RAFAEL DE ALMEIDA DOS REIS

**Avaliação da resposta inflamatória pulmonar e
do transporte mucociliar em modelo de
inflamação alérgica pulmonar: modulação pelo
estresse induzido pela natação forçada**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

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

**São Paulo
2008**

Ficha catalográfica

Um leigo pensaria que, para criar, é preciso aguardar a inspiração. É um erro. Não que eu queira negar a importância da inspiração. Pelo contrário, considero-a uma força motriz, que encontramos em toda a atividade humana e que, portanto, não é apenas um monopólio dos artistas. Essa força, porém, só desabrocha quando algum esforço a põe em movimento, e esse esforço é o trabalho.

Igor Feodorovitch Stravinski

Dedicatória

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus, que me mostrou caminhos e abriu portas que só Ele poderia abrir. Meu maior desejo é continuar sob Sua proteção!

Aos meus pais, que me ensinaram a ter dignidade, personalidade e objetivos. Mostraram-me o valor dos estudos e me apoiaram em todas as minhas decisões na vida. Eu amo vocês... **MUITO OBRIGADO!**

Aos meus avós, por ajudarem na minha educação espiritual, intelectual e social. E ao meu irmão por me apoiar nos momentos difíceis. Sem esta **FAMÍLIA** unida me ajudando, não chegaria a lugar nenhum!

À Dra Iolanda Tibério, por me receber no laboratório, me ensinar o verdadeiro papel de um pesquisador e me orientar no sentido literal da palavra.

Agradecimentos

Pessoas muito importantes no desenvolvimento deste projeto:

Primeiramente agradeço às minhas amigas Fabi, Edna, Alessandra, Carla que me ajudaram a “carregar o piano” e me ensinaram muito neste período.

Ao *staff* do LIM-20 e 05: Rosana, Fernanda Arantes, Fernanda Lopes, Bia, Fran, Dolores, Rogério, Mariângela, Regiane, Eliane, Miriam, Tia Nilda, Tia Severina, Tia Leda, Davi, Reginaldo.

Ao pessoal do laboratório de Histologia e Histoquímica.

Aos meus companheiros alunos: Flavinha, Ricardo, Patrícia, Luciana, Claudia, Cris, Anna Cecília, Clarice, Rodolfo, Tati, Paolo, Deborah, Mabel, Vanessinha, Maurício, Juliana, Raquel, Pedro.

Aos Professores: Paulo Saldiva, Milton Arruda, Thais Mauad, Vera Capelozzi, Celso Carvalho, Adenir Perini, Lúcia Bueno, Patrô, Elnara Negri, Henrique Moriya.

Aos meus amigos: Gilson, Fritz, Beto, Rodolfo, Pimentel, Rodrigo, André, Cristiano, Mauro.

Ao meu amigo Jefferson que me ajudou a entrar no mundo da pesquisa.

À família Feix, especialmente ao meu padrinho Gilson, por me dar apoio de verdade nos momentos que eu mais precisei.

À Raquel, por entender meus momentos de desespero.

Aos animais de experimentação, que são os maiores heróis da ciência. Sem eles nada disto teria acontecido.

**Agradeço à Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
pelo apoio financeiro.
Bolsa Mestrado nº. 05-57910-2**

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação.

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 Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Sumário

1 Introdução.....	1
1.1 Transporte Mucociliar.....	2
1.1.2 Epitélio das Vias Aéreas.....	3
1.1.3 Cílios.....	4
1.1.4 Muco.....	5
1.1.5 Transporte Iônico.....	6
1.1.6 Acoplamento Mucociliar.....	7
1.1.7 Avaliação do Transporte Mucociliar.....	9
1.2 Asma Brônquica.....	11
1.2.1 Dados Epidemiológicos.....	12
1.2.2 Fisiopatologia da Asma Brônquica.....	13
1.2.3 Diagnóstico, Classificação e Tratamento.....	18
1.3 Estresse.....	22
1.3.1 Fisiopatologia do Estresse.....	23
1.3.2 Estresse e o Sistema Imunológico.....	27
1.4 Modelos Experimentais.....	29
2 Objetivos.....	33
3 Métodos.....	34
3.1 Grupos Experimentais.....	35
3.2 Protocolo de Inalação.....	36
3.3 Protocolo de Natação.....	37
3.4 Avaliação <i>in vivo</i> da Diferença de Potencial Transepitelial.....	39
3.5 Avaliação <i>ex vivo</i> da Velocidade do Transporte Mucociliar.....	40

3.6 Avaliação <i>ex vivo</i> da Frequência de Batimento Ciliar.....	41
3.7 Medida do Ângulo de Contato.....	43
3.8 Análise <i>in vitro</i> da Transportabilidade pela Tosse.....	44
3.9 Dosagem de cortisol sérico.....	46
3.10 Avaliação do Peso das adrenais.....	46
3.11 Estudo Morfométrico.....	47
3.12 Contagem de eosinófilos.....	47
3.13 Estudo Imunohistoquímico para detecção de IL13 em células inflamatórias e no epitélio brônquico.....	48
3.14 Avaliação das células inflamatórias IL13 positivas ao redor das vias aéreas.....	49
3.15 Análise das células epiteliais brônquicas IL13 positivas por Medida de Densidade Óptica.....	50
3.16 Avaliação da área de epitélio, muco ácido e muco neutro.....	51
3.17 Avaliação da Adrenal por Analisador de Imagem.....	52
3.18 Análise Estatística	53
4 Resultados.....	54
4.1 Tempo de Inalação e de Natação Forçada.....	55
4.2 Avaliação da Velocidade de Transporte Mucociliar.....	55
4.3 Avaliação da Frequência de Batimento Ciliar.....	56
4.4 Avaliação da Diferença de Potencial Transepitelial.....	56
4.5 Avaliação do Ângulo de Contato.....	57
4.6 Avaliação da Transportabilidade pela Tosse.....	57
4.7 Avaliação da Área de Epitélio Brônquico.....	58

4.8 Avaliação da Área de Muco Ácido.....	58
4.9 Avaliação da Área de Muco Neutro.....	59
4.10 Avaliação Morfométrica do Infiltrado Eosinofílico.....	59
4.11 Avaliação Morfométrica das Células Inflamatórias IL-13	
Positivas na Parede das Vias Aéreas.....	59
4.12 Avaliação Morfométrica da Área de IL-13	
Positiva no Epitélio Brônquico.....	60
4.13 Peso dos Animais.....	60
4.14 Peso das Adrenais.....	61
4.15 Área Total das Adrenais.....	61
4.16 Área da Zona Glomerulosa das Adrenais.....	62
4.17 Área da Zona Fasciculata das Adrenais.....	62
4.18 Área da Zona Reticularis das Adrenais.....	63
4.19 Área Medular das Adrenais.....	63
4.20 Quantificação do Cortisol Sérico.....	63
4.21 Fotomicrografias.....	84
5 Discussão.....	85
6. Conclusões.....	101
7. Referências Bibliográficas.....	104

Lista de Abreviaturas

AB	Azul Alciano
AC	Ângulo de Contato
ACTH	Hormônio Adrenocorticotropina
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
CRH	Hormônio Liberador de Corticotropina
DATASUS	Banco de Dados do Sistema Único de Saúde
DHEA	Dehidroepiandrosterona
ECRHS	European Community Respiratory Health Survey
Ers	Elastância do Sistema Respiratório
FBC	Frequência de Batimento Ciliar
GH	Hormônio de Crescimento
GINA	Global Initiative for Asthma
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
Hz	Hertz
ICAM	Molécula de Adesão Intracelular
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
Muc	Mucina
mV	Milivolts
NCAM	Molécula de Adesão Neuronal
NO	Óxido Nítrico
OVA	Animais sensibilizados
OVA-NAT	Animais sensibilizados submetidos ao estresse
PAC	Células Apresentadoras de Antígeno
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PD	Diferença de Potencial Transepitelial
PFE	Pico de Fluxo Expiratório
POMC	Pro-Opio-Melanocortina
Rrs	Resistência do Sistema Respiratório
SAL	Animais controle
SAL-NAT	Animais controle submetidos ao estresse
Th2	Linfócitos T auxiliares CD4
Ti	Tempo de Inalação
TNF	Fator de Necrose Tumoral

TT	Transportabilidade pela Tosse
VCAM	Molécula de Adesão Vascular
VEF1	Volume Expirado Forçado no Primeiro Segundo
VTM	Velocidade de Transporte Mucociliar

Lista de Figuras

- Figura 1. Classificação da gravidade da asma segundo o GINA 2007
- Figura 2. Níveis de controle no acompanhamento do paciente com asma
- Figura 3. Caixa de inalação acoplada ao inalador ultrassônico
- Figura 4. Caixa de natação
Linha de tempo constando os dias em que os animais foram submetidos à natação forçada e ao protocolo de sensibilização
- Figura 5. Voltímetro: mensuração da PD
- Figura 7. Equipamentos de mensuração da velocidade de transporte mucociliar.
- Figura 8. Equipamento de mensuração da frequência de batimento ciliar
- Figura 9. Aparelho de mensuração do ângulo de contato
- Figura 10. Aparelho simulador de tosse
- Figura 11. Imunohistoquímica para IL-13 e delimitação do epitélio das vias aéreas
Esquema mostrando o delineamento das diferentes zonas da glândula adrenal
- Figura 12. Gráfico do tempo de inalação
- Figura 13. Gráfico dos valores de velocidade de transporte mucociliar
- Figura 14. Gráfico dos valores de frequência de batimento ciliar
- Figura 15. Gráfico dos valores de diferença de potencial transepitelial
- Figura 16. Gráfico dos valores do ângulo de contato
- Figura 17. Gráfico dos valores da transportabilidade pela tosse
- Figura 18. Gráfico dos valores de área de epitélio brônquico
- Figura 19. Gráfico dos valores de área de muco ácido
- Figura 20. Gráfico dos valores de número de eosinófilos na via aérea
- Figura 21. Gráfico do número de células positivas para IL-13 na parede das vias aéreas
- Figura 22. Gráfico da área positiva para IL-13 no epitélio das vias aéreas
- Figura 23. Gráfico do peso dos animais
- Figura 24. Gráfico do peso das adrenais
- Figura 25. Gráfico dos valores de área total das adrenais
- Figura 26. Gráfico dos valores da zona glomerulosa da glândula adrenal
- Figura 27. Gráfico dos valores de zona fasciculata das adrenais
- Figura 28. Gráfico dos valores da zona reticularis das glândulas adrenais
- Figura 29. Gráfico dos valores da área medular das glândulas adrenais
- Figura 30. Gráfico dos valores de cortisol sérico
- Figura 31.

