvez, analogamente a erupções

fixas localizadas na pele, algumas reações pulmonares por drogas sejam relativamente localizadas. As reações no pulmão podem se apresentar como um processo agudo num paciente que vinha em uso de determinada droga por meses ou mesmo anos. As complicações pulmonares tardias devidas à terapia por drogas podem levar anos para manifestarem-se, ou mesmo após a resolução do quadro clínico e término do uso da substância.

O espectro de síndromes clínicas associadas a reações pulmonares por drogas é amplo, e abrange a maioria das síndromes pulmonares. Entretanto, uma classificação útil considera o tempo de instalação da doença e/ou a taxa de sua progressão:

- ♦ reações agudas (início das manifestações num período de minutos a horas da tomada da medicação); por exemplo, anafilaxia, exacerbação de broncoespasmo, hipoventilação alveolar, ou edema pulmonar;
- ♦ reações subagudas (dias a semanas), caracterizadas por pneumonite de hipersensibilidade, lúpus eritematoso sistêmico induzido por drogas, pneumonite eosinofílica, hemorragia alveolar, dano alveolar difuso, pneumonia organizante com ou sem obliteração, ou processos pleurais;
- ♦ reações crônicas (meses a anos), vistas principalmente em pacientes com pneumonite intersticial.

A apresentação clínica dos pacientes com a maioria das reações a drogas não é específica: tosse, dispnéia, fadiga, febre, dor no peito, e perda

de peso são as manifestações mais comuns. Ao exame físico pode haver crepitações à ausculta pulmonar, sendo mais rara a evidência de derrames pleurais. Estudos laboratoriais podem mostrar eosinofilia sérica. A radiografia de tórax pode evidenciar opacificação parenquimal e, raramente, derrame pleural. Os testes de função pulmonar em geral mostram diminuição na difusão de monóxido de carbono, com ou sem padrão restritivo (Rosenow et al., 1992, Zitinik et al., 1990).

Para auxílio no estabelecimento de um diagnóstico pode requerer-se uma biópsia de pulmão; um lavado bronco-alveolar (LBA) pode também ser de grande valia na suspeita de doenças pulmonares induzidas por drogas, ou mais ainda nos processos infecciosos ou malignidade.

Os achados no LBA mais sugestivos incluem (Travis et al., 2002, Martin, 1992):

- Reações citotóxicas (citomegalia, eosinofilia citoplasmática, hipercromasia nuclear, nucléolos proeminentes, e multinucleação), número de eosinófilos aumentados;
- Hemorragia pulmonar com macrófagos alveolares com hemossiderina;
- Alveolite linfocítica (40-50% das células são linfócitos); linfócitos tipo CD8+ e diminuição da proporção entre os tipos CD4+ e CD8+ sugerem reação de hipersensibilidade. A alveolite linfocítica tem sido associada ao uso de metotrexato, a sais de ouro e à azatioprina;
- Alveolite neutrofílica, consistindo de menos de 5% de neutrófilos, pode sugerir fibrose;

- Alveolite eosinofílica, consistindo de mais de 5% de eosinófilos. Muitas substâncias podem causar uma reação aguda tipo “alérgica” ou “de hipersensibilidade” que se manifestam pelo início dos sintomas dentro de alguns dias após a medicação. São frequentes febre, chiado, dispnéia, infiltrados pulmonares e eosinofilia periférica;
- Pneumonia lipóide devida à inalação de óleos minerais ou laxativos.

A terapia com amiodarona está associada ao desenvolvimento de inclusões lamelares nos macrófagos alveolares, indicando uma fosfolipidose; esse achado indica apenas que o paciente está tomando a medicação e não garante informação sobre a possibilidade de toxicidade pulmonar (Martin, 1992, Ohar et al., 1992).

1.3.3 Padrões histopatológicos associados às reações pulmonares por drogas

Existem muitos padrões histológicos associados à lesão pulmonar por droga. Enquanto algumas substâncias produzem padrões puros, em outras situações torna-se difícil elaborar um tipo de classificação. Um exemplo disso é a situação onde há evidência de organização aguda e de doença crônica no mesmo espécime de biópsia sendo que as características não preenchem os critérios de nenhum tipo de padrão bem reconhecido.

Outro fator a ser considerado para o diagnóstico é o fato de haver relatos prévios associando a lesão pulmonar ao uso de determinada

substância (em geral uma pneumonia intersticial). Como fator complicador deve-se apontar que, frequentemente, os pacientes fazem (ou já fizeram) uso de diversas medicações simultaneamente, como por exemplo, no caso de agentes quimioterápicos, podendo ser impossível implicar uma droga específica no resultado de uma biópsia.

Ainda assim podemos citar as seguintes condições e as drogas a elas associadas (Travis et al., 2002):

- ♦ *Pneumonia intersticial crônica*: amiodarona, bussulfan, clorambucil, cocaína, ciclofosfamida, **fluoxetina**, sais de ouro, metotrexato, nilutamida, nitrofurantoína, fenitoína, pindolol, procarbazina, quinidina, sulfassalazina e triptofano.
- ♦ *Dano alveolar difuso*: amiodarona, amitriptilina, azatioprina, bleomicina, bussulfan, cocaína, colchicina, ciclofosfamida, mesilato de deferoxamina, sais de ouro, metotrexato, mitomicina, nitrofurantoína, penicilamina, procarbazina, estreptoquinase, tocinida, vinblastina, e zinostatina.
- ♦ *Pneumonia organizante* (bronquiolite obliterante com padrão de pneumonia organizante): amiodarona, bleomicina, clorozotocina, cocaína, ciclofosfamida, sais de ouro, hexametônio, interferon, metotrexato, mitomicina, nilutamida, penicilamina, nitrofurantoína, fenitoína, sulfassalazina e tocinida.

- ♦ *Bronquiolite obliterante* (bronquiolite constrictiva com obstrução de via aérea): sais de ouro e penicilamina.
- ♦ *Infiltrados pulmonares com eosinofilia*: paracetamol, ampicilina, bleomicina, carbamazepina, clorpropamida, cocaína, cromolim, imipramina, naproxeno, nitrofurantoína, fenilbutazona, procarbazina, propranolol, pirimetamina, sulfasalazina, tetraciclina, trazodona e abuso de inalação de Scotchguard®.
- ♦ *Edema pulmonar*: buprenorfina, clordiazepóxido, cocaína, codeína, citosina, arabinosida, epinefrina, haloperidol, heroína, hidroclortiazida, lidocaína, metanfetamina, metotrexato, mitomicina, nalbufina, naloxano, nifedipina, paraldeído, penicilina, propoxifeno, propranolol, material de radio-contraste, ritodrina, salbutamol, salicilatos, terbutalina, e triptofano.
- ♦ *Hemorragia pulmonar*: anfotericina B, anti-coagulantes, cocaína, ciclofosfamida, haloperidol, hidralazina, mitomicina, nitrofurantoína, penicilamina, propiltiouracil, estreptoquinase, sulfonamidas e uroquinase.
- ♦ *Hipertensão pulmonar*: fenfluramina, fenteramina, mitomicina, metanfetamina, triptofano, e abuso de drogas injetáveis.
- ♦ *Inflamação granulomatosa*: acebutolol, Bacillus Calmette Guérin (BCG), cocaína, cromalina sódica, **fluoxetina**, metotrexato,

nitrofurantoína, procarbazina, pentazocina e tripelenamina, abuso de drogas intra-venosas (granuloma tipo corpo estranho).

- ◆ *Enfisema*: usuários de drogas injetáveis, particularmente contendo metadona, metilfenidato, ou talco.
- ◆ *Bronquiectasia*: pode ser encontrada em dependentes graves de heroína e com sintomas pulmonares, com ou sem radiografias torácicas anormais. Aparentemente relacionados ainda com episódios de edema pulmonar induzido por heroína, pneumonia de aspiração ou infecção.
- ◆ *Fibrose progressiva massiva*: abuso de drogas injetáveis.
- ◆ *Doença pleural*: aciclovir, amiodarona, bleomicina, bromocriptina, clozapina, ciclofosfamida, dantrolene, d-penicilamina, interleucina-2, isotretinoína, itraconazol, l-triptofano, metotrexato, metisergide, mesalamina, minoxidil, mitomicina, nitrofurantoína, practolol, propiltiouracil, procarbazina, agentes esclerosantes (álcool absoluto), sinvastatina, ácido valpróico, e pleurodese por talco.
- ◆ *Pleurite lúpica induzida por droga*: procainamida, hidralazina, clorpromazina, isoniazida, metildopa, penicilamida e quinidina.

Algumas reações por drogas podem ainda eventualmente manifestarem-se como massas localizadas ou opacificações em radiografias de tórax que são achados frequentes com o uso de bleomicina e amiodarona.

1.4 Sistema Nervoso Autônomo no Aparelho Respiratório

A inervação do sistema respiratório no ser humano é constituída por (Richardson et al., 1979, Capelozzi et al., 1998, Saldiva et al., 2000):

- ♦ *fibras colinérgicas* – utilizam a acetilcolina como neurotransmissor, e promovem a contração de células musculares das vias aéreas;
- ♦ *fibras adrenérgicas* – utilizam a epifrenina (ou adrenalina) e a norepinefrina (ou noradrenalina) *como mediadores, promovendo a broncodilatação*;
- ♦ *fibras nervosas do sistema NANC* (não-adrenérgicas e não-colinérgicas) – sistema constituído por fibras aferentes sensitivas não mielinizadas, que utilizam como mediadores a nível pulmonar substâncias como os neuropeptídios, a substância P e a neurocinina, que são capazes de promover e exacerbar a resposta inflamatória em várias doenças, como na asma por exemplo (Tibério et al., 1997).
- ♦ *fibras nervosas que utilizam a serotonina como seu mediador*- daí sua denominação de fibras serotoninérgicas. Embora a serotonina esteja presente na maior parte dos tecidos (como no encéfalo e no intestino) e também nos fluídos corporais, as terminações neurais exclusivamente serotoninérgicas são detectáveis em vias aéreas somente até o nível de bronquíolos proximais, onde seu

mecanismo de ação ainda é controverso, acreditando-se que exerçam possível ação broncoconstritora (Capelozzi et al., 1998, Sanders-Jush & Mayer, 2003).

1.5 Fluoxetina

1.5.1 Fluoxetina - Dados Farmacológicos e Mecanismo de Ação

Fluoxetina é uma substância pertencente à família das fenilpropalaminas (Figura 4), possuindo uma propriedade antidepressiva importante.