REIS RA. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR E DO TRANSPORTE MUCOCILIAR EM MODELO DE INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR: MODULAÇÃO PELO ESTRESSE INDUZIDO PELA NATAÇÃO FORÇADA. .[dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina , Universidade de São Paulo;2008. 121 p.

Introdução: Há crescentes evidências que sinalizam o papel do estresse crônico como desencadeante e mesmo perpetuador de crises asmáticas, bem como a importância da produção de muco e do transporte mucociliar na fisiopatologia da asma brônquica. **Objetivos:** Deste modo, consideramos relevante avaliar em cobaias com inflamação alérgica crônica pulmonar como o estresse físico repetido, induzido pela natação forçada, modula as respostas de transporte mucociliar, as propriedades do muco, o infiltrado eosinofílico e a expressão de IL-13 no epitélio e nas células inflamatórias na parede das vias aéreas. **Métodos:** Os animais receberam inalações duas vezes por semana durante quatro semanas com doses crescentes de ovoalbumina (grupo OVA e OVA-NAT) ou solução fisiológica (grupo SAL e SAL-NAT). Após 24 horas da quarta inalação os animais dos grupos denominados SAL-NAT e OVA-NAT foram submetidos ao protocolo de natação forçada por dez dias com intervalo de dois dias, para a indução do estresse. Após 72 horas da última inalação, os animais foram anestesiados, sendo testadas: a velocidade de transporte mucociliar (VTM), a frequência de batimento ciliar (FBC), e a diferença de potencial transepitelial (PD). Após estas medidas foram coletadas amostras de muco para avaliação do ângulo de contato (AC) e da transportabilidade pela tosse (TT). Foi coletada uma amostra de sangue para a dosagem de cortisol sérico. Os pulmões foram retirados, fixados e submetidos à coloração de LUNA, para identificação de eosinófilos, e à técnica imunohistoquímica para detecção da expressão de IL-13 no epitélio brônquico e nas células inflamatórias presentes na parede das vias aéreas. As adrenais também foram retiradas, imediatamente pesadas e submetidas à coloração de hematoxilina e eosina para avaliação histopatológica, utilizando a morfometria para determinação das áreas de cada uma de suas camadas. **Resultados:** Os

animais do grupo OVA apresentaram uma redução da VTM, do PD, da TT e aumento do AC, da área de epitélio de vias aéreas, de muco ácido, do número de eosinófilos e da expressão de IL-13, no epitélio brônquico e nas células inflamatórias presentes ao redor das vias aéreas, comparativamente aos controles ($p < 0,05$ para todas as comparações). Houve redução da área total da adrenal e de cada uma de suas camadas comparativamente aos controles ($p < 0,05$ para todas as comparações). Os animais submetidos ao protocolo de estresse (grupos SAL-NAT e OVA-NAT) apresentaram aumento nos níveis de cortisol sérico ($p < 0,05$), no peso das adrenais comparativamente aos grupos e OVA ($p < 0,05$). Os animais submetidos ao protocolo de estresse e expostos à ovoalbumina (grupo OVA-NAT) mostraram redução na VTM, aumento no AC, na área de muco ácido do epitélio brônquico e em todas as camadas das adrenais, comparativamente aos resultados obtidos nos animais do grupo OVA ($p < 0,05$ para todas as comparações). **Conclusão:** O processo inflamatório crônico pulmonar altera o transporte mucociliar e as propriedades reológicas do muco, o que se associou ao recrutamento eosinofílico, aumento da expressão de IL-13 no epitélio brônquico e nas células inflamatórias presentes na parede brônquica. Além disto, observamos a redução de todas as camadas da adrenal. Neste modelo experimental, o estresse físico repetido reduz o transporte mucociliar devido a alterações das propriedades do muco, particularmente potencializando o aumento de muco ácido e de sua hidrofobicidade e adesividade. Estes efeitos parecem estar relacionados à ativação adrenal, mas independentes do recrutamento eosinofílico e da resposta Th2 mediada pela IL-13.

Descritores: 1. Estresse; 2. Modelos Animais; 3. Asma; 4. Transporte Mucociliar; 5. Interleucina 13; 6. Eosinófilos.

SUMMARY

REIS RA. EVALUATION OF PULMONARY INFLAMMATORY RESPONSES AND MUCOCILIARY TRANSPORT IN A MODEL OF CHRONIC ALLERGIC INFLAMMATION: MODULATION BY STRESS INDUCED BY FORCED SWIMMING . [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”;2008. 121 p.

Background: It has increasing evidence linking the role of stress in the onset of asthma exacerbation and in the maintenance of asthmatic crises, as well as the importance of mucus production and the mucociliary clearance in the asthma physiopathology. **Objectives:** So, we consider relevant to evaluate in guinea pigs with pulmonary chronic allergic inflammation how the induced repeated physical stress, caused by forced swimming, modulates the mucociliary clearance, the mucus properties, the eosinophilic infiltration and the IL-13 expression on bronchial epithelial cells in the airway wall. **Methods:** The animals had received inhalations two times per week during four weeks with increasing doses of ovalbumin (OVA and OVA-S groups) or saline solution (SAL and SAL-S groups). After twenty four hours of the 4th inhalation, the animals (named as SAL-S and OVA-S groups) had been submitted to the protocol of forced swimming, per ten days with an interval of two days, for the stress induction. After 72 hours of the last inhalation, the animals were anaesthetized and the tracheal mucus clearance (TMC), the ciliary beat frequency (CBF), and the difference of transepithelial potential difference (PD) were measured. After these measurements had been done mucus samples were collected for evaluation of the contact angle (CA) and cough transportability (CT). To serum cortisol dosage a little amount of blood was collected. The lungs were dissected, fixed and submitted to histological techniques, like LUNA stain for identification of eosinophils and the IL-13 immunohistochemistry technique for its detection in the bronchial epithelium and in the inflammatory cells present in the airways walls. The adrenal glands were excised, immediately weighed and submitted to haematoxylin and eosin stain for histopathological evaluation using the morphometry to determine the areas of each of their layers. **Results:** The animals of OVA

group presented a reduction of the TMC, the PD, and the CT. On the other hand they presented an increase of the CA, of the airways epithelial area, of the acid mucus, of the eosinophils number as well as on the IL-13 expression in the airways epithelium and on the inflammatory cells around the airways, compared to the controls ($p < 0.05$ for all comparisons). There was a reduction of the adrenal gland total area and on each one of its layers compared to the controls ($p < 0.05$ for all comparisons). The animals submitted to the forced swim stress protocol (SAL-S and OVA-S groups) showed an increase on serum cortisol levels, on adrenal gland weight compared to OVA group ($p < 0.05$). The animals submitted to the forced swim stress protocol and to the sensitization protocol with ovalbumin (OVA-S) showed a reduction in the TMC and an increase on the CA, bronchial epithelial acid mucus area and in all adrenal gland layers compared to the results obtained in the OVA group animals ($p < 0.05$ for all comparisons). **Conclusions:** The chronic inflammatory pulmonary process alters the mucociliary transport and mucus rheological properties which was associated to eosinophilic recruitment, increases in the IL-13 expression on bronchial epithelial cells and inflammatory cells in airway walls. In addition, we observed a reduction in all adrenal zones. In this experimental model the repeated physical stress reduces the mucociliary clearance due to the mucus rheological properties alterations, particularly increasing the amount of acid mucus and its wettability and adhesivity. These effects seem to be related to the adrenal activation but independently of the eosinophilic recruitment and of Th2 responses mediated by IL-13.

Key Words: 1. Stress; 2. Animal Models; 3. Asthma; 4. Mucociliary Clearance; 5. Interleukin-13; 6. Eosinophils

1

INTRODUÇÃO

1.1 Transporte Mucociliar

O sistema respiratório está constantemente em contato com agentes potencialmente agressores, tais como partículas orgânicas, organismos vivos e mortos, vapores e fumaça. Estes são trazidos do meio externo juntamente com o ar inspirado. Para desempenhar suas funções o sistema respiratório conta com uma série de mecanismos imunológicos ou não, que o defendem de agressões do meio ambiente tais como: reações inflamatórias, respostas imunológicas, transporte eletrolítico transepitelial, regulação neurogênica, secreções anti-infecciosas e transporte mucociliar (Saldiva, 1990).

O transporte mucociliar do trato respiratório atua como o mecanismo de defesa primário, principalmente no combate a agentes infecciosos e partículas, fazendo com que estes não entrem em contato direto com o epitélio evitando a resposta inflamatória. O aparelho mucociliar consiste no acoplamento de um componente viscoelástico, o muco respiratório e o epitélio ciliado. Este acoplamento resulta na capacidade de promover um fluxo de fluido em direção a orofaringe para uma seguinte expectoração ou deglutição (Knowles e Boucher, 2002).