Atua como inibidor seletivo da recaptação da serotonina – I.S.R.S. (Sanders-Jush & Mayer, 2003), a nível pré-sináptico na junção neuro-efetora.

Para tanto utiliza a serotonina (5-hidroxitiramina, ou 5-HT) como neurotransmissor, advindo desta maneira o termo “via serotoninérgica”, assim como “via adrenérgica” quando utiliza-se a norepinefrenina como neurotransmissor, ou “via colinérgica” no caso da acetilcolina (Figuras 5 e 6).

A serotonina encontra-se presente na maior parte dos tecidos humanos embora as fibras neurais serotoninérgicas a nível respiratório sejam identificáveis somente até bronquíolo proximal.

A especificidade de um inibidor seletivo – como a fluoxetina, confere à mesma efeitos colaterais pouco importantes, o mesmo já não ocorrendo com um agente anti-depressivo de geração anterior – os tricíclicos (a imipramina, por exemplo). Entretanto, um efeito colateral bastante conhecido e

associado ao uso de anti-depressivos em geral, não sendo a fluoxetina portanto uma exceção, são as alterações ligadas à disfunção sexual- como a diminuição da libido e dificuldades de orgasmo (Costa et al., 1996).

Os agentes tricíclicos ao utilizarem a via adrenérgica acabam por atuar também em outros receptores, ocasionando assim efeitos colaterais frequentes e importantes como sedação, taquicardia, sialoquiese (efeitos de ação anti-colinérgica), entre outros. Seus efeitos sobre o sistema respiratório são bem conhecidos e descritos na literatura.

Os principais locais de ação da fluoxetina dentro do sistema nervoso central (SNC) podem ser bem visualizados na Figura 2, segundo a disposição das fibras nervosas serotoninérgicas, explicando por si só seus locais de ação, e conseqüentemente suas principais indicações clínicas (que serão descritas adiante).

Uma importante característica inovadora da fluoxetina é sua praticidade na posologia medicamentosa. Em geral é utilizada em dose única uma única vez ao dia, ao contrário da geração anterior.

Outras características farmacológicas da fluoxetina são:

- ♦ rapidamente reabsorvida pelo trato gastro-intestinal apresentando uma concentração plasmática máxima entre 6 a 8 horas após a administração;
- ♦ sua biodisponibilidade sistêmica parece não ser afetada, mas podendo retardar a sua absorção;
- ♦ apresenta metabolização hepática, sendo a nor-fluoxetina seu metabólito mais ativo;

- ◆ sua excreção é feita principalmente pela via urinária;
- ◆ seu início de ação antidepressiva ocorre entre a primeira e terceira semanas de tratamento, tendo um efeito otimizado em quatro semanas;
- ◆ apresenta uma alta taxa de ligação proteica (por ser uma amina);
- ◆ apresenta um grande volume de distribuição e uma meia vida de eliminação de dois a três dias, enquanto que o seu metabólito ativo- nor-fluoxetina, apresenta uma meia vida de 7 a 9 dias;
- ◆ sua meia vida de eliminação é prolongada, assim como seus metabólitos ativos, assegurando que mesmo quando o tratamento é interrompido o princípio ativo ainda persistirá por semanas.

Tais fatores associados fizeram da fluoxetina uma substância de larga utilização dentre as especialidades médicas.

1.5.2 Fluoxetina - Indicações Clínicas

Ambas substâncias, tricíclicos e inibidores seletivos de serotonina (como a fluoxetina), têm as mesmas indicações clínicas (Sanders-Jush & Mayer, 2003):

- quadros depressivos (Kapplan & Sadock, 1998);
- ansiedade (Sanders-Jush & Mayer, 2003, Rosenbaum, 2001);
- síndrome de pânico (Stokes, 1993);
- distúrbios fóbicos e obsessivos (Foa et al., 1995);

- obesidade (Montecinos et al., 1993);
- bulimia (Walsh, 1991);
- fibromiosite (Goldenberg et al., 1996);
- entre outros.

Os raros efeitos colaterais, associados a sua fácil administração e boa aceitação, fizeram da fluoxetina uma substância de amplo uso em Psiquiatria e Clínica Médica (Stokes, 1993, Souêtre et al., 1996), além de outras especialidades.

FIGURA 4. Estrutura Molecular da Fluoxetina

(Reproduzido de Stark *et al.*, 1995)

FIGURA 5. Esquema de representação da Via Serotonérgica no SNC

(Adaptado de Sanders-Jush & Mayer, 2003)

FIGURA 6. Fluoxetina – Mecanismo de Ação na Junção Neuro-Efetora

1.6 Fluoxetina e Sistema Respiratório

As queixas relativas ao sistema respiratório são muito frequentes por parte da maioria dos pacientes. Os exemplos mais comuns são: tosse, falta de ar, aperto no peito, etc.

Entretanto, existem poucos e isolados relatos na literatura científica sobre a fluoxetina e seus efeitos no sistema respiratório, excetuando-se particularmente pneumonia de hipersensibilidade, fosfolipidose e doença intersticial pulmonar associada à fluoxetina (Gonzalez-Rothi et al., 1995, Vandezand et al., 1997, Braun et al., 1999, Estarriol et al., 2000). Este foi um dos motivos que justificou a realização do presente estudo.

1.7 Métodos de avaliação de estresse em animais

Existem vários métodos já consagrados na literatura científica e que possibilitam um estudo e avaliação dos diferentes tipos de estresse em animais, podendo ser aplicados com diferentes objetivos:

- Estudo dos efeitos terapêuticos e/ou adversos de determinada droga;
- Estudos dos locais de ação das substâncias e/ou seus antagonistas;
- Estudo comparativo entre diferentes drogas, bem como possível associação entre elas;
- Estudo de curva dose-resposta das substâncias;
- Estudo das reações similares em humanos;

- Estudo de parâmetros psíquicos como memória, humor, concentração, pragmatismo, comportamento obsessivo etc.
- Estudo de reações sociais, comportamentais, de aprendizado etc.
- Entre outros.

Em geral, um determinado método tradicional é escolhido pelos autores segundo os objetivos pretendidos, efetuando-se então adequações ou modificações pertinentes. Desta maneira, não existe por exemplo um determinado período de tempo específico que um método deva ser aplicado, tempo de sua duração ou de exposição, sua intensidade, interação com outros fatores etc.

Entre os métodos mais usuais e comumente descritos na literatura, bem como suas principais aplicações, podem-se citar como exemplos:

- 1- *Estímulo por Choque Elétrico* (Portela et al., 2002) – o animal recebe carga elétrica de choque, cada vez que realiza determinada manobra, com ou sem recompensa por esse ato, sendo avaliado seu comportamento de fuga ou de evitar situações e/ou locais por exemplo;
- 2- *Reação Direta ao Estímulo* (Mitchell et al., 2001) – o animal recebe carga elétrica de choque em determinada área responsável por uma reação específica, como o estímulo de certas cerebrais, como as relacionadas a reações de humor localizadas no hipotálamo e hipocampo;

- 3- *Método de Atividade Motora nas Rodas Circulantes (Wheel-Running)* (Rhodes et al., 2001) – o animal é colocado dentro de uma gaiola onde há espaço unicamente para uma roda girável e dentro da qual ele passa a movimentar-se;
- 4- *Método de Restrição Motora* (Lino-de-Oliveira et al., 2001, Singh et al., 2001, Cuadra et al., 2001) – o animal tem seus movimentos restringidos mecanicamente, em geral por ataduras ou colocados em recipientes sem espaço para qualquer tipo de movimentação;
- 5- *Método de Suspensão pela Cauda (Tail Suspension Test)* [Mayorga et al., 2001, Rupiniak et al., 2001] – o animal fica suspenso e preso por sua cauda durante determinado tempo o que faz com que ele se movimente na tentativa de desprender-se. O método pode ser útil na avaliação de possíveis coadjuvantes de medicação analgésica;
- 6- *Teste do Nado Forçado (Forced Swimming Test)* [Rupiniak et al., 2001, Griebel et al., 1999, Contreras et al., 2001, Renard et al., 2001] – o animal é inserido em ambiente fechado e cheio de água para nadar, e em que avalia-se geralmente o efeito da imobilidade despertada;
- 7- *Métodos de Dor* (Singh et al., 2001, Rupiniak et al., 2001, Griebel et al., 1999); os exemplos mais usuais são:
- “chapa quente” : o animal é colocado sobre chapa aquecida passando a “sapatear”;
 - “tail flick” (leves chicoteadas ou pinçamentos da cauda do animal);
 - torção do corpo do animal.

- 8- *Métodos de Desequilíbrio* (Venault et al., 2001) – o animal ao ser colocado num braço balançante fica desequilibrado (efeito vestibular) durante certo período de tempo, após o que avaliam-se critérios como a descoordenação motora do andar, elevação do tronco e do ângulo da cauda;
- 9- *Compulsão de Lamber o Flanco (“Flank Marking”)*[Ferris et al., 2001] – o animal, frente a um ambiente ou situação neofóbicos passa a ter comportamento compulsivo de lamber-se;
- 10- *Comportamento Predatório* (Belzung et al., 2001) – os animais são expostos a seus predadores ou a elementos que os representem: como exemplo principal podemos citar a exposição de um camundongo a um gato ou às suas fezes.
- 11- *Teste de Livre Exploração* (Belzung et al., 2001) – o animal é exposto a ambientes neofóbicos (em geral após permanecer um período confinado em ambiente conhecido), passando a explorá-lo de maneira intensa, efeito esse atenuado ou até suspenso quando o animal é previamente submetido a tratamento com substância medicamentosa (particularmente ansiolítica).

1.8 Modelo Experimental Utilizado

A fim de certificar-nos de haver um efeito terapêutico da fluoxetina nas cobaias durante o experimento, era de se supor que submetêssemos os animais a algum tipo de estresse. Esse efeito deveria também ser passível de ser ao menos atenuado pelo uso da substância.

Entre os métodos utilizados para essa finalidade em animais, relatados na literatura e já descritos anteriormente – particularmente em ratos ou camundongos, optamos pelo “Nado Forçado”. Consideramos que este seria menos invasivo e proporcionaria igualmente um tipo de estresse inevitável: um tipo de reação “tipo pânico”.