1.1.2 Epitélio das Vias Aéreas

O epitélio das vias aéreas é pseudoestratificado ciliado, e as células comprometidas com o transporte mucociliar, podem ser divididas de acordo com a sua função em secretoras e ciliadas. Ao longo de sua extensão a composição do epitélio vai se adaptando para atender a funcionalidade da região (Jeffery e Li, 1997).

As células secretoras estão localizadas tanto nas glândulas submucosas dos brônquios (células mucosas e serosas), assim como no epitélio das vias aéreas (células mucosas, serosas e de clara). Estas células possuem numerosos grânulos de secreção, complexo de golgi e retículo endoplasmático bastante desenvolvidos, além de apresentar microvilosidades no ápice celular. O número de células serosas e mucosas tende a diminuir em direção a periferia pulmonar, ao contrário das células de Clara que tendem a aumentar seu número em direção do parênquima pulmonar (Williams *et al.*, 2006).

As células ciliadas possuem forma colunar, interligando-se com as células adjacentes por meio de junções do tipo “*tight-junctions*”, apresentam numerosas mitocôndrias concentradas no ápice da célula próximas aos corpúsculos basais e núcleo no pólo inferior da célula. Na traquéia de humanos as células ciliadas possuem cerca de 200 a 250 cílios/célula, os quais medem cerca de 0,25 micrômetros de espessura (Sturgess *et al.*,

1980). O número de cílios por célula decresce à medida que se aproximam as vias aéreas distais.

1.1.3 Cílios

Os cílios são prolongamentos citoplasmáticos com estrutura bem definida no qual o motor é um axonema de tubulina. O axonema de um cílio consiste em nove pares de microtúbulos periféricos ao redor de um par central. Estes microtúbulos são constituídos primariamente de heterodímeros de α e β tubulina e dineína e mais outras duzentas proteínas que se associam com uma variedade de ligações radiais e circunferenciais, possibilitando o controle dos movimentos ciliares. Os nove pares de microtúbulos consistem de uma subfibra A completa com 13 protofilamentos de tubulina, e uma subfibra B, com cerca de 10-11 protofilamentos de tubulina. Ao longo da subfibra A existem duas colunas de braços proteicos constituídos de dineína, que representa o motor para o batimento ciliar (Sleigh, 1983; Chilvers *et. al.*, 2003).

1.1.4 Muco

O muco respiratório é uma mistura complexa de diferentes secreções que formam um polímero hidrofílico com propriedades visco-elásticas. Apresenta aproximadamente 95% de água, onde estão dissolvidos eletrólitos tais como: Na^+ , que é o principal constituinte, K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} . (Braga e Alegria, 1988).

A principal componente do muco é uma glicoproteína de grande peso molecular denominada mucina que é secretada pelas células mucosas. Apesar da mucina ser predominante no muco, outras substâncias estão presentes em quantidades significantes tais como: proteoglicanos, lipídeos, substâncias anti-oxidantes, proteases e antiproteases, tampões, imunoglobulinas (IgA secretora, IgG, IgM). Existem também enzimas capazes de interagir com microorganismos como a lisozima, a lactoferrina, algumas peroxidases e antileucoproteases (Thornton e Sheehan, 2004).

O muco que reveste as vias aéreas é composto por duas fases: uma epifase gel, mais viscosa, descontínua, secretada pelas glândulas mucosas e uma hipofase sol, periciliar, de menor viscosidade, contínua desde a traquéia até os bronquíolos, produzida pelas células serosas e células de Clara do epitélio (Trindade *et al.*, 2007).

1.1.5 Transporte iônico

A regulação do fluido periciliar, e provavelmente da hidratação do muco, depende das células epiteliais que possuem a capacidade de secretar e absorver o líquido, utilizando a energia celular para movimentações iônicas contra um gradiente eletroquímico. As células epiteliais são polarizadas funcional e anatomicamente, possuem uma membrana em contato com a luz brônquica e outra membrana baso-lateral que mantém contato com o espaço intersticial e vasos sangüíneos (Molitoris e Nelson, 1990). As células são alinhadas e separadas por um espaço intercelular. Este espaço é estreitado junto ao ápice, por junções firmes denominadas “*tight-junctions*”, que determinam uma difusão seletiva do espaço intercelular. O transporte de solutos através do epitélio causa uma alteração na concentração iônica transepitelial e uma diferença na pressão osmótica através do epitélio. Uma vez criado um gradiente osmótico, a água se movimentará da solução com menor concentração para a maior concentração de solutos (Leal *et al.*, 2006).

O transporte iônico através do epitélio respiratório se dá por dois mecanismos básicos: um que determina a capacidade de absorção de líquidos, e outro que determina a capacidade de secreção de líquidos.

A absorção de líquidos ocorre através de um canal específico na membrana apical, que facilita a entrada de sódio a favor do gradiente eletroquímico. Dentro da célula, o sódio sairá pela membrana baso-lateral através da

bomba de sódio e potássio. A passagem do sódio provoca um desequilíbrio de cargas, gerando energia para a passagem passiva de cloro.

A secreção de líquidos se dá através de um mecanismo de co-transporte, que ao colocar na membrana baso-lateral sódio a favor de um gradiente eletroquímico, acopla a entrada de potássio e cloro. O sódio e o potássio saem novamente pelo mesmo pólo por meio da bomba de sódio e potássio e por um canal específico para o potássio. Por outro lado, o cloro sai pela membrana apical por meio de um canal específico de cloro (Knowles *et al.*, 1982).

1.1.6 Acoplamento Mucociliar

A camada de muco que reveste as vias aéreas possui uma espessura de dois a cinco micrômetros. Esta camada de muco do epitélio respiratório serve para conduzir as partículas nocivas que são inaladas, e devem possuir características reológicas adequadas para melhor aproveitamento da energia cinética fornecida pelo batimento ciliar. Além disso, possui também importante atividade antimicrobiana e neutralizadora de agentes químicos nocivos (Saldiva, 1990).

Existem três mecanismos por meio dos quais ocorre a deposição de partículas inaladas com o ar na camada de muco. A impactação inercial, onde as partículas chocam-se de encontro às paredes, principalmente nas

regiões de bifurcação. A sedimentação gravitacional, faz com que partículas entre 0,5 e 5 μm (incluindo a maioria dos patógenos) sejam sedimentadas por ação da gravidade à medida que o fluxo cai. E por fim, a difusão, onde por meio de movimento browniano, as partículas se deslocam ao acaso, até que se choquem com a parede das vias aéreas (Trindade *et al.*, 2007).

O aparelho mucociliar é responsável pela depuração das partículas inaladas que se depositam na camada de muco que recobre a superfície epitelial. A eficiência mecânica deste sistema de transporte depende, portanto, da integridade e do movimento coordenado dos cílios e das propriedades físicas do muco (Puchelle *et al.*, 1980) e da interação entre cílio e muco.

O mecanismo de transporte pode ser comparado ao de uma esteira rolante. O motor do sistema é dado pelos cílios que batem continuamente, propiciando energia para o deslocamento da camada do muco. O batimento ciliar acontece quando o topo do cílio bata na fase gel (mais viscosa), na ida, impondo a progressão em direção mais proximal, e na volta, o cílio retorna pela fase sol (mais fluída) para diminuir o gasto energético. O muco assim é levado em direção à orofaringe para ser expectorado ou deglutido (Saldiva, 1990).

1.1.7 Avaliação de Transporte Mucociliar

O muco respiratório é um fluido não-newtoniano, e suas propriedades reológicas dependem da quantidade de glicoproteínas e de água. A característica reológica e a quantidade de muco presente nas vias aéreas são fatores determinantes para um bom funcionamento do sistema mucociliar das vias aéreas. Existem algumas formas de estudar a reologia do muco e a sua transportabilidade (King, 1998).

O microreômetro magnético é um instrumento usado para medir a magnitude da viscosidade e da elasticidade de pequenas quantidades de muco. Uma pequena esfera de aço é inserida em uma amostra de muco e oscilada por um campo magnético. A amplitude da oscilação e a corrente do magneto são utilizadas para se determinar a viscosidade e a elasticidade em diferentes frequências (Lorenzi, 1992). Outro instrumento para avaliar a viscosidade do muco é o viscosímetro *cone and plate*. A amostra é colocada entre o cone e a placa, e o equipamento gera um torque de força e velocidade conhecida. A viscosidade aparente do fluido é então calculada pela razão da força de cisalhamento (τ) com a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) aplicada. O aparelho converte os dados em unidades centipoise absolutas (mPa.s).

Para avaliar a hidrofobicidade, que é a capacidade do muco de se espalhar em uma superfície plana, o instrumento utilizado é o ângulo de contato. Para esta avaliação o ângulo que o muco faz em relação à superfície é medido,

em uma temperatura ideal. Para avaliar a adesividade, que é a capacidade do muco respiratório em se ligar a uma superfície sólida, é utilizada a máquina de tosse. Esta consiste em um fluxo de ar conhecido aplicado a uma amostra de muco, e a distância do deslocamento do muco é medida (Macchione *et al.*, 1995).

A mensuração do diferencial de potencial transepitelial se refere à integridade do epitélio do trato respiratório, e da quantidade de água presente nas propriedades do muco. As interações entre o muco e os cílios podem ser avaliadas usando a velocidade de transporte mucociliar. Esta velocidade pode ser medida *in vivo* usando aerossóis de partículas radioativas marcadas. Para a realização da medida *in vitro* pode-se usar o palato de rã, que é parecido com o epitélio das vias aéreas humanas (King, 1989).