Tem sido descrito que alguns animais – como ratos Wistar por exemplo, podem ser úteis para estudo dos mecanismos biológicos envolvidos nesse tipo de quadro de estresse. São tratados aguda ou cronicamente – com uma injeção diária intraperitoneal durante 14 -21 dias, de anti-depressivos tipo fluoxetina (em doses que variam de 5 a 20 mg/kg) sendo os animais a seguir expostos a testes de nado forçado (Rupiniak et al., 2001, Griebel et al., 1999, Contreras et al., 2001, Renard et al., 2001). O critério de avaliação terapêutica é tão somente uma maior anti-imobilidade na água: o animal reage melhor ao estresse movimentando-se durante um tempo maior na água, fenômeno esse decorrente da ação da medicação administrada. Foram descritos nesses experimentos somente o início – ou não, do período de anti-imobilidade dos animais, sem qualquer outro critério analisado.

Alguns autores têm utilizado esse método tradicional com diferentes objetivos, particularmente no que diz respeito à pesquisa de diferentes doses ou curva dose-resposta de substâncias, ou ainda seus efeitos sobre as áreas cerebrais correspondentes (Griebel et al., 1999, Contreras et al., 2001, Renard et al., 2001).

Entretanto, a fim de atingirmos nossos objetivos, realizamos modificações e adaptações pertinentes ao método usual do nado forçado, chamando-o então (para simples diferenciação) de “Natação Forçada”. Aqui a substância pôde ser administrada aos animais oral e diariamente – e assim assemelhar-se mais ao uso humano, submetendo-os simultaneamente a um constante e não invasivo método de estresse, com registro e análise criteriosos durante o tempo em que os animais permanecem na água.

O método desenvolvido pelo protocolo implica numa reação de estresse inevitável por parte do animal, que por não ter por onde sair, passa a lutar pela sobrevivência e tentar escapar – algo semelhante a uma reação aqui denominada “tipo pânico”.

A dose de fluoxetina escolhida para ser administrada às cobaias foi de 10 mg/kg/dia, considerando-se os relatos descritos na literatura (Mitchell et al., 2001, Lino-de-Oliveira et al., 2001, Singh et al., 2001, Cuadra et al., 2001, Mayorga et al., 2001, Belzung et al., 2001).

***JUSTIFICATIVAS PARA O PRESENTE
ESTUDO***

2. JUSTIFICATIVAS PARA O PRESENTE ESTUDO

- Fluoxetina com raros relatos na literatura científica a cerca de seus efeitos adversos, particularmente os referentes ao sistema respiratório;
- Uso da fluoxetina bastante difundido entre a classe médica;
- Fluoxetina como droga relativamente nova no mercado farmacêutico (cerca de 15 anos);
- Pacientes em Psiquiatria e Clínica Médica relatam frequentemente queixas de natureza respiratória, como falta de ar, tosse, “angústia” no peito etc.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

- Elaboração de modelo experimental de doenças pulmonares droga-induzidas.
- Estudar os efeitos da fluoxetina no sistema respiratório, inclusive os possivelmente adversos, num modelo experimental em cobaias – *guinea pigs* (GP), em que o uso contínuo da substância seja o mais semelhante possível ao uso em humano, ou seja, contínuo e administrado oralmente.
- Avaliação de parâmetros possíveis com o modelo como:
 - papel do óxido nítrico exalado enquanto marcador inflamatório;
 - alterações na mecânica respiratória encontradas no modelo;
 - aspectos histopatológicos envolvidos;

MÉTODOS

4. MÉTODOS

Todos animais do nosso modelo experimental receberam cuidados de acordo com os "*Principles of laboratory animal care*" publicados pelo National Institute of Health (NIH publication 86-23, revisado em 1985).

Nosso estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa de nossa instituição, de acordo com o Protocolo de Aprovação de Pesquisa obtido com o número 224/02.

4.1 Natação Forçada

Foi criado um *protocolo* para o experimento, descrito a seguir.

Cada animal foi colocado dentro de um recipiente cheio de água potável e limpa- trocada diariamente, à temperatura ambiente, e medindo 50 cm (comprimento) x 40 cm (largura) x 30 cm (profundidade), com bordas arredondadas para evitar que a cobaia pudesse sair, e então deixado para nadar livremente, individualmente. Cada animal foi observado e monitorado, tendo seus registros anotados.

Por "permanência" na água definimos um padrão que compreende a somatória do período da natação em si, somado aos períodos de pausas e/ou de flutuação com mínimos movimentos (em que o animal simplesmente "boiou" na água).

Os critérios para a retirada do animal da água foram :

- permanência não maior que 30 segundos comparativamente ao dia anterior;
- afundar duas vezes (exceto para mergulhos “intencionais” aprendidos pelo animal ou movido pelo instinto, na tentativa de busca por saídas alternativas);
- sinais de fadiga (desconforto respiratório, bem como movimentos descoordenados);
- dois ou mais espirros (a cobaia é um animal que respira somente pelo nariz, não sendo então desejada aspiração de líquidos);
- qualquer sinal anterior pôde significar portanto proximidade de ameaça de afogamento.

A prova de natação forçada começou com um período inicial de permanência na água de 2 minutos, período esse que foi aumentando no máximo 30 segundos ao dia, evitando-se assim possível cansaço por fadiga e dor muscular. Com isso propiciou-se ainda um condicionamento físico aos animais. (Figura 7).

Para que o animal não sofresse com o frio acarretado pela diferença de temperatura ao ser retirado da água, foi enxugado manualmente sendo a seguir submetido a banho de luz com lâmpada infra-vermelha, até que não mais tremesse e estivesse totalmente aquecido e seco.

Com intuito de facilitar a avaliação da evolução dos tempos de natação e seus possíveis efeitos consequentes, selecionamos os valores de

cinco dias específicos: 1^o dia, 8^o dia, 16^o dia, 24^o dia e 30^o dia, designando-os então T1, T8, T16, T24 e T30, respectivamente.

Os tempos de duração de natação foram anotados diariamente (em segundos) para cada animal.

FIGURA 7. A e B mostram fotos de cobaia durante a natação forçada

4.2 Grupos Experimentais

Todas as cobaias eram do sexo masculino, de linhagem Hartley e provenientes da empresa MEDLAB Produtos Diagnósticos LTDA (São Paulo, Brasil) pesando inicialmente 150-200 gramas, e com 3 semanas de idade aproximadamente.

Os animais foram mantidos durante todo o período do experimento no biotério de manutenção conjunto dos Laboratórios de Investigação Médica (LIM 05 e LIM 20) desta faculdade, recebendo alimento e água *ad libitum*, em condições ideais e controladas de temperatura, umidade e ruído.

Os animais foram pesados a cada 7 dias para que a dose individual de fluoxetina correspondente pudesse ser atualizada.

Os animais foram divididos em quatro grupos:

- I. **Grupo Nat-FI** = cobaias que receberam fluoxetina (10 mg/kg/dia v.o. - Daforin®, Sigma-Novaquímica, Brasil) e também submetidos à natação forçada durante 30 dias consecutivos - n=7;
- II. **Grupo Nat-Sal** = cobaias que receberam somente solução salina v.o. e submetidos à natação forçada durante 30 dias consecutivos - n=8;
- III. **Grupo FI** = cobaias que receberam somente fluoxetina (10 mg/kg/dia v.o. - Daforin®, Sigma-Novaquímica, Brasil) durante 30 dias consecutivos, sem serem submetidos à natação forçada - n=7;
- IV. **Grupo Sal** = cobaias que receberam somente solução salina v.o., durante 30 dias consecutivos - n=8.

Número total de animais do experimento $n_T = 30$.

No 31^o dia todos os animais foram anestesiados, e então mecanicamente ventilados, onde procedeu-se à obtenção dos valores da mecânica respiratória, além da mensuração do óxido nítrico exalado por 3 minutos em saco coletor apropriado (Figura 8).

FIGURA 8. Esquema mostrando o animal – já anestesiado e traqueostomizado, conectado a um aparelho ventilador tipo *FlexiVent* (SCIREQ, Montreal, Canada), e também a uma cânula acoplada ao saco coletor (*Mylar Bag*) de óxido nítrico exalado.

4.3 Mecânica Respiratória

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico, na dose de 50 mg/kg i.p., com uma dose adicional quando necessário. As cobaias foram traqueostomizadas com cânulas de polietileno de diâmetro interno de 0,17mm. A cânula foi conectada a um respirador apropriado (*FlexiVent, SCIREQ, Montreal, Canada*) e o animal foi ventilado com V_T of 8 mL/kg e frequência respiratória de 60 respirações / minuto.

P_{tr} (pressão traqueal), $\dot{V}$ (fluxo) e V (volume) foram coletados durante uma oscilação sinusoidal. A resistência (R_{rs}) e elastância (E_{rs}) do sistema respiratório foram calculadas automaticamente por um computador, através da equação de movimento:

$$P_{tr}(t) = E_{rs}.V(t) + R_{rs}.\dot{V}(t)$$

onde

- $P_{tr}(t)$ é a pressão à abertura aérea
- $V(t)$ é o volume que entra nos pulmões
- $\dot{V}(t)$ é o fluxo de ar
- (t) é o tempo

4.4 Concentração de Óxido Nítrico Exalado

O óxido nítrico exalado (E_{NO}) foi mensurado por quimiluminescência utilizando-se um analisador de resposta rápida (NOA 280, Sievers Instruments Inc., Boulder, CO). O aparelho foi calibrado com uma fonte de óxido nítrico (NO) conhecida e certificada (White Martins, Brasil) de 47 partes por bilhão (ppb) e acoplado a um filtro (Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, EUA) com concentração NO reduzida a zero antes de cada mensuração (Mehta et al., 1997). Este filtro conectou-se à válvula inspiratória do ventilador *Harvard 683* objetivando evitar-se contaminação por NO ambiente. Foram colhidos os níveis de NO à saída do ar exalado durante três minutos, utilizando-se de balões impermeáveis a esse gás (Mylar Bag, Sievers, Instruments Inc., Boulder, CO, EUA).

A seguir, e ainda sob efeito da anestesia, os animais foram submetidos à laparotomia e receberam 0,2 mL de heparina sódica (5000 U.I./mL, Roche, São Paulo, Brasil) na veia cava inferior. Após alguns minutos os pulmões foram lavados através de canulação do ventrículo direito com solução de soro fisiológico heparinizado, na proporção de 40 mL de soro fisiológico para 1 mL de heparina sódica. O átrio e a veia cava inferior foram seccionados para realizar a exsangüinação do animal. Imediatamente após a exsangüinação, foi aplicada uma pressão positiva expiratória final (PEEP) de 5 cm de H_2O na porção expiratória do respirador para evitar colapamento alveolar devido à abertura da caixa torácica. A traquéia foi

ocluída ao final da expiração, com o intuito de manter o volume pulmonar próximo à capacidade residual funcional.