Na prática clínica há pouca preocupação com a presença de muco quando se acompanha um paciente portador de asma, pois normalmente o asmático expectora pouco muco (Williams *et al.*, 2006). Porém, a produção excessiva de muco é uma importante causa de morbidade e de mortalidade na asma, visto que a presença de tampões de muco é um achado freqüente em autópsias de pacientes asmáticos (Dunnill, 1960). Mesmo em pacientes com asma persistente leve e persistente moderada, é encontrado um aumento no número de células produtoras de muco na superfície do epitélio (Ordoñez *et al.*, 2001).

1.2 Asma Brônquica

Um dos primeiros relatos da asma foi feito por Wiliam Osler. No século XIX, ele notou a presença de edema da mucosa e a presença de uma bronquiolite exudativa e denominou estes sinais de “Asthma Nervosa”. Antes da descoberta de seu componente inflamatório no século XX, a asma era considerada uma doença psicogênica (Wright, 2005).

Mais recentemente, a Iniciativa Global para Asma (Global Initiative for Asthma, GINA 2007) definiu a asma como:

“Uma doença crônica inflamatória de vias aéreas onde diversas células e elementos celulares desempenham um importante papel. A inflamação crônica causa aumento da hiperresponsividade que tem como consequência episódios recorrentes de sibilos, dispnéia, tiragem intercostal e tosse, particularmente à noite e pela manhã. Esses episódios estão normalmente associados à obstrução variável ao fluxo que é normalmente reversível espontaneamente ou com tratamento”

As causas da asma são divididas entre genéticas e ambientais, porém ocorre uma grande e complexa interação entre elas. Porém estas causas e interações não estão completamente elucidadas. Algumas das causas genéticas são: pré-disposição a atopia, pré-disposição a hiperresponsividade de vias aéreas, sexo e obesidade. Os desencadeantes ambientais são:

alérgenos (poeira, animais domésticos, pólen, fungos, perfumes, etc.), infecções, exposições ocupacionais, fumaça de cigarro, poluição do ar, dieta, etc.

1.2.1 Dados Epidemiológicos

A asma é reconhecida mundialmente como um problema de saúde pública, pois se estima afetar 300 milhões de indivíduos e levar a óbito 250 mil pessoas por ano (GINA, 2007). A prevalência da asma foi adequadamente quantificada após a padronização de estudos colaborativos no início da década de 90 tais como: o *International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)* para crianças e adolescentes, e o *European Community Respiratory Health Survey (ECRHS)* para adultos. Estes estudos demonstraram que a prevalência de asma varia em 18% de acordo com o país, e a prevalência não correlaciona muito bem com a mortalidade.

Estudos demonstraram que, durante triênios, não houve aumento da mortalidade por asma brônquica no município de São Paulo, considerando a asma apenas como causa básica da morte (Rio *et al.*, 2002). Cabe ressaltar que a taxa de mortalidade por asma no Brasil é 2,7 vezes menor que nos Estados Unidos e em outros países (Rio *et al.*, 2003). Recentemente foi demonstrada a alta prevalência de asma e sintomas em escolares na faixa etária de 13 e 14 anos de idade, sendo o predomínio de alguns dos sintomas

avaliados em crianças do sexo feminino e relacionados ao contato com animais domésticos e/ou a um histórico familiar de asma (Maia *et al.*, 2004).

Em 2007, foram internados aproximadamente 273 mil pessoas, sendo 44% na região nordeste, 23% na região sudeste, 16% na região sul, 9% na região norte e 8% na região centro-oeste. Em 2005, faleceram 2603 indivíduos em decorrência de crises asmáticas, sendo 41% na região sudeste, 33% na região nordeste, 15% na região sul, 6% na região centro-oeste e 5% na região norte.

Fonte: DATASUS.

1.2.2 Fisiopatologia da Asma Brônquica

O quadro asmático aparentemente se inicia com a sensibilização, isto é o contato de um antígeno com uma célula apresentadora do mesmo (PAC), que, no pulmão, pode ser representado por células dendríticas, o macrófago e mesmo o epitélio das vias aéreas. A interação destas células com os linfócitos T auxiliares faz com que os linfócitos B produzam imunoglobulinas E (IgE). Estes anticorpos, quando liberados na corrente sanguínea, se ligam a receptores de alta afinidade presentes nos mastócitos. Estudos epidemiológicos evidenciaram uma grande correlação entre os níveis de anticorpos da classe IgE e a gravidade da asma (Burrows *et al.*, 1989; Varner e Lemanske, 2000).

Após este processo inicial, nas próximas exposições do indivíduo ao antígeno, a grande maioria dos asmáticos desenvolve uma resposta imediata e outra tardia. A resposta imediata é caracterizada pela obstrução do fluxo aéreo e começa em poucos minutos após o contato com o antígeno. O pico desta resposta ocorre, aproximadamente, em 10 a 20 minutos e termina entre 1 e 2 horas. Esta obstrução ocorre devido à desgranulação dos mastócitos que junto com os macrófagos e os linfócitos T, liberam mediadores inflamatórios como a histamina, as prostaglandinas e os cisteinil-leucotrienos, que induzem à broncoconstrição aguda por contração da musculatura lisa das vias aéreas. Os grânulos liberados dos mastócitos podem ainda causar várias alterações como agressão epitelial, anormalidades no controle do tônus da via aérea, hipersecreção de muco e aumento da responsividade do músculo liso das vias aéreas (Holgate, 2007).

A resposta tardia se inicia após 3 a 6 horas após o contato com o antígeno e pode durar por vários dias após este contato. Esta resposta é caracterizada pelo processo inflamatório eosinofílico com presença de linfócitos TCD4+ decorrente de uma grande migração celular para as vias aéreas, além da vasodilatação e contração da musculatura lisa peribrônquica. A inflamação das vias aéreas é uma interação complexa entre diferentes tipos e mediadores celulares, fundamental para que ocorram as alterações características da inflamação e do processo de remodelamento tecidual observados na asma brônquica. Assim, as células do sangue periférico incluindo os eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos são recrutadas para o interior das vias aéreas inflamadas. Este processo ocorre a partir do aumento da expressão de moléculas de adesão tais como: molécula de adesão neuronal (NCAM), molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e a

molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1), que são uma família de glicoproteínas envolvidas na interação célula-célula e na interação célula e matriz extra-celular. Várias citocinas podem induzir a liberação de moléculas de adesão, mas no caso da resposta alérgica, as mais relacionadas com o aumento da expressão de ICAM-1 são a IL-4 e a IL-13 (Wark e Gibson, 2006).

Os linfócitos são classificados pela molécula que expressam em sua superfície, e os linfócitos T são sub-classificados pelas citocinas que secretam. De forma geral, os linfócitos Th1 produzem IL-2 e IFN- γ , que são essenciais para os mecanismos de defesa do organismo e organizam a resposta imunológica celular. Em contraste, as células Th2 produzem citocinas como a IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13, que são mediadores da resposta inflamatória alérgica humoral. Ocorre ainda uma inibição recíproca entre as sub-populações linfocitárias, o que suporta a hipótese de a asma ser derivada de um desequilíbrio entre as células Th1 e Th2, sendo predominantemente Th2 (Singh e Busse, 2006).

De acordo com a teoria da higiene, os indivíduos que são privados de uma exposição de agentes microbianos durante os primeiros anos de vida podem polarizar os linfócitos T para a resposta alérgica Th2, o que pode resultar no desenvolvimento da asma (Liu, 2007).

Após a ativação dos linfócitos pelo contato com o antígeno, a sub-população T CD4⁺ tem como principal função direcionar respostas imunológicas por intermédio da secreção de uma série de citocinas (Del Prete *et al.*, 1993; Ying *et al.*, 1995), entre elas IL-4, IL-13, IL-5, IL-9, IL-6 e IL-10, que são

responsáveis pela estimulação da produção de IgE, contribuindo, assim, com a eosinofilia (Street e Mosmann, 1991).

Os eosinófilos são granulócitos de linhagem mielóide e são encontrados em abundância em órgãos com interface epitelial como o trato gastro-intestinal e trato respiratório (McFadden e Gilbert, 1992). Quando maduro, o eosinófilo possui núcleo bilobulado e abundantes grânulos densos intracelulares de variados tamanhos. Estes grânulos, além de servirem de estoque para mediadores inflamatórios, são fonte de proteínas inflamatórias, particularmente a proteína básica principal, a proteína catiônica eosinofílica e a proteína X do eosinófilo/neurotoxina derivada do eosinófilo. Como os eosinófilos podem liberar ainda fatores de crescimento (Weller, 1991), elastase (Lungarella *et al.*, 1992) e metaloproteinases (Ohno *et al.*, 1997) além de estimular fibroblastos (Hall e Walport, 1993), acredita-se que possam contribuir para os processos de fibrose tecidual e remodelamento de vias aéreas (Walz *et al.*, 1993). A IL-5 sabidamente induz à diferenciação terminal de eosinófilos imaturos (Sanderson, 1992). Além disso, estimula a liberação de eosinófilos na circulação e prolonga sua sobrevivência. Sedgwick *et al.* (1991) demonstraram que a broncoprovocação com alérgeno aumenta a concentração local de IL-5, sendo esta resposta positivamente correlacionada com o número de eosinófilos nas vias aéreas.

A IL-13 é uma citocina freqüentemente associada à resposta inflamatória asmática, estando aumentada no lavado broncoalveolar e na parede brônquica de pacientes asmáticos. É fortemente relacionada à resposta Th2 em conjunto da IL-4, e seu papel regulatório é bem evidente. A IL-13 parece envolvida na resposta de hiperreatividade brônquica e na hipersecreção de

muco. O bloqueio da IL-13 reduz muitos dos aspectos críticos em modelos experimentais de asma, o que pressupõe o importante papel desta citocina na patogênese desta doença (Zimmermann *et al.*, 2003).

A IL-13 *in vitro*, induz a muitas respostas celulares relevantes para a fisiopatologia da asma, tais como: produção de IgE pelas células B, maturação das células epiteliais, produção de muco, geração proteínas da matriz extracelular e aumento na contratilidade da musculatura lisa brônquica (Therien *et al.*, 2008).

O aumento na produção de muco e das glândulas mucosas são outro aspecto muito importante na fisiopatologia da asma. Alguns mediadores inflamatórios da resposta inflamatória mediada pelos linfócitos TCD4+ podem atingir o epitélio ciliado, causando-lhe dano e ruptura (Holgate, 2007). Como consequência, células epiteliais e miofibroblastos, presentes abaixo do epitélio proliferam e iniciam o depósito intersticial de colágeno na lâmina reticular da membrana basal, o que explica o aparente espessamento da membrana basal e as lesões irreversíveis que podem ocorrer em alguns pacientes asmáticos. Outras alterações, incluindo hiperplasia e hipertrofia do músculo liso, elevação do número de células caliciformes, aumento das glândulas submucosas e alteração no depósito/degradação dos componentes da matriz extracelular, são constituintes do remodelamento, que interferem na arquitetura da via aérea, levando a irreversibilidade da obstrução observada em alguns asmáticos (Kumar, 2001).

1.2.3 Diagnóstico, Classificação e Tratamento

O diagnóstico da asma é baseado na história de sinais e sintomas referidos pelo paciente ou pelo responsável, no histórico de doença atópica na família e no exame clínico, onde pode se verificar a presença de sintomas, tais como, a dispnéia, a tiragem e a utilização da musculatura acessória, bem como a presença de sibilos (GINA, 2007).

Entretanto, nos últimos anos, algumas ferramentas estão sendo usadas para diagnóstico e melhor controle da doença. Entre elas, podemos citar a espirometria, que é muito importante no diagnóstico, a avaliação de pico de fluxo, teste de bronco-provocação com histamina ou metacolina, hemograma, testes cutâneos tipo *prick-test*, escarro induzido e detecção de óxido nítrico no ar exalado (Eder, Ege e Mutius, 2006; GINA, 2007).

A asma deve ser classificada inicialmente, baseada no grau de gravidade, que depende da intensidade de sinais e sintomas decorrentes da limitação ao fluxo aéreo, quantificados por testes espirométricos. Esta classificação, definida por consenso e revisada em 2007, dividiu a asma em 4 diferentes estágios: leve intermitente, leve persistente, moderada persistente ou grave persistente (*Figura 1*).

CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DA ASMA INTERMITENTE Sintomas < 1x/semana Exacerbação breve Sintomas noturnos $\leq 2x/m\acute{e}s$ ♦ PFE ou $VEF_1 \geq 80\%$ do predito ♦ Variabilidade PFE ou $VEF_1 < 20\%$
PERSISTENTE LEVE Sintomas > 1x/semana e < 1x/dia Exacerbação pode afetar atividade e o sono Sintomas noturnos > 2x/mês ♦ PFE ou $VEF_1 \geq 80\%$ do predito ♦ Variabilidade PFE ou $VEF_1 20 - 30\%$
PERSISTENTE MODERADA Sintomas diários Exacerbação pode afetar atividade e o sono Sintomas noturnos > 1x/semana Uso diário de β_2 – agonista de curta ação ♦ PFE ou $VEF_1 60 - 80\%$ do predito ♦ Variabilidade PFE ou $VEF_1 > 30\%$
PERSISTENTE GRAVE Sintomas diários Exacerbação freqüente Sintomas noturnos freqüentes Limitação da atividade física ♦ PFE ou $VEF_1 < 60\%$ predito ♦ Variabilidade PFE ou $VEF_1 > 30\%$

FIGURA 1. CLASSIFICAÇÃO DA GRAVIDADE DA ASMA SEGUNDO O GINA 2007.

Na terapia de controle da inflamação, existem várias drogas que fazem este papel, são elas: Corticosteróides inalatórios, corticosteróides orais, anti-leucotrienos, xantinas e $\beta 2$ agonistas de longa duração. Para o controle da crise asmática as drogas relacionadas são: $\beta 2$ agonista de curta duração, anticolinérgicos e corticosteróides sistêmicos (GINA, 2007).

O tratamento inicial da asma é realizado conforme a classificação de gravidade e as drogas e suas doses são mudadas ao longo do tempo. No acompanhamento destes pacientes o último encontro GINA 2007, sugere que o tratamento deva ser ajustado conforme, do ponto de vista clínico e funcional, o paciente esteja controlado, parcialmente controlado ou não controlado. Outro ponto muito importante no tratamento da asma é a educação do asmático, ele deve estar ciente de sua doença, evitar que desencadeiem as crises situações e usar corretamente a medicação (*Figura 2*).

Parâmetro	Controlado	Parcialmente controlado (Pelo menos 1 em qualquer semana)	Não controlado
Sintomas diurnos	Nenhum ou mínimo	2 ou mais/semana	3 ou mais parâmetros presentes em qualquer semana
Despertares noturnos	Nenhum	pelo menos 1	
Necessidade de medicamentos de resgate	Nenhuma	2 ou mais por semana	
Limitação de atividades	Nenhuma	Presente em qualquer momento	
PFE ou VEF ₁	Normal ou próximo do normal	< 80% predito ou do melhor individual, se conhecido	
Exacerbação	Nenhuma	1 ou mais por ano	1 em qualquer semana
Adaptado da revisão do GINA 2007			

FIGURA 2. NÍVEIS DE CONTROLE NO ACOMPANHAMENTO DO PACIENTE COM ASMA.

Tendo em vista que a asma não tem cura e sim controle, é importante enfatizar que no tratamento destes pacientes deve ser priorizado o controle e a educação frente aos desencadeantes. Além disto, as medicações atualmente usadas não são isentas de efeitos colaterais imediatos e a longo prazo, o que mais uma vez reforça a idéia de que o controle de desencadeantes é fundamental na abordagem terapêutica.

Evidências relacionando o estado psicológico, tais como a ansiedade, a depressão, o estresse pós-traumático e principalmente o estresse crônico, foram freqüentemente relatadas com indivíduos asmáticos nos últimos anos (Wright, 2005). Cabe ressaltar que, situações de estresse têm um papel desencadeante importante, sendo que períodos de estresse são freqüentemente relacionados ao começo e a exacerbação de uma doença atópica como a asma (Wright, 1998).

1.3 Estresse

O estresse é definido como a somatória das reações biológicas a qualquer estímulo adverso – físico, mental ou emocional, interno ou externo – que tende a perturbar a homeostase de um organismo. Quando inadequadas estas reações compensatórias do estresse podem produzir vários distúrbios, fisiológicos e/ou psicológicos (McEwen, 1998).

Qualquer estímulo aversivo interno e/ou externo que imponha mudanças fisiológicas e/ou psicológicas ao organismo, e que permitam o indivíduo resistir e/ou adaptar a este estímulo, pode causar o estresse. As consequências deste estresse variam de acordo com a intensidade, predictibilidade e a controlabilidade do agente estressante (Selye e Horava, 1953).

O conceito de estresse começou a ser desenvolvido no século XX, onde em 1914 o fisiologista Walter B. Cannon sugeriu que o sistema nervoso autônomo simpático fosse a primeira linha de defesa a estímulos estressores agudos. Em 1936, o pesquisador Hans Selye enfatiza a participação dos corticosteróides como mediadores da resposta ao estresse. Selye observou que ratos submetidos a diversos estímulos lesivos (frio, injúria tecidual, excesso de exercício, intoxicação, etc) apresentavam hipertrofia das glândulas adrenais, úlceras gástricas, e curiosamente atrofia de órgãos linfóides (timo, baço e linfonodos). Como, independentemente do estímulo empregado, a resposta do organismo era a mesma, ele concluiu que

representava uma resposta orgânica a injúria e a denominou de “Síndrome de Adaptação Geral”.

Em 1974, Richard Lazarus dividiu o conceito de estresse de duas formas: “eustress” e “distress”. O “eustress” também conhecido como estresse agudo, é aquele estresse que prepara o organismo para as situações “luta ou fuga”, e após o término do estímulo estressante volta para a homeostasia. O “distress” também conhecido como estresse crônico, é o estresse persistente que não permite o enfrentamento adequado, e há dificuldade de adaptação a situação. Este estresse pode se manifestar na forma de comportamentos ansiosos ou depressivos.

1.3.1 Fisiopatologia do Estresse

O estresse se inicia quando existe uma situação adversa, esta situação é percebida pelo sistema límbico e avaliada pelo córtex. Para a ativação da resposta do estresse os sinais sensoriais devem ser processados no núcleo paraventricular do hipotálamo e no centro noradrenérgico do “*locus coeruleus*”, também no hipotálamo. A estimulação neural do hipotálamo faz com que ocorra a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH). O CRH irá estimular a produção do hormônio adrenocorticotropina (ACTH), a partir da clivagem da proopiomelanocortina, na hipófise anterior, também chamada de pituitária. O ACTH cai na corrente sangüínea e atuará no córtex das glândulas adrenais, ocasionando a produção dos esteróides

mineralocorticóides e glicocorticóides, onde se destacam o cortisol e a corticosterona, que têm um papel antiinflamatório, e a arginina vasopressina com efeitos pró-inflamatórios. Concomitantemente, a ação de citocinas decorrentes de processos inflamatórios periféricos, tais quais $\text{TNF}\alpha$, IL-1 e IL-6, pode potencializar estes eventos no hipotálamo, gerando maior produção de glicocorticóides, com o intuito de impossibilitar a amplificação da resposta inflamatória (McEwen, 2007).