Os pulmões e coração foram retirados *en bloc* e submetidos à análise macroscópica, estudos morfométrico e histopatológico.

4.5 Análise Macroscópica

Cada pulmão de cobaia foi avaliado quanto aos aspectos macroscópicos, a saber:

- Enquanto peça cirúrgica inteira, foram verificados parâmetros como dimensões, coloração, aspecto (se homogêneo, uniforme etc), textura, presença de possíveis áreas contrastantes ao tecido normal padrão com suas especificações (como localização, dimensões, colorações, etc), aspecto da pleura;
- O corte dos pulmões em secções transversais permitiu visualização e análise macroscópica dos aspectos das áreas internas do órgão, bem como distribuição de possíveis áreas de alterações.

4.6 Estudo Morfométrico

O pulmão direito foi fixado com paraformaldeído a 4% e, após 24 horas, transferido para etanol a 70%.

Obtiveram-se cortes de tecido representando áreas periféricas dos pulmões, cortados com processamento para parafina. Foram obtidos cortes histológicos de 5 μm de espessura, que foram então corados com hematoxilina-eosina.

A contagem celular foi efetuada através de protocolo prévio que inclui dois outros profissionais isoladamente, sem envolvimento com o protocolo.

O pulmão esquerdo foi removido e inflado via traqueal com 5 mL de solução OCT (optimum cutting temperature). Cortes de cada pulmão foram cobertos por OCT (*Reichert-Jung, Heidelberg, Germany*) e resfriados em nitrogênio líquido. As secções foram obtidas com um criostato e coletadas em lâminas de vidro previamente revestidas de poli-L-lysina (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA*), fixadas em acetona-clorofórmio (*Merck, Rio de Janeiro, Brasil*) vol/vol por 10 minutos.

Após fixação, o tecido foi embebido em parafina e blocos de 4 μm de espessura foram cortados através de um micrótomo. Os cortes foram corados então com hematoxilina-eosina (HE) e analisados através de microscopia óptica (*Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Germany*). Utilizou-se a técnica de contagem com auxílio de um retículo (de 100 pontos e 50 retas de tamanhos conhecidos, com $10^4 \mu\text{m}^2$ de área total) sobre cada campo a ser estudado (Figura 9). Foram escolhidas para a análise morfométrica tres áreas de vias aéreas por pulmão, selecionadas randomicamente.

Com o auxílio desse retículo foram contadas, no aumento de 1000 X do microscópio, as células que infiltravam a parede da via aérea, entre epitélio brônquico e adventícia. Foram analisados dez campos por corte e o número de células positivas expresso em unidade de área.

4.7 Método Cianeto-Resistente para Peroxidase de Eosinófilo

Os fragmentos de pulmão, anteriormente recobertos com solução OCT e mantidos congelados em nitrogênio líquido, foram obtidos no criostato com espessura de 3 μm e colocados em lâminas de vidro previamente recobertas com poly-L-lisina, fixados em clorofórmio-acetona vol/vol. A seguir os fragmentos foram mantidos durante 10 minutos em contato com solução de Na_2PO_4 (60 mM) e KH_2PO_4 (70 mM) em pH 7,5, KCN, diamino-benzidina e H_2O_2 .

Os cortes foram posteriormente contra-corados com hematoxilina e eosina. Os eosinófilos positivos foram denominados EPO+. Este método é específico para a peroxidase de eosinófilos, não ocorrendo reação cruzada com a peroxidase de neutrófilos. Esta técnica já fora anteriormente descrita por outros autores (Zucker-Franklin & Grusky, 1976, Tibério et al., 2003, Tibério et al., 1997).

Com o auxílio de um retículo (com $10^4 \mu\text{m}^2$ de área total) foram contadas as células EPO+ que infiltravam a parede da via aérea, entre epitélio brônquico e a adventícia, contadas no aumento de 1000 X do

microcópio óptico (*Axioplan, Zeiss, Oberkochen, Germany*). Foram analisados 10 campos por corte, randomizados e não coincidentes, e o número de células positivas expresso por unidade de área.

A fração de área de células inflamatórias, estratificada por células polimorfonucleadas e mononucleadas, foi então determinada pela técnica de contagem de pontos, técnica esta bem descrita por outros autores (Tibério et al., 2003, Souza et al., 1998, Hoelz et al., 2001, Leick-Maldonado et al., 2004), sendo que o procedimento de análise morfométrica foi realizado por dois outros profissionais separadamente e não envolvidos com o protocolo.

De acordo com os princípios aconselhados por Weibel & Cruz-Orive (1997), a fração de área foi computada como:

PMN (células polimorfonucleadas) ou MN (células mononucleadas) da parede alveolar = $\text{PMN ou MN} / \text{pontos na parede alveolar} \times 100$.

FIGURA 9. Fotomicrografia de pulmão de animal de grupo FI, na coloração H&E num aumento de 1000 X e com auxílio do retículo, evidenciando bem os alvéolos com células mononucleadas – núcleos mais densos ao redor de alvéolos, e algumas hemáceas no interior de capilares

4.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do programa computadorizado SigmaStat (*Jandel Scientific, San Rafael, CA, EUA*). Os resultados foram obtidos e interpretados pela técnica de análise de variância de dois fatores (*Two Way ANOVA*).

Os resultados obtidos foram paramétricos e, portanto, expressos em média e erro padrão e a representação gráfica foi realizada na forma de barras paralelas. Para realizar as comparações múltiplas entre os grupos utilizou-se o teste de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo um $p < 0,05$ para todas as análises (Zar, 1984).

4.9 Reagentes

Os reagentes utilizados durante o experimento e sua procedência estão descritos abaixo:

- 1- Álcool Merck S.A. Ind. Químicas, Rio de Janeiro, Brasil;
- 2- Cloridrato de Fluoxetina (Daforin®): NOVAQUÍMICA, São Paulo, Brasil.
- 3- Eosina: Vetc, Rio de Janeiro, Brasil;
- 4- Hematoxilina: Qeel, São Paulo, Brasil;
- 5- Heparina: Roche Químicos e Farmacêuticos S.A., São Paulo, Brasil;

- 6- Paraformaldeído: Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri (MO), EUA.
- 7- Pentobarbital Sódico 3%: Cristalia Prod Químicos Farm. Ltda., São Paulo, Brasil;
- 8- Soro fisiológico 0,9%: Baxter Hospitalar, São Paulo, Brasil;

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Tempo de Natação

Durante o experimento o tempo de duração da natação aumentou progressivamente tanto para os animais do grupo Nat-FI quanto para os do grupo Nat-Sal, conforme pode-se observar na Figura 10.

Houve uma diferença significativa entre todos os períodos de tempo de natação (em segundos) com $T1 < T8 < T16 < T24 < T30$ nos animais do grupo Nat-FI (médias $\pm$ erro padrão: $276 \pm 36,18 < 464,11 \pm 36,18 < 584,44 \pm 36,18 < 712 \pm 36,18 < 825 \pm 36,18$ respectivamente, com $P < 0,001$).

Entretanto, notou-se diferença significativa entre os grupos Nat-Sal e Nat-FI somente no período de tempo T30 (Nat-Sal vs Nat-FI: $655,38 \pm 38,37$ e $825 \pm 36,18$ respectivamente, com $P = 0,002$).

* $P < 0,001$ para Nat-FI comparando-se os valores entre seus outros períodos de tempo

** $P = 0,002$ comparado com Nat-Sal em T30

FIGURA 10. Representa os valores (média $\pm$ erro padrão) das medidas de tempos de natação nos grupos Nat-Sal e Nat-FI. Houve diferenças significativas entre os diferentes períodos de dias de natação para os grupos Nat-FI com $T1 < T8 < T16 < T24 < T30$, $*P < 0,001$. Entretanto, o resultado durante os diferentes tratamentos foi somente significativo em T30 (Nat-Sal vs Nat-FI, $**P = 0,002$)

5.2 Mecânica Pulmonar

5.2.1 Elastância (Ers)

Como pode-se observar na Figura 11, houve um aumento significativo na elastância do sistema respiratório nas cobaias que receberam fluoxetina (grupos FI e Nat-FI: $4,2 \pm 0,44$ e $2,74 \pm 0,27$ cmH₂O mL⁻¹ respectivamente) se comparadas com as que não receberam (grupo Sal e Nat-Sal: $2,61 \pm 0,31$ e $1,57 \pm 0,44$ cmH₂O mL⁻¹, com $P=0,003$).

Houve ainda um aumento significativo nos valores da elastância entre todos os animais sob estresse (Nat-Sal e Nat-FI) e os demais grupos (Sal e FI), com $P=0,04$). Nota-se também que o efeito do tratamento com fluoxetina foi amplificado quando na presença do estresse (Nat-FI vs FI, com $P=0,02$).

* $P < 0,05$ para grupos tratados (Nat-FI e FI) comparados com não tratados (Sal e Nat-Sal)

** $P = 0,02$ entre FI e Nat-FI

FIGURA 11. Representa os valores (média $\pm$ erro padrão) das medidas de elastância (Ers) do sistema respiratório dos animais. Houve aumento significativo da elastância nas cobaias tratadas com fluoxetina (FI e Nat-FI) comparadas com as não tratadas (* $P < 0,05$). O efeito do tratamento com fluoxetina foi amplificado pela presença do método de estresse (Nat-FI vs FI: ** $P = 0,02$)

5.2.2 Resistência (Rrs)

Conforme mostra a Figura 12, houve diferença significativa nos valores de resistência do sistema respiratório nos animais do grupo Nat-Sal se comparados com as cobaias do grupo Sal ($P=0,03$):

Sal: $0,27 \pm 0,03$ cmH₂O.mL

FI: $0,26 \pm 0,03$ cmH₂O.mL

Nat-Sal: $0,18 \pm 0,05$ cmH₂O.mL

Nat-FI: $0,23 \pm 0,04$ cmH₂O.mL

FIGURA 12. Representa os valores (média $\pm$ erro padrão) das medidas da resistência (Rrs) do sistema respiratório dos animais. Não houve diferenças significativas entre os grupos concernentes à resistência do sistema respiratório nos quatro grupos

5.3 Concentrações de Óxido Nítrico Exalado (E_{NO})

Como mostra a Figura 13, houve um aumento significativo do E_{NO} nas cobaias tratadas com fluoxetina (FI e Nat-FI: $38,3 \pm 3,56$ e $46,92 \pm 4,50$ ppb respectivamente) se comparadas com as não tratadas (Sal e Nat-Sal: $19,59 \pm 3,56$ e $28,4 \pm 5,03$ ppb respectivamente, com $P < 0,001$).