Esse estímulo hipófise-adrenal se interrompe quando hormônios supra-renais agem de volta no hipotálamo, inibindo-o. A isso damos o nome de mecanismo retroalimentação negativa, necessário para restabelecer o equilíbrio, tão logo desapareça a necessidade estressora de adaptação. Nos casos de estresse crônico e estimulação continuada, o organismo mantém seu esforço de adaptação continuamente e não ocorre o mecanismo de retroalimentação negativa, causando assim uma diminuição da intensidade do eixo HPA em resposta ao estresse (Raison e Miller, 2003)

Como consequência da ativação deste eixo ocorre uma alteração no ritmo circadiano dos hormônios relacionados ao estresse, e uma alteração morfológica na glândula adrenal, dependendo do tipo e da intensidade deste estresse (Meewisse, 2007).

As glândulas adrenais ou supra-renais são órgãos endócrinos complexos, multifuncionais, essenciais à vida. Cada adrenal é dividida em duas entidades funcionais distintas. A zona externa ou córtex, que compreende 80

a 90% da glândula, derivada do tecido mesodérmico e é fonte dos hormônios corticosteróides. A zona interna ou medula compreende 10 a 20% da adrenal, deriva de células neuroectodérmicas e é fonte dos hormônios catecolamínicos (Guyton e Hall, 1997).

O córtex adrenal, que é responsável pelos hormônios corticosteróides, é dividido em três zonas distintas:

Zona Glomerulosa: Mais externa, muito delgada e é constituída por pequenas células com numerosas mitocôndrias alongadas, que possuem cristais lamelares. É a única responsável pela síntese de aldosterona.

Zona Fasciculata: Média, é constituída por células colunares que formam longos cordões. O citoplasma é muito vacuolado e contém gotículas de lipídeos. As mitocôndrias se distinguem por seu grande tamanho e por numerosas cristas vesiculares dentro de suas membranas. É responsável pela maior parte da síntese de glicocorticóides.

Zona Reticulada: Mais interna, contém redes de células que se interconectam, possuem menos gotículas lipídicas, porém com mitocôndrias semelhantes às das células da zona fasciculata. É responsável pela síntese dos precursores dos esteróides sexuais, e também contribuem para a síntese dos glicocorticóides (Guyton e Hall, 1997).

Quando estimuladas pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o tamanho e o número das células da zona fasciculada e reticular aumentam. Suas

mitocôndrias tornam-se maiores e mais numerosas, e desenvolvem ribossomos centrais cristas vesiculares e membranas polilamelares que se estendem até vacúolos próximos contendo colesterol. Além disso, o retículo endoplasmático destas células também aumenta (Miyamura *et al.*, 2003).

A medula adrenal é responsável pelo hormônio catecolamínico circulante, a adrenalina. Também secreta pequenas quantidades de noradrenalina, que é um neurotransmissor, que em situações selecionadas, também funciona como um hormônio. A medula representa essencialmente um gânglio simpático aumentado e especializado. Entretanto, os corpos celulares neuronais da medula não têm axônios; em vez disso, descarregam seus hormônios catecolamínicos diretamente na corrente sanguínea, funcionando como células endócrinas em vez de células nervosas.

A medula adrenal é geralmente ativada em associação com o resto do sistema nervoso simpático, e age em conjunto com este na reação de “luta ou fuga”. Estímulos são percebidos em vários níveis superiores do sistema nervoso simpático, e são iniciadas respostas no hipotálamo e no tronco cerebral. Geralmente, a ativação da medula adrenal segue-se à ativação do sistema nervoso simpático e é evocada quando os estímulos são mais intensos. A adrenalina atua aumentando a glicogenólise no fígado e no músculo, e a lipólise no tecido adiposo. Atua também em numerosas ações vasculares e viscerais. A estimulação contínua da liberação de catecolamina ou a exposição a agonistas da catecolamina regula para baixo o número de receptores adrenérgicos e induz uma refratariedade parcial a ação do hormônio (Nussdorfer, 1996).

1.3.2 Estresse e o Sistema Imunológico

Nos últimos anos, a investigação da interação entre o estresse e o sistema imunológico tem sido muito estudada, porém ainda faltam ainda muitos estudos para um completo entendimento destas interações. Os primeiros relatos desta interação datam de 200 a.C. onde Galeno observou que mulheres melancólicas tinham uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores de mama (Wright, 2005).

O estresse agudo acarreta uma ação predominante do sistema nervoso autônomo, culminando a liberação de adrenalina e causando a intensificação da resposta imunológica. Já no estresse crônico existe uma predominância de ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal que resulta na produção de hormônios, entre os quais os glicocorticóides, causando uma supressão da resposta imunológica (Herbert e Cohen, 1993).

Os glicocorticóides são importantes moduladores da resposta imunológica e inflamatória. Entre outros efeitos os glicocorticóides são capazes de modificar o padrão de resposta dos linfócitos T, pois eles têm a capacidade de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), o interferon γ (IFN- γ) e a interleucina 2 (IL-2), e provocam um aumento da produção de interleucina 10 (IL-10). Estes efeitos levam os linfócitos T helper a assumir um padrão do tipo Th2, aumentando a expressão de citocinas características tais como a IL-4, IL-10 e IL-13, e uma inibição da expressão de TNF- α e IFN- γ (Ball *et al.*, 2006).

Outros hormônios produzidos no córtex da glândula adrenal também podem influenciar a resposta imunológica tais como: androesterona, progesterona e

a dehidroepiandrosterona (DHEA). A DHEA, ao contrário da corticosterona parece aumentar a síntese de IL-2 e IFN- γ , sem afetar a produção de IL-4 fazendo com que os linfócitos T apresentem uma resposta Th1 (Cohen *et al.*, 2007).

Os hormônios produzidos na glândula pituitária também podem modular a resposta imunológica. Por exemplo, o hormônio do crescimento (GH) parece aumentar a capacidade de fagocitose e aumentar a produção de IL-1 e TNF- α de macrófagos. O CRH também tem a capacidade de modular a resposta imune, pois é capaz de aumentar e inibir a produção de glicocorticóides além de levar a um aumento na produção de IL-1 e IL-2 pelos linfócitos (Weninger, 1999).

Apesar de ter um efeito imunossupressivo, os glicocorticóides que são liberados no estresse crônico, não só inibem esta supressão como, às vezes, exacerbam a resposta inflamatória. Estes efeitos podem ser explicados pela teoria da resistência aos glicocorticóides, onde o estresse crônico diminui a sensibilidade do sistema imunológico aos glicocorticóides que normalmente terminam a cascata inflamatória (Miller, Cohen e Ritchey, 2002).

O cortisol é um hormônio corticosteróide, produzido pela zona cortical da glândula adrenal, de suma importância para a manutenção da vida. Tem papel importante no metabolismo da glicose, das proteínas e das gorduras. É produzido diariamente seguindo o ritmo circadiano imposto pelo hipotálamo, onde no período da manhã encontram-se os maiores níveis no sangue e os menores níveis são encontrados nas primeiras horas de sono. É um hormônio relacionado ao estresse, pois é a via final da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na resposta ao estresse (Ball *et al.*, 2006).

1.4 Modelos Experimentais

Frente à importância da elucidação dos mecanismos fisiopatológicos presentes nos quadros asmáticos em períodos de estresse, e da dificuldade de testá-las em humanos, por motivos éticos, os modelos experimentais vêm sendo amplamente usados.

Modelos experimentais com múltiplas exposições a antígenos são provavelmente muito relevantes para o estudo da fisiopatologia da asma humana (Kips *et al.*, 1992; Tibério *et al.*, 1997). A exposição crônica de cobaias à ovoalbumina (OVA) determina um aumento da resistência e elastância do sistema respiratório (Rrs e Ers) após uma broncoprovocação aguda, além de hiperresponsividade brônquica. Estas alterações parecem decorrer da contração da musculatura lisa brônquica, formação de edema peribrônquico e do aparecimento de um processo inflamatório ao redor das vias aéreas caracterizado predominantemente pela presença de eosinófilos ativados (EPO+) e linfócitos T CD3+/CD4+. Neste modelo animal encontramos resposta mecânica e inflamatória tissular, aumento do NO exalado e alterações do parênquima distal, semelhante à observada na asma humana (Tibério *et al.*, 1997; Prado *et al.*, 2006; Angeli *et al.*, 2008; Nakashima *et al.*, 2008).

Como as cobaias são animais de pequeno porte, fácil manutenção em biotérios, custos relativamente baixos, além de apresentarem hiperresponsividade de vias aéreas a diversos estímulos e desenvolverem

um infiltrado eosinofílico após sensibilização representam uma opção adequada para a utilização em modelos experimentais para estudo da resposta inflamatória alérgica (Kallós e Kallós, 1984; Dunn *et al.*, 1988; Ishida *et al.*, 1989).

Existem alguns tipos de modelos experimentais desenvolvidos para o estudo da fisiopatologia do estresse. Foram estudados dentre outros a exposição ao frio, restrição de movimento, choque na pata, privação de sono, e a natação forçada (Andersen *et al.*, 2004). Recentemente, em nosso grupo de pesquisa, foi realizado um estudo onde foi avaliado o uso do cloridrato de fluoxetina e seus efeitos, no pulmão de cobaias, que foram submetidas à natação forçada, sendo a natação forçada uma reação de estresse tipo pânico (Capelozzi, 2004). No modelo de natação forçada, ocorre desistência por escapar da situação estressora da natação em um espaço restrito, que pode ser avaliado pela imobilidade do animal (Porsolt, 1977). Este comportamento de imobilização é, ao menos em parte, revertido por tratamentos prévios com anti-depressivos conhecidos clinicamente, sugerindo que a imobilidade do animal, seja um comportamento possivelmente relacionado à emocionalidade do mesmo (Capelozzi *et al.*, 2007). Também em nosso grupo, estudos relacionando o estresse e a asma, utilizando o modelo de choque na pata para indução do estresse, avaliaram a mecânica respiratória e a resposta inflamatória de neuropeptídeos em ratos.