Os grupos tratados com fluoxetina não mostraram na verdade diferenças significativas entre si, apresentando valores mais elevados do que os encontrados nos animais dos grupos Sal e Nat-Sal.

Não houve diferenças significativas entre as cobaias dos grupos sob estresse (Nat-Sal e Nat-FI) e as dos outros grupos (Sal e FI), com $P = 0,126$.

* $P < 0,001$ entre grupos tratados (FI e Nat-FI) e não tratados (Sal e Nat-Sal)

FIGURA 13. Representa os valores (média $\pm$ erro padrão) das medidas do óxido nítrico exalado (E_{NO}) nos animais. Houve um aumento significativo de E_{NO} entre todos os animais tratados com fluoxetina (FI e Nat-FI) comparados com os não tratados (Sal e Nat-Sal), com $*P < 0,001$ para todos os grupos

5.4 Aspectos Macroscópicos dos Pulmões

Cada pulmão de cobaia foi avaliado quanto aos aspectos macroscópicos, a saber:

- Enquanto peça cirúrgica inteira, medindo em média 3,5 x 2,0, 1,0 cm;
- Pulmões dos animais do grupo Sal apresentaram coloração rósea, com pleura translúcida (Figura 14);
- Por vezes apresentando áreas bem delimitadas de consolidação e de cor branco-amarelada nos pulmões dos animais dos grupos FI, Nat-FI e Nat-FI, medindo em média 0,5 a 1,0 cm no maior diâmetro, distribuídas pelos lobos superior e inferior, com perda local de translucidez da pleura;
- Aos cortes transversais, as secções pulmonares transversais evidenciaram áreas de consolidação de cor branco-amarelada distribuídas em regiões subpleurais, peribrônquicas e em “patchy” nos pulmões dos animais dos grupos FI, Nat-FI e Nat-FI, contrastando com a cor rósea do tecido normal (Figuras 14, 15, 16 e 17).

FIGURA 14. Fotografia mostrando aspecto macroscópico de pulmão de cobaia pertencente ao grupo Sal. Nota-se o padrão homogêneo de coloração rósea, com pleura translúcida em todo o tecido

FIGURA 15. Fotografias mostrando os aspectos macroscópicos de pulmão de cobaia pertencente ao grupo FI

A-Notam-se, de permeio ao tecido róseo normal do pulmão, áreas de cor esbranquiçadas com opacificação da pleura;

B-Cortes transversais do mesmo pulmão evidenciando a distribuição das áreas de cor branco-amareladas por todo o órgão

FIGURA 16. Fotografias da macroscopia de pulmão de cobaia pertencente ao grupo Nat-Fl. **A** e **B** mostram que as áreas de cor branco-amareladas são extensas por todo o parênquima pulmonar. Perda de translucidez da pleura sendo bem mais evidente em **A** do que o mostrado na Figura anterior

FIGURA 17. Fotografia da macroscopia de pulmão de cobaia pertencente ao grupo Nat-Sal. **A** e **B** mostram as áreas de cor branco-amareladas difusas, porém menos intensas do que no pulmão da Figura anterior

5.5 Estudos Morfométricos (Análise Quantitativa)

5.5.1 Células Mononucleadas (MN)

O número de células mononucleadas na parede alveolar das cobaias tratadas com fluoxetina (FI e Nat-FI) foram maiores do que os observados nos animais não tratados (Sal e Nat-Sal) com $P \leq 0,001$, a saber:

- ♦ FI: $32,06 \pm 3,0 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$
- ♦ Nat-FI: $65,18 \pm 4,22 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$
- ♦ Sal: $28,99 \pm 3,04 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$
- ♦ Nat-Sal: $43,2 \pm 3,98 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$

Houve também um aumento significativo desses valores nos animais dos grupos sob estresse (Nat-Sal e Nat-FI) se comparados com os animais dos grupos sem estresse (Sal e FI), com $P \leq 0,001$.

Constatou-se ainda que o efeito do tratamento com fluoxetina sobre o recrutamento de células mononucleadas foi amplificado pela presença do estresse: Nat-FI vs FI, com $P=0,03$.

Esses resultados podem ser melhor visualizados na Figura 18.

* $P \leq 0,001$ entre grupos tratados (FI e Nat-FI) e não tratados (Sal e Nat-Sal)

** $P \leq 0,001$ entre grupos sob estresse (Nat-FI e Nat-Sal) e não estressados (Sal e FI)

† $P = 0,03$ entre os animais tratados (FI vs Nat-FI)

FIGURA 18. Representa os valores (média $\pm$ erro padrão) do número de células mononucleadas (MN) presentes na parede alveolar dos animais. A figura mostra que os valores médios de células MN nos animais tratados com fluoxetina foram maiores do que os observados nos animais não tratados (* $P \leq 0,001$). Houve ainda um aumento significativo entre animais sob estresse (Nat-FI e Nat-Sal) comparados com os não submetidos a estresse (FI e Sal) [$P \leq 0,001$]. O efeito do tratamento com fluoxetina esteve amplificado pela presença do estresse (Nat-FI vs FI, † $P = 0,03$)

5.5.2 Células Polimorfonucleadas (PMN)

O número de células polimorfonucleadas na parede alveolar foi maior nos animais tratados com fluoxetina (FI e Nat-FI) do que nos não tratados (Sal e Nat-Sal), com $P \leq 0,001$, a saber:

- ♦ FI: $5,0 \pm 0,65 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$
- ♦ Nat-FI: $7,93 \pm 1,06 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$
- ♦ Sal: $0,01 \pm 1,18 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$
- ♦ Nat-Sal: $5,72 \pm 0,98 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$

Houve ainda um aumento significativo dos valores de PMN das cobaias sob estresse (Nat-Sal e Nat-FI) se comparadas às não submetidas à natação forçada (Sal e FI) com $P \leq 0,001$.

Verificou-se também que os animais do grupo Nat-FI mostraram valores maiores do que nos outros grupos com $P < 0,01$.

Esses resultados podem ser melhor visualizados na Figura 19.

* $P \leq 0,001$ para FI e Nat-FI, se comparados com Sal

** $P < 0,01$ entre Nat-FI e demais grupos

† $P \leq 0,001$ se comparados aos grupos não submetidos a estresse (Sal e FI)

FIGURA 19. Representa os valores (média $\pm$ erro padrão) do número de células polimorfonucleadas (PMN) presentes na parede alveolar dos animais. Os valores para os grupos FI e Nat-FI estiveram aumentados quando comparados com grupo Sal (* $P \leq 0,001$); valores maiores de PMN do grupo Nat-FI em relação aos demais grupos (** $P < 0,01$) e valores superiores de PMN entre os grupos submetidos a estresse (Nat-Sal e Nat-FI) e os demais (Sal e FI) com † $P \leq 0,001$

5.6 Estudo Histoquímico – EPO+ (peroxidase para eosinófilos)

O número de eosinófilos EPO+ na parede alveolar foi maior nos grupos sob estresse (Nat-Sal e Nat-FI) do que nos não estressados (Sal e FI), com $P=0,016$, a saber:

- ♦ Nat-Sal: $4,12 \pm 0,88 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$
- ♦ Nat-FI: $3,44 \pm 1,02 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$
- ♦ Sal: $0,012 \pm 0,79 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$
- ♦ FI: $2,75 \pm 0,62 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$

Não houve diferenças significativas entre os animais tratados (Nat-FI e FI) comparados com os animais não tratados (Sal e Nat-Sal), com $P=0,683$.

O tratamento com fluoxetina induziu um aumento significativo no número de eosinófilos EPO+ se comparados com os animais do grupo Sal (FI vs Sal e Nat-FI vs Sal), com $P<0,05$.

Os animais do Nat-Sal mostraram valores maiores de eosinófilos EPO+ se comparados com os animais que receberam somente salina (Nat-Sal vs Sal), com $P<0,05$.

Esses resultados podem ser melhor visualizados na Figura 20.

*P<0,05 entre FI / Nat-Sal / Nat-FI comparados com Sal

FIGURA 20. Representa os valores (média $\pm$ erro padrão) do número de eosinófilos EPO+ na parede alveolar dos animais. O tratamento com fluoxetina induziu um aumento significativo nessas células se comparados com os grupos que receberam salina (FI vs Sal e Nat-FI vs Sal, *P<0,05). O grupo Nat-Sal apresentou valores maiores de eosinófilos EPO+ se comparados com os animais que receberam somente salina (Nat-Sal vs Sal, *P<0,05)

5.7 Aspectos Microscópicos (Análise Qualitativa)

As fotomicrografias mostradas nas figuras a seguir (Figuras 21, 22, 23, 24 e 25) mostram a análise qualitativa do tecido pulmonar dos animais dos diferentes grupos do experimento, em aumentos variados nos quais puderam ser observados aspectos como:

- ♦ Histoarquitetura tecidual
- ♦ Distribuição dos diferentes tipos celulares
- ♦ Intensidade do infiltrado inflamatório

FIGURA 21. Fotomicrografia de tecido pulmonar de cobaia do grupo Sal na coloração H&E em aumento de 100 X, mostrando histoarquitetura do parênquima pulmonar preservada, com raras células linfocitárias nos espaços inter-alveolares

FIGURA 22. Fotomicrografias de tecido pulmonar de cobaia do grupo FI

- A-** H&E em aumento de 40 X mostrando distorção histoarquitetural do parênquima pulmonar; denso infiltrado inflamatório em regiões subpleurais, peri-brônquincas e com distribuição em “patchy”;
- B-** Detalhe no aumento de 400 X

FIGURA 23. Fotomicrografia de parênquima pulmonar de animal do grupo Nat-FI, na coloração H&E em aumento de 100 X. O infiltrado inflamatório no interstício é ainda mais denso e evidente do que nos animais do grupo FI; distorção da histoarquitetura tecidual

FIGURA 24. Fotomicrografia mostrando parênquima pulmonar de cobaia de grupo Nat-Sal em coloração H&E no aumento de 400 X. Presença de infiltrado inflamatório intersticial, sendo porém bem menos denso do que na Figura anterior e com histoarquitetura preservada.

Grupo Nat-FI – EPO+ 400 X

Grupo FI – EPO+ 1000 X

Grupo Nat-Sal – EPO+ 400 X

FIGURA 25. Fotomicrografias de tecido pulmonar corado pelo método histoquímico peroxidase específica para marcar eosinófilos (EPO+), evidenciando essas células em cor marrom nos diferentes aumentos e grupos:

A - grupo Nat-FI 400 X; **B** - grupo FI 1000 X e **C** - grupo Nat-Sal 400 X

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Nosso modelo experimental evidenciou alterações significativas no sistema respiratório, induzidas pelo uso contínuo do cloridrato de fluoxetina:

- Ocorreu um aumento da elastância do sistema respiratório nos animais sob uso da substância, sugerindo efeito de broncoconstricção de vias aéreas distais;
- Houve uma atenuação na resistência do sistema respiratório, gerando broncodilatação de vias aéreas proximais nos animais do grupo Nat-Sal comparativamente aos animais do grupo Sal. Este resultado sugere um efeito benéfico da atividade física regular proporcionada pelo método da natação forçada. Este efeito foi atenuado pelo tratamento com fluoxetina.
- Houve um nível elevado de óxido nítrico exalado nos animais sob uso da fluoxetina sugerindo alterações respiratórias de natureza inflamatória;
- Histopatologicamente ocorreu um maior recrutamento de células inflamatórias tipo mononucleadas pelo parênquima pulmonar induzido pela fluoxetina, levando a uma alveolite tipo crônica, droga-induzida nos animais do experimento.

Poucos efeitos adversos da fluoxetina têm sido descritos na literatura, de maneira eventual e isolada, geralmente na forma de relatos de casos clínicos esporádicos. Entre esses devem-se mencionar os danos ao sistema respiratório “associados” ao uso dessa substância na forma de doença intersticial tipo pneumonia de hipersensibilidade (Gonzalez-Rothi et al., 1995), fosfolipidose (Wold et al., 1986) – uma pneumonia intersticial descamativa, ou mesmo propiciando a progressão de metástases pulmonares (Freire-Garabal et al., 1998).

As doenças pulmonares intersticiais (DPI) representam um grupo pulmonar heterogêneo de afecções, e comumente apresentam quadros clínicos, radiológicos, histológicos e funcionais similares (Crystal et al., 1984, Katzenstein et al., 1985, King, 1993, Barbas-Filho et al., 2001). As alterações estruturais das DPI ocorrem exatamente no interstício pulmonar que atua como uma interface entre os ambientes externo e interno corporal. Portanto, este pode ser afetado tanto por via inalatória quanto por via hematogênica.

Embora existam características histopatológicas diferentes nesse tipo de doença, a sequência dos eventos patológicos é bem definida e estabelecida:

- a) primeiramente ocorre uma fase predominantemente inflamatória com infiltrado intersticial que cursa com reação epitelial alveolar;
- b) segue então uma segunda fase onde há depósito de colágeno no interstício;
- c) finalmente instala-se uma fase de remodelamento do parênquima colapsado (Katzenstein, 1985, King, 1993, Barbas Filho et al., 2001), que pode por sua vez levar à formação de tecido cicatricial.

Essa última fase ocorre muito tardiamente no processo de desenvolvimento das doenças pulmonares intersticiais, e quando há coexistência de regiões colapsadas e áreas císticas e dilatadas a lesão sugere o aspecto descrito como em “favos de mel” (Negri et al., 2000, Crystal et al., 1976, Turner-Warwick et al., 1980, Schwartz et al., 1994).

As principais causas conhecidas das doenças pulmonares intersticiais são:

- agressores ambientais (como oxidantes, partículas orgânicas e inorgânicas);
- radiação;
- drogas, como por exemplo a amiodarona (Costa-Jussa et al., 1984) e citostáticos;
- pneumonite crônica;
- alveolite de hipersensibilidade;
- linfangite carcinomatosa;
- fase residual fibroproliferativa de dano alveolar difuso (Quadro 1).

Quadro 1. Causas principais das doenças intersticiais pulmonares

Causas conhecidas

Agressores ambientais, como oxidantes e partículas orgânicas e inorgânicas

Radiação

Drogas, como amiodarona e citostáticos

Pneumonias crônicas

Fase fibroproliferativa residual do dano alveolar difuso

Alveolite de hipersensibilidade

Linfangite carcinomatosa

Causas desconhecidas

Fibrose associada às doenças do tecido conjuntivo

Fibrose pulmonar idiopática

Sarcoidose

Histiocitose de células de Langerhans

Linfangioleiomiomatose

Hemossiderose pulmonar idiopática

No nosso estudo, a fluoxetina pode representar uma causa importante para os resultados respiratórios e pulmonares obtidos nesse experimento.

Sabe-se que os pulmões têm importante função na metabolização e remoção de substâncias endógenas presentes na corrente sanguínea, tais como:

- aminas vasoativas;
- prostaglandinas;
- peptídeos vasoativos;
- entre outros.

Levando-se em conta esse fato, é digno de nota mencionar-se a possibilidade de toxicidade pulmonar e alterações da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar causadas por substâncias que contenham grupamento amino na sua estrutura – a fluoxetina por exemplo (Figura 4), com uma possível e consequente fosfolipidose ou toxicidade local (Kaya et al., 2000).

De acordo com Ortiz & Artigas (1992) a fluoxetina apresenta um efeito local nos pulmões agindo devido ao aumento do nível de serotonina sináptico e bloqueando sua recaptação pelas membranas celulares.

Estarriol et al. (2000) também relataram caso humano de doença pulmonar associada à fluoxetina, e deram ênfase ao fato dessa substância ser parcialmente metabolizada nos pulmões acumulando então serotonina localmente.

Suhara et al. (1998), estudando humanos que tomavam tricíclicos ou antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, utilizaram uma dose marcada por carbono dessas substâncias injetáveis e constataram que os pulmões podem funcionar como “reservatórios” dos antidepressivos,

com alta afinidade pelo transportador de serotonina. Em seu experimento, após uma hora 80% da fluoxetina marcada injetada era extraída da circulação sanguínea permanecendo no tecido pulmonar.

Um dos resultados mais expressivos do nosso experimento foram os valores aumentados do óxido nítrico exalado (E_{NO}) encontrados em todos os grupos exceto os controles. Tais níveis elevados sugerem uma presença de resposta inflamatória nas vias aéreas (e na parede alveolar), principalmente nos grupos submetidos à fluoxetina. Esta hipótese foi confirmada pela avaliação histopatológica realizada.

Agindo como marcador inflamatório, o óxido nítrico exalado traduz um possível e importante efeito adverso da fluoxetina quando presente, levando a uma resposta da parede alveolar e sugerindo injúria intersticial, como primeiramente suspeitamos.

O óxido nítrico (NO) é gerado tanto pela sintase de óxido nítrico constitutiva (eNOS e nNOS) quanto pela sintase induzível (iNOS). A expressão da sintase de óxido nítrico (NOS) foi detectada em diferentes células como as epiteliais (Kobzik et al., 1993, Asano et al., 1994), nervosas, de células musculares lisas (Patel et al., 1999), neutrófilos, eosinófilos (Maruo & Kayashima, 1999), e macrófagos (Bidri et al., 2001). Alguns desses autores sugerem que o óxido nítrico pode ainda ser produzido por aquelas células, além de estar envolvido no recrutamento das principais células inflamatórias presentes. Outras evidências novas têm mostrado que a óxido nítrico sintase neuronal pode ser regulada nas situações de injúria (Vizzard et al., 1995, Prado et al., 2003).

A avaliação de E_{NO} tem sido objeto de alguns estudos e pesquisas a cerca de seus efeitos e importância nas vias aéreas, como os recentes trabalhos experimentais envolvendo neuropeptídeos e fibras nervosas sensitivas na modulação da inflamação crônica de via aérea (Gatto et al., 2000, Leick-Maldonado et al., 2004).

O óxido nítrico exalado pode representar um marcador para esse tipo de injúria, e na qualidade de método não-invasivo pode ser muito útil na avaliação, monitoramento e acompanhamento de pacientes que estejam em uso fluoxetina; valores aumentados de E_{NO} podem ainda contra-indicar o uso dessa substância em pacientes com histórico prévio de doenças pulmonares.

Houve um aumento significativo da elastância do sistema respiratório nos animais que receberam fluoxetina, independentemente de terem sido submetidos ao método de estresse da natação forçada ou não. Isso sugere um efeito de broncoconstrição de vias aéreas distais bem como uma resposta do parênquima pulmonar de natureza inflamatória, causados pela fluoxetina.

Os resultados de nosso modelo experimental são, portanto, muito sugestivos de um efeito adverso da fluoxetina, mostrados pelos elementos de natureza inflamatória de vias aéreas.

Outros autores já haviam obtido resultados similares através de injúria pulmonar induzida por drogas, mostrando efeitos inflamatórios em modelos experimentais com animais, e que possibilitam inclusive análise do grau de inflamação (Faffe et al., 2000).

Gonzales et al (1995) relataram um caso humano de doença pulmonar causada por essa substância, com espécimes de biópsia revelando infiltrado linfocitário tipo “patchy” nos septos alveolares, além de neutrófilos e raros mastócitos. Como as células inflamatórias recrutadas eram predominantemente mononucleadas e menos polimorfonucleadas isso aponta para uma alveolite crônica, e não para uma injúria aguda. Os animais do nosso experimento mostraram os mesmos resultados, evidenciando a reprodução da alveolite humana, conforme mostrado nas Figuras 9, 22, 23 e 25.

O presente experimento demonstrou ainda que uma exposição contínua e constante ao estresse tipo Natação Forçada pode induzir a uma pneumonite intersticial e ter esse efeito amplificado quando na presença de tratamento com fluoxetina. Kuwahira et al. (2001) sugeriram possível mecanismo de redistribuição de fluxo pulmonar durante exercício físico onde haja hipóxia, dado este plausível e aplicável também aos animais de nosso experimento, ficando aqui entretanto apenas como simples conjectura pois nosso método não teve como objetivo a avaliação do referido mecanismo de redistribuição do fluxo pulmonar.

Considerações Finais e Perspectivas Futuras

Nossos achados experimentais, corroborados pelo poucos relatos presentes na literatura médica, são razões suficientes para a indicação de mensuração do óxido nítrico exalado e acompanhamento de pacientes sob tratamento com fluoxetina que apresentem tais características. Eles ainda

sugerem uma indicação criteriosa do uso de fluoxetina e/ou uma medicação específica apropriada quando na presença de estresse em cada caso.

Embora estejamos muito encorajados pelos resultados obtidos nesse estudo, outras investigações futuras são necessárias para se definir o mecanismo exato responsável pela injúria pulmonar. Nossos resultados também levantaram outra questão relevante: como os resultados obtidos comportar-se-iam num outro experimento que investigasse os animais por exemplo 60 ou 90 dias após o período de tratamento a que foram submetidos. Como a imensa maioria dos pacientes humanos submetidos a tratamento contínuo com fluoxetina jamais foram ou serão submetidos a uma biópsia pulmonar, fica sempre a possibilidade de serem também portadores das alterações mostradas sendo no entanto assintomáticos, ou então terem tais alterações mas que automaticamente desaparecem sem seqüelas com a simples suspensão da medicação.

Vale ainda lembrar que nosso experimento avaliou o uso da fluoxetina sob condições controladas, bem diferente portanto de seres humanos. Isso merece consideração especial uma vez que, embora sejam animais extremamente sensíveis e terem apresentado resultados histopatológicos e alterações funcionais tão importantes, ainda assim as cobaias sob medicação não apresentaram qualquer alteração que denotasse sinal clínico de doença- pelo contrário, aumentaram o tempo de natação durante o tratamento, obtendo ainda ganho de peso e de tônus muscular além de mostrarem-se ativas durante todo o tempo do experimento. Certamente não poder-se-ia dizer o mesmo se fosse um experimento em humanos que mostrassem as mesmas alterações funcionais e morfológicas.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- Os resultados de nosso modelo experimental demonstram um efeito adverso da fluoxetina sobre o sistema respiratório.
- O modelo sugere um efeito de broncoconstrição de vias aéreas distais bem como uma resposta do parênquima pulmonar de natureza inflamatória, causados pela fluoxetina nos animais do experimento.
- O tratamento contínuo com fluoxetina nos animais do experimento leva a alterações inflamatórias do parênquima pulmonar, reproduzindo o padrão humano de pneumonite de hipersensibilidade (alveolite alérgica extrínseca).
- O modelo experimental demonstrou ainda que uma exposição contínua e constante ao estresse tipo Natação Forçada pode induzir a uma pneumonia intersticial, e ter esse efeito amplificado quando na presença de tratamento com fluoxetina nos animais do estudo.
- Agindo como marcador inflamatório, a elevação dos níveis de óxido nítrico exalado traduz um possível e importante efeito adverso da fluoxetina quando presente, levando a uma resposta de natureza inflamatória da parede alveolar dos pulmões dos animais do estudo, sugerindo injúria intersticial.

- Os resultados obtidos pelo nosso estudo corroboram os poucos relatos presentes na literatura médica concernentes aos efeitos adversos da fluoxetina em humanos, aqui reproduzidos de maneira experimental.
- Tais resultados parecem ser razões suficientes para sugerir-se a indicação de mensuração do óxido nítrico exalado e acompanhamento e monitoração de pacientes humanos sob uso de fluoxetina, principalmente por tratar-se de método não-invasivo.
- O presente trabalho e seus resultados sugerem uma indicação criteriosa do uso de fluoxetina em pacientes humanos e/ou uma medicação específica apropriada quando na presença de estresse em cada caso.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Asano K, Chee CB, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1994;91(21):10089-10093.

Barbas Filho JV, Ferreira M, Sesso A, Kairalla RA, Carvalho CRR, Capelozzi VL. Evidence of type II pneumocytes apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fFibrosis (IPF) / Usual Interstitial Pneumonia (UIP). *J Clin Pathol*. 2001;54:132-138.

Belzung C, El Hage W, Moindrot N, Griebel G. Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. *Neuropharmacology* 2001; 41: 400-8.

Belzung C, Le Guisquet AM, Barreau S, Calatayud F. An investigation of the mechanisms responsible for acute fluoxetine-induced anxiogenic-like effects in mice. *Behav Pharmacol* 2001; 12: 151-62.

Bidri R, Crossetti FP, Steffen VM, Henriques AT. The antioxidant activity of standardized extract of Ginkgo biloba (EGb 761) in rats. *Phytother Res*. 2001;15:449-51.

Braun D, Nippert B, Loeuille D. Interstitial pneumopathy induced by fluoxetine. *Rev Med Interne*.1999;20:949-50.

Capelozzi M, Arantes FM, Paiva PSO, Capelozzi V, Martins MA. Spinal anesthesia increases pulmonary responsiveness to methacholine in guinea pigs. *Anesth Analg*. 1998;87:874-8.

Cohen S, Tyrrell DAJ, Smith AP. Psychological stress and susceptibility to common cold. *New England J. Med.*, 1991;pp. 325, 606.

Colby TV, Carrington CB. Interstitial lung disease. In:Thurlbeck WM, Churg AC, editors. *Pathology of the lung*. 2nd ed. New York: Thieme; 1995. p.589-737.

Contreras CM, Rodriguez-landa JF, Gutierrez-Garcia AG, Bernal-Morales B. The lowest effective dose of fluoxetine in the forced swimming test significantly affects the firing rate of lateral septal nucleus neurons in the rat. *J Psychopharmacol*. 2001;15:231-236.

Costa DA, Costa E. Disfunção sexual associada ao uso de antidepressivos. *Psiquiat Biol*; 4, 1996;431-3.

Costa-Jussa F, Corrin B, Javcobs J. Amiodarone lung toxicity: a human and experimental study. *J Pathol*. 1984;143:73-9.

Crystal RG, Fulmer J, Roberts W, Moss M, Line B, Reynolds HY. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical, radiographic, physiologic, scintigraphic, cytologic and biochemical aspects. *Ann Intern Med*. 1976;85:768-88.

Crystal RG, Bitterman PB, Rennard SI, Hance AJ, Keogh BA. Interstitial lung diseases of unknown cause: disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract (First Part). *N Engl J Med*. 1984;310:154-66.

Cuadra G, Zurita A, Gioino G, Molina V. Influence of different antidepressant drugs on the effect of chronic variable stress on restraint-induced dopamine release in frontal cortex. *Neuropsychopharmacol.* 2001; 25: 384-94.

Estarriol MR, Goday MR, Puig J. Enfermedad pulmonar asociada a la administración de fluoxetina. *Arch Bronchoneumol.* 2000;38:153.

Faffe DS, Seidl VR, Chagas PSC, Gonçalves de Moraes VL, Capelozzi VL, Rocco PRM, Zin WA. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. *Eur Respir J.* 2000;15:85-91.

Ferreira HHA, Bevilacqua E, Gaglioti SM, De Luca IMS, Zanardo RCO, Teixeira CE, Sannomiya P, Antunes E, De Nucci G. Nitric oxide modulates eosinophil infiltration in antigen-induced airway inflammation in rats. *Eur J Pharmacol.* 1998;358:253-8.

Ferris CF, Rasmussen MF, Messenger T, Koppel G. Vasopressin-dependent flank marking in golden hamsters is suppressed by drugs used in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *BMC Neurosci* 2001;2:10.

Foa EB, Kozak MJ, Goodman WK, Hollander E, Jenike MA, Rasmussen SA. DSM-IV field trial: Obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry.* 1995;152:654.

Freire-Garabal M, Nunez MJ, Pereiro D, Riveiro P, Losada C, Fernandez-Rial JC, Garcia-Iglesias E, Prizmic J, Mayan JM, Rey-Mendez M. Effects of fluoxetine on the development of lung metastases induced by operative stress in rats. *Life Sci.* 1998;63(2):PL31-PL38.

Gatto EM, Riobó NA, Carreras MC, Chernavsky A, Rubio A, Satz ML, Poderoso JJ. Overexpression of neutrophil neuronal nitric oxide synthase in Parkinson's disease. *Nitric Oxide*. 2000;4:534-9.

Goldenberg D, Mayskiy M, Mossey C, Ruthazer R, Schmid C. A randomized, double-blind crossover trial of fluoxetine and amitriptyline in the treatment of fibromyalgia. *Arthritis Rheum*. 1996;39:1852-9.

Gonzales-Rothi RJ, Zander DS, Ros PR. Fluoxetine hydrochloride (Prozac)-induced pulmonary disease. *Chest*. 1995;107:1763-5.

Griebel G, Cohen C, Perrault G, Sanger DJ. Behavioral effects of acute and chronic fluoxetine in Wistar-Kyoto rats. *Physiol Behav*. 1999;67:315-20.

Haynal A, Passos W, Archinard M. In: Medicina Psicossomática – Perspectivas Psicossociais; São Paulo, Brasil: Climespsi editores;1998; p.105-112.

Hoelz C, Negri E, Barbas CS, Saldiva PHN, Capelozzi V. Morphometric differences in pulmonary and extra-pulmonary ARDS: a preliminary study in autopsies. *Pathol Res Pract*. 2001;197:521-30.

Irey NS. Tissue reactions to drugs. *Am J Pathol*. 1976; 82:613-47.

Kaplan HI, Sadock BJ. Synopsis of psychiatry. 8th ed. Baltimore, USA: Williams & Wilkins; 1998. pp.1083-1092, 1100-9.

Katzenstein AL. Pathogenesis of "fibrosis" in interstitial pneumonia: an electron microscopic study. *Hum Pathol*. 1985 Oct;16 (10):1015-24.

Kaufman A. Contribuição ao ensino médico através do Psicodrama. Revista da Febrap; ano 6 no.1;1983. p.88-91.

Kaya GC, Durak H, Yemez B; Turhal Ü; Özdoğan Ö; Sayit E; Degirmenci B; Derebek E. Technetium-99m DTPA inhalation scintigraphy in patients treated with fluoxetine and maprotiline: preliminary results. *Eur J Nucl Med.* 2000;27:1402-4.

King TE, Jr. Idiopathic pulmonary fibrosis. In: Scwarz MI, King TE Jr, eds. Interstitial lung disease, 2nd edition. Chapter 15. St. Louis, USA: Mosby YearBook; 1993. p.367-404.

Kobzik L, Bredt DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, and Stamler JS. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;9:371-7.

Kuwahira I, Moue Y, Urano T, Kamiya U, Iwamoto T, Ishii M, Clancy RL, Gonzalez NC. Redistribution of pulmonary blood flow during hypoxic exercise. *Int J Sports Med.* 2001; 22:393-9.

Leick-Maldonado EA, Kay FU, Leonhardt MC, Prado CM, Fernandes FT, Martins MA, Tibério IFLC. Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatment in an experimental model of chronic airway inflammation in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy.* 2004;34:145-52.

Lino-de-Oliveira C, Sales AJ, Del Bel EA, Silverina MC, Guimarães FS. Effects of acute and chronic fluoxetine treatment on restraint stress-induced Fos expression. *Brain Res Bull.* 2001; 55: 747-54.

Martin WJ II. Drug-induced lung disease. In: Baughman RP, ed. Bronchoalveolar lavage. St. Louis, USA. Mosby Year Book; 1992: p.193-211.

Maruo KI, Kayashima T. Expression of neuronal nitric oxide synthase in dermal infiltrated eosinophils in eosinophilic pustular folliculitis. *Br J Dermatol*. 1999;140:417-420.

Mayorga AJ, Davi A, Page ME, Zimov-Levinson S, Hen R, Lucky I. Antidepressant-like behavioral effects in 5-hydroxytryptamine (1A) and 5-hydroxytryptamine (1B) receptor mutant mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 298:1101-7.

Mehta SC, Lilly M, Rollenhagen JE, Haley KJ, Asano K, Drazen JM. Acute and chronic effects of allergic airway inflammation on pulmonary nitric oxide production. *Am J Physiol*. 1997;272:L124-L31.

Mitchell SN, Greenslade RG, Cooper J. LY393558, a 5-hydroxytryptamine reuptake inhibitor and 5-HT(1B/1D) receptor antagonist: effects on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine in the guinea pig and rat. *Eur J Pharmacol*. 2001; Nov 30; 432 (1):19-27.

Montecinos GM, Nunez AO, Paulos AC, Martinez CA, Riesco SV, Cesped MM, Lamoza PK. Fluoxetina en el tratamiento de obesos no depresivos. *Bol Hosp. S.J. de Dios*. 1993.

Moreno JL. Psicodrama. 3ª edição; São Paulo, Brasil. Cultrix;1988; p.161.

Nardi AE, Valença AM, Nascimento I, Mezzasalma MA, Zin WA. Double-blind acute clonazepam vs. placebo in carbon dioxide-induced panic attacks. *Psychiatry Res*. 2000;94:179-184.

Negri EM, Montes GS, Saldiva PHN, Capelozzi V. Architectural remodelling in acute and chronic interstitial lung disease: fibrosis or fibroelastosis? *Histopathology* 2000;37:393-401.

Ohar JA, Jackson F, Dettenmeier PA, Bedrossian CW, Tricomi SM, Evans RG. Bronchoalveolar lavage cell count and differential are not reliable indicators of amiodarone-induced pneumonites. *Chest* 1992; 102:999-1004.

Ortiz J, Artigas F. Effects of monoamine uptake inhibitor on extracellular and platelet 5-hydroxytryptamine in rat blood: clomipramine and fluoxetine. *Br J Pharmacol.*1992;105:941-46.

Pacheco e Silva AC. Medicina Psicossomática. São Paulo, Brasil. Sarvier editores; 1976. p.105-110.

Patel HJ, Belvisi MG, Donnelly LE, Yacoub MH, Chung KF, and Mitchell JA. Constitutive expressions of type I NOS in human airway smooth muscle cells: evidence for an antiproliferative role. *FASEB.* 1999;13:1810-6.

Portela CP, Tibério IFLC, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Palermo-Neto J. Effects of diazepam and stress on lung inflammatory response in OVA sensitized rats. *Am J Physiol. (Lung Cell Mol Physiol)* 2002;282:L1289-L95.

Prado CM, Leick-Maldonado EA, Arata V, Kasahara DI, Fernandes FT, Martins MA, Tibério IFLC. Interaction between Nitric Oxide and Neurokinins in Modulation of Distal Airway Eosinophilic Inflammation: Differences in Inflammatory Cell Expression of nNOS and iNOS. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003a;167(Suppl7):A149.

Renard CE, Fiocco AJ, Clenet F, Hascoet M, Bourin M. Is dopamine implicated in the antidepressant-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test? *Psychopharmacology* 2001;159:42-50.

Rhodes JS, Hosack GR, Girard I, Kelley AE, Mitchel GS, Garland T Jr. Differential sensitivity to acute administration of cocaine and fluoxetine in mice

selectively bred or hyperactive wheel-running behavior. *Psychopharmacology (Berl)* 2001; 158:120-31.

Richardson JB. Nerve supply to the lungs. *Am Rev Resp Dis.* 1979;119:785-802.

Rosenbaum J. Antidepressant Treatment and the Biology of Depression. 154th Annual Meeting of the American Psychiatric Association Day 1 – May 5th;2001.

Rosenow EC, Myers JL, Swensen SJ, Pisani RJ. Drug-induced pulmonary disease: an update. *Chest* 1992; 102:239-50.

Rosenow EC. Drug-induced pulmonary disease. In: Murray J, Nadel JA. eds. Textbook of Respiratory Medicine. 2nd edition, Philadelphia, USA: W.B. Saunders CO;1994;pp.2117-2144.

Rupiniak NM, Carlson EJ, We JK, Harrison T, Porsolt RD, Roux S, De Felipe C, Hunt SP, Oates B, Wheeldon A. Comparison of the phenotype of NK1R-/- mice pharmacological blockade of the substance p (NK1) receptor in assays for antidepressant and anxiolytic drugs. *Behav Pharmacol.* 2001; 12: 497-508.

Saldiva PHNS, Mauad T, Capelozzi V, Dolhnikoff M, Bernardi FDC, Cury PM. In: Brasileiro Filho G editor. *Bogliolo PATOLOGIA*. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan; 2000. p.298-344.

Sanders-Jush E, Mayer SE. Inibidores específicos da recaptação da serotonina. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman-Gilman A. editores. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro, Brasil: McGraw-Hill; 2003. p.205-20.

Schwartz D, Helmers R, Galvin J. Determinants of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Resp Dis*.1994;149:450-4.

Singh VP, Jain NK, Kulkarni SK. On the antinociceptive effect of fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor. *Brain Res*. 2001;915:218-26.

Souêtre E, Martin P, Loset H, Monteban H. Qualidade de vida em pacientes deprimidos: comparação entre fluoxetina e antidepressivos tricíclicos maiores. *Intern Clin Psychopharmacol*. 1996;11:45-52.

Souza MB, Saldiva PHN, Pope III CA, Capelozzi VL. Respiratory changes due to chronic exposure to urban levels of air pollution: a histopathological study in humans. *Chest*. 1998;113:1-7.

Stokes PEMD. Fluoxetine: a five-year review. Payne Whitney Clinic, The New York Hospital, Cornell University Medical Center, New York. *Clin Therapeut*. 1993;15:2.

Suhara T; Sudo Y, Yoshida K, Okubo Y, Fukuda H, Obata T, Yoshikawa K, Suzuki K, Sasaki Y. Lung as reservoir for antidepressant in pharmacokinetic drug interactions. *Lancet*. 1998;351(9099):332-5.

Tibério IFLC, Leick-Maldonado EA, Miyahara L, Kasahara DI, Spilborghs GMGT, Martins MA. Effects of neurokinins on airway and alveolar eosinophil recruitment. *Exp Lung Res*. 2003;29:165-177.

Tibério IFLC, Turco GMG, Leick-Maldonado EA, Sakae RS, Paiva PSO, Warth MPTN, Lapa e Silva JR, Saldiva PHN, Martins MA. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:1739-47.

Travis WD, Colby TV, Koss MN, Rosado-de-Christenson ML, Müller NL, King Jr. TE. *Non-neoplastic disorders of the lower respiratory tract. atlas of nontumor pathology*. Washington, DC 2002; 1st series, fascicle 2. p. 321-50.

Turner-Warwick M, Burrows B, Johnson A. Cryptogenic fibrosing alveolitis: clinical features and their influence on survival. *Thorax*. 1980;35:171-80.

Vandezand LM, Lamblin C, Wallaert B. Interstitial pneumonia linked to fluoxetine. *Rev Mal Respir*. 1997;14:327-329.

Venault P, Rudrauf D, Lepicard EM, Berthoz A, Jouvent R, Chapouthier G. Balance control and posture in anxious mice improved by SSRI treatment. *Neuroreport*. 2001; 12:3091-4.

Vizzard MA, Erdman SL, De Groat WC. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase in dorsal root ganglion neurons after systemic capsaicin administration. *Neuroscience*. 1995;67:1-5.

Walsh BT. Fluoxetine Treatment of Bulimia Nervosa. *J Psychosomatic Res*. 1991;35(Suppl.1):33-40.

Weibel ER, Cruz-Orive LM. Morphometric Methods. In: Crystal RG, West JB editors. *The Lung*. Philadelphia, USA: Lippincott-Raven;1977. p.333-44.

Wold JS, Joost WJ, Griffing WJ. Phospholipid accumulation in rats produced by fluoxetine and chlorphentermine. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1976;37:118-9.

Zar J.H. Biostatistical analysis. Englewood Cliffs: Prentice-Hall. 1984. p.206-35.

Zitnik RJ, Cooper JA Jr. Drug-induced pulmonary disease. *Clin Chest Med*.1990; 11:139-50.

Zucker-Franklin D, Grusky G. The identification of eosinophil colonies in soft-agar cultures by differential staining peroxidase. *J Histochem. Cytochem*.1976.v24, p.1270-2.

APÊNDICE

APÊNDICE

Mon, 18 Oct 2004 11:50:35 -0400

Message-ID: <8140339.1098114635501.JavaMail.wladmin@mcv3-wl00.blue.knownspace>

Date: Mon, 18 Oct 2004 11:50:35 -0400 (EDT)

From: EditorialOffice@chestnet.org

To: marco_capeloizzi@uol.com.br

Subject: CHEST - Manuscript ID 04-0369

Errors-To: EditorialOffice@chestnet.org

Mime-Version: 1.0

Content-Type: text/plain

Content-Transfer-Encoding: 7bit

X-Errors-To: EditorialOffice@chestnet.org

18-Oct-2004

Dear Dr. Capeloizzi:

Your manuscript entitled "**FLUOXETINE TREATMENT EFFECTS ON EXHALED NITRIC OXIDE, PULMONARY MECHANICS AND LUNG'S HISTOPATOLOGICAL ARCHITECTURE IN GUINEA PIGS**" has been received online and is presently being given full consideration for **publication in CHEST**. Please note that our editorial office will review your manuscript before sending it to the Editor in Chief. If there are aspects that need to be fixed prior to peer review, they may unsubmit your paper and ask you to make some minor changes and resubmit it. We appreciate your understanding.

Your manuscript ID is 04-0369.

You may view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/chest> .

The journal strives to expedite the peer review process; however because we receive nearly 2,400 submission each year, the process may take up to 8 weeks to complete. Please be patient during this time and feel free to log in to check your manuscript status.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address, phone/fax, or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/chest> and edit your user information as appropriate.

Thank you for choosing to submit your manuscript to CHEST.

Sincerely,

CHEST Editorial Office