Entretanto não existem trabalhos relacionando o estresse á asma, que elucidem o papel do transporte mucociliar, da produção de muco, e da expressão de IL-13 na fisiopatologia da asma.

2

OBJETIVOS

Deste modo, nossos objetivos foram avaliar, em cobaias com inflamação alérgica crônica submetidas a estresse físico repetido induzido pela técnica de natação forçada, os seguintes aspectos:

1. A resposta de transporte mucociliar, particularmente caracterizando a velocidade de transporte mucociliar, a frequência de batimentos ciliar, a diferença de potencial transepitelial, a transportabilidade pela tosse e o ângulo de contato do muco.
2. As alterações na glândula adrenal, incluindo peso, a avaliação histopatológica das suas camadas e a dosagem de cortisol.
3. A resposta inflamatória eosinofílica na parede das vias aéreas.
4. A quantidade de muco ácido e neutro nas células epiteliais das vias aéreas.
5. A expressão de IL-13 no epitélio brônquico e nas células inflamatórias presentes nas paredes das vias aéreas.

3

MÉTODOS

3 Material e Métodos

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo n° 267/06). Foram utilizadas cobaias do sexo masculino, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Em média, o peso corporal dos animais foi de aproximadamente 300g no início do protocolo.

3.1 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

1. Grupo SAL – Inalações com soro fisiológico (n=8)
2. Grupo OVA – Inalações com ovoalbumina (n=8)
3. Grupo SAL-NAT – Submetidos à natação forçada e inalações com soro fisiológico (n=8);
4. Grupo OVA-NAT – Submetidos à natação forçada e inalações com ovoalbumina (n =8);

3.2 Protocolo de Inalações

As cobaias foram colocadas em uma caixa de exposição de acrílico (30x15x20 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (*Soniclear, São Paulo, Brasil*) que produz partículas cujo diâmetro varia de 0,5 a 10 μm , com taxa de nebulização de 1 ml/min. Foram submetidas às inalações repetidas com aerossol de ovoalbumina diluída em NaCl 0,9% (soro fisiológico) por 15 minutos ou até aparecer sinais de desconforto respiratório tais como tosse, tiragem intercostal, coriza intensa e/ou cianose. O protocolo de inalação foi repetido duas vezes por semana durante um período de quatro semanas. Os animais controle foram submetidos à exposição de aerossol de soro fisiológico seguindo o mesmo protocolo descrito acima. Após setenta e duas horas da última inalação todos os animais foram submetidos ao protocolo de avaliação do transporte mucociliar e coleta de muco para avaliação do transporte mucociliar e após os pulmões foram fixados e submetidos à análise histopatológica.

FIGURA 3. CAIXA DE INALAÇÃO ACOPLADA AO INALADOR ULTRASSÔNICO.

3.3 Protocolo de Natação Forçada

As cobaias foram colocadas em uma caixa plástica (35A x 53L x 31P) com bordas arredondadas para que elas não conseguissem sair. Esta caixa foi completada com água potável, na temperatura de 25°C. Para manter esta temperatura foi utilizada uma resistência própria para o aquecimento de água, e para o resfriamento da água bolsas de gel congelado (U-Tek *temperature assurance materials*; SCA EUA). Os animais foram submetidos ao protocolo de natação forçada durante 10 minutos por dia, a partir da quarta inalação. Foram realizadas 10 sessões de natação, sendo estas em cinco dias consecutivos, com um descanso de dois dias, e na seqüência mais cinco dias consecutivos.

Os animais eram retirados da água quando: 1- afundavam duas vezes (exceto para mergulhos “intencionais” aprendidos pelo animal, na tentativa de busca por saídas alternativas); 2- sinais de fadiga (desconforto respiratório, bem como movimentos descoordenados); 3- dois ou mais espirros (a cobaia é um animal que respira somente pelo nariz, não sendo então desejada aspiração de líquidos). Estes sinais podem vir a causar o afogamento do animal, bem como posterior parada cárdio-respiratória.

Para que o animal não sofresse com o frio acarretado pela diferença de temperatura ao ser retirado da água, o mesmo foi enxugado manualmente com uma toalha, sendo a seguir colocado em uma caixa acrílica fechada com um fluxo de ar quente gerado por um secador de cabelo (*Faet Prata*

1200w; modelo SC101; Rio de Janeiro; Brasil) até que não mais apresentasse tremores e estivesse totalmente aquecido e seco.

FIGURA 4. CAIXA DE NATAÇÃO AONDE OS ANIMAIS FORAM SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE INDUÇÃO DO ESTRESSE REPETIDO.

FIGURA 5. LINHA DE TEMPO CONSTANDO OS DIAS EM QUE OS ANIMAIS FORAM SUBMETIDOS À NATAÇÃO FORÇADA E AO PROTOCOLO DE SENSIBILIZAÇÃO.

3.4 Avaliação *in vivo* da Diferença de Potencial Transepitelial

Após setenta e duas horas da última inalação todos os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg de peso) e submetidos ao protocolo para avaliação do transporte mucociliar. Para tanto, retiramos cuidadosamente, cerca de um centímetro da parte anterior da traquéia acima da cânula, e com animal ainda vivo, foi medida a PD realizada segundo a técnica modificada e validada por Lacaz-Vieira e Procópio (1988). Foram utilizados dois microeletrodos flexíveis (pontes de Agar), saturados com KCl, conectados a duas semi-células de calomelano, sendo uma de referência e outra de teste, ambas ligadas a um voltímetro aterrado de grande alimentação (*Fisher Accument 950; Fisher Scientific, EUA*) (*Figura 6*). Para a medida da PD, após a calibração, o eletrodo de referência foi colocado, com auxílio de um catéter de polietileno, na submucosa do animal. O eletrodo teste, também conectado ao catéter, foi colocado na superfície epitelial da cobaia perto do pescoço. Foram realizadas 3 medidas e os dados foram expressos em mV.

FIGURA 6. VOLTÍMETRO: MENSURAÇÃO DA PD.

Após a mensuração da PD, foi coletado aproximadamente 0,5 ml de muco que foi armazenado em óleo de vaselina e congelado em freezer -20° para posterior análise. Foram coletados 5 mL de sangue pela veia cava, os rins e as adrenais foram retiradas em bloco. A traquéia foi ocluída ao final da expiração de modo a manter o volume pulmonar próximo à capacidade residual funcional. Os animais foram sacrificados por exsanguinação (secção da aorta abdominal). Os pulmões e o coração foram retirados em monobloco e preparados para os estudos morfométricos.

3.5 Avaliação *ex vivo* da Velocidade do Transporte Mucociliar (VTM)

Para este estudo foi desenvolvida uma nova técnica de estudo de transporte mucociliar *ex vivo*, baseada em estudos prévios com ratos e com pálaro de rã (Rivero, 2001; Carvalho-Oliveira, 2005). Imediatamente após a coleta, o tecido da traquéia do animal recebeu uma nebulização com solução fisiológica para manter a umidade, o tecido foi cuidadosamente posicionado de forma com que o tecido ficasse em uma superfície plana, sob o microscópio óptico (aumento de 100x), onde um retículo quadriculado (cada quadrante tem 50µm) foi acoplado à ocular (*Figura 7*). Foi inserida uma gotícula de nanquim líquido (aproximadamente 50µL) e o seu tempo de deslocamento foi medido no sentido cranial. Foram cronometrados três

deslocamentos por animal e os resultados expressos na forma de velocidade (distância dividida pelo tempo).

FIGURA 7. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA A MENSURAÇÃO DA VELOCIDADE DE TRANSPORTE MUCOCILIAR.

3.6 Avaliação *ex vivo* da Freqüência de Batimento Ciliar (FBC)

Para a avaliação da FBC utilizamos o método previamente padronizado em nosso laboratório (Pazetti *et al.*, 2008). O outro fragmento de tecido da traquéia também recebeu a nebulização e foi posicionado sob um microscópio óptico acoplado a uma filmadora (Kodo CCD K-512EX, Coréia) para visualização e captação da imagem do epitélio ciliar traqueal que foi

enviada a um monitor (*Olympus, OEV141, Japão*) (*Figura 8*). A medida da FBC foi realizada em uma sala escura onde a fonte de luz era gerada através de um estroboscópio focal (*Machine Vision Strobe 5000, EUA*) colocado a uma distância aproximada de 2 cm do epitélio traqueal e que emite feixes luminosos a uma frequência ajustável. Após a localização do campo a ser mensurado, por meio da observação do epitélio ciliar pela imagem gerada no monitor, a determinação da FBC foi obtida três vezes, e os resultados expressos em Hz.

FIGURA 8. EQUIPAMENTO DE MENSURAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE BATIMENTO CILIAR.

3.7 Medida do Ângulo de Contato

O ângulo de contato é caracterizado pela habilidade de um fluido biológico em se espalhar quando depositado em uma superfície plana. Do ponto de vista físico, o ângulo de contato é dependente da natureza do sólido, do líquido e da interação entre eles (Girod *et al.*, 1992). É medido pelo ângulo formado entre a tangente da interface ar-líquido e a superfície sólida, onde as três faces se encontram (Rivero, 2001). O aparelho que mede o ângulo de contato consiste em uma lupa com braço articulado para movê-lo para frente e para trás e lateralmente. Esta lupa tem a capacidade de aumento de 25 vezes e sua ocular possui um goniômetro com escala de 0° a 180° (*Figura 9*). As amostras foram mergulhadas em éter de petróleo, e em seguida depositadas em uma lâmina, tratada anteriormente com solução sulfocrômica, com posterior lavagem com água destilada e deionizada para a retirada das cargas elétricas que interferem na medida do ângulo. Durante a análise, a lâmina foi mantida sobre um suporte de ferro temperado com furos, permitindo o fornecimento de umidificação por meio de um banho Maria a uma temperatura de 37°C, para evitar o ressecamento da amostra de muco (Macchione *et al.*, 1995).

FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MEDIDA DO ÂNGULO DE CONTATO. 1. LUPA ACOPLADA AO GONIÔMETRO; 2. FONTE DE LUZ; 3. CÂMARA DE ACRÍLICO; 4. PLATAFORMA FENESTRADA; 5. RESERVATÓRIO DE ÁGUA; 6. REPRESENTAÇÃO DA MEDIDA DO ÂNGULO DE CONTATO. *FONTE: NAKAGAWA ET AL., 2000.*

3.8 Análise *in vitro* da Transportabilidade pela Tosse

Para esta análise foi utilizado um aparelho simulador de tosse adaptado de King *et al.* (1985) (*Figura 10*). Este simulador consiste de um cilindro de ar de 49,5 litros, onde sobre pressão de 40 polegadas/libra o ar é enviado a um solenóide que segura o ar por dois segundos e abre durante meio segundo. Este ar foi transmitido para um tubo de acrílico de diâmetro interno de 4

milímetros e 133 milímetros de comprimento. O fluxo aéreo obtido nesta simulação é de aproximadamente 235 litros/minuto.

Primeiramente, uma pequena amostra de muco (aproximadamente 5 μ l) foi banhada em éter de petróleo para a remoção do óleo de vaselina. Esta amostra foi posicionada dentro do tubo acrílico, e a tosse artificial é disparada. O deslocamento da amostra de muco foi medido por uma régua, registrado e expressos em milímetros.

FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MÁQUINA SIMULADORA DE TOSSE:

1. RESERVATÓRIO DE AR COMPRIMIDO; 2. VÁLVULA SOLENÓIDE; 3. CONTROLADOR DA VÁLVULA SOLENÓIDE; 4. RÉGUA MILIMETRADA; 5. CILINDRO ACRÍLICO. *FONTE:* NAKAGAWA ET AL., 2000.

3.9 Dosagem de Cortisol Sérico

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

O cortisol foi dosado pelo sistema imunofluorométrico AutoDELFIA (Perkin Elmer, Turku, Finlândia), sendo utilizado o kit para a dosagem do mesmo (AutoDELFIA Cortisol B060-101, Perkin Elmer, Finlândia). Este método se baseia na reação competitiva entre a molécula de cortisol da amostra e a molécula de cortisol ligada ao elemento químico Európio. Cabe lembrar que anticorpos contra o cortisol são limitados e específicos. Após a ligação, é misturada uma solução que dissocia os íons de Európio da molécula de cortisol e produz a fluorescência. Esta fluorescência é medida pelo sistema, e a sua intensidade é inversamente proporcional à concentração de cortisol da amostra.

3.10 Avaliação do Peso das Adrenais

O rim e a glândula adrenal foram retirados em bloco. A adrenal foi dissecada e pesada imediatamente em uma balança analítica (*Mettler Toledo, AG20, Suíça*). Os dados foram expressos em gramas.

3.11 Estudo Morfométrico

Depois de retirar o monobloco pulmões e coração, um dos pulmões foi embebido em solução de paraformaldeído a 4% para a fixação, por 24 horas. Na seqüência, este foi transferido para uma solução de etanol 70%. Após a fixação, o material foi submetido às técnicas histológicas habituais com parafina, para obtenção de cortes de 4 μm de espessura. Os cortes foram submetidos à coloração de LUNA, que é utilizada para a identificação dos eosinófilos e uma combinação de ácido periódico de *Schiff* (PAS) e Azul Alciano (AB) em pH=2,5 para a detecção de mucinas ácidas e neutras.

O tecido estudado foi retirado de regiões periféricas dos pulmões. Com o auxílio de um retículo sobreposto à ocular do microscópio, foi utilizada a técnica de contagem de pontos (Weibel, 1963) para a quantificação dos índices estudados. Este retículo contém 100 pontos e 50 retas em uma área total (no aumento de 1000X) de $10^4 \mu\text{m}^2$. Vários autores já demonstraram previamente que este método é adequado para esse tipo de avaliação (Garcia *et al.*, 1994; Tibério *et al.*, 1997, Leick-Maldonado *et al.*, 2002; Angeli *et al.*, 2008).

3.12 Contagem de Eosinófilos

O número de eosinófilos foi contado ao redor das vias aéreas, entre o epitélio brônquico e a adventícia, no aumento de 1000x do microscópio

óptico. Foram analisadas de 3 a 5 vias aéreas por corte selecionadas de forma randômica. Os resultados foram expressos como células por unidade de área ($10^4\mu\text{m}^2$).

3.13 Estudo Imunohistoquímico para Detecção de IL-13 em Células Inflamatórias e no Epitélio Brônquico

As lâminas, previamente preparadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano (Silane, Sigma), contendo os cortes histológicos dos pulmões, foram desparafinadas e hidratadas. A recuperação antigênica foi realizada em alta temperatura por meio de tampão citrato em pH 6,0 por 1 minuto a 125°C em panela pascal. Após este período as lâminas foram lavadas em água corrente destilada, e depois em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) por 3 vezes de 3 minutos.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada (H_2O_2) 10V 3%, por 7 vezes de 5 minutos. Após este procedimento, as lâminas foram lavadas com água corrente destilada. Na sequência as lâminas foram mergulhadas em uma solução leitosa contendo leite em pó a 3% diluído em PBS durante 20 minutos. As lâminas foram então incubadas com o anticorpo primário anti IL-13 (sc-1776; Santa Cruz, EUA) diluídos em BSA na proporção de 1:200, sendo aplicado aos cortes relativos ao experimento.

Subseqüentemente, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas pelo ABCkit Vecstastain (Vector Elite PK-6105 (anti goat)). Para a revelação, as lâminas foram lavadas em PBS e foi utilizado o cromógeno 3,3 Diaminobenzina (Sigma Chemical Co, Missouri, EUA).

Finalmente, as lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, as mesmas foram lavadas novamente em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com resina Entellan para microscopia (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.14 Avaliação das Células Inflamatórias IL-13 Positivas ao Redor das Vias Aéreas

O número de células inflamatórias que expressam IL-13 foi contado ao redor das vias aéreas, entre o epitélio brônquico e a adventícia, no aumento de 1000x do microscópio óptico. Foram analisadas de 3 a 5 vias aéreas por corte selecionadas de forma randômica. Os resultados foram expressos como células positivas por unidade de área ($10^4\mu\text{m}^2$).

3.15 Análise das Células Epiteliais Brônquicas IL-13 Positivas por Medida de Densidade Óptica

A medida de densidade óptica foi o método empregado para a análise da positividade de IL-13 no epitélio brônquico das vias aéreas dos animais estudados. A análise por medida de densidade óptica foi realizada por meio de sistema de análise de imagens composto de microscópio (Nikon Eclipse E200, Japão), ligado a uma câmera de vídeo (Infinity X-21C, Canadá) por um adaptador (Nikon Optem 5, Japão), que enviava as imagens por meio de placa digitalizadora de imagens a um computador. Por meio do programa *Image Pro-Plus* (Versão 4.5.0.29, Media Cybernetics, EUA), as imagens foram adquiridas e processadas obtendo-se a medida de área de positividade para IL13 nas lâminas submetidas à técnica imunohistoquímica. Este programa permitiu que lhe fosse informado os tons das cores que representavam as áreas de positividade e assim se pode calculá-las nas regiões do epitélio de interesse previamente delimitadas (*Figura 11*). Os resultados foram expressos como área positiva por comprimento da membrana basal (μm^2).

FIGURA 11. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA IL-13 E DELIMITAÇÃO DO EPITÉLIO DAS VIAS AÉREAS. A IMAGEM FOI ADQUIRIDA EM UM AUMENTO DE 400X, O EPITÉLIO FOI INICIALMENTE DELIMITADO E, ATRAVÉS DE UM PROGRAMA DE ANÁLISE DA IMAGEM, FOI INFORMADO O TOM DE COR REFERENTE À POSITIVIDADE PARA IL-13.

3.16 Avaliação da Área Total de Epitélio, de Muco Ácido e de Muco Neutro

Após a fixação, foi utilizada uma técnica para corar o muco presente nas células do tecido, denominada PAS-AB. É constituída da combinação do ácido periódico de *Schiff* (PAS) e Azul Alciano (AB), em pH=2,5. Esta combinação cora as substâncias ácidas do muco, em azul, e as substâncias neutras, em vermelho. O tecido estudado foi retirado de regiões periféricas dos pulmões. Foram analisadas 3 vias aéreas por animal, e os resultados foram expressos por unidade de área ($10^4\mu\text{m}^2$).

3.17 Avaliação da Adrenal por Analisador de Imagem

Após a pesagem, as glândulas adrenais foram fixadas em paraformaldeído a 4%, por 24 horas, e passadas posteriormente para uma solução de etanol 70%. As glândulas adrenais foram cortadas ao meio, incluídas na parafina e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina. As lâminas foram fotografadas em uma câmera fotográfica digital (Nikon E995, Japão) acoplada a um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, Japão), com uma objetiva de 1x (Nikon Plan UW 1x-0.04 WD 3.2, Japão).

Estas imagens foram analisadas utilizando o software *Image Pro-Plus* (Versão 4.5.0.29, Media Cybernetics, EUA), onde a adrenal foi circundada para se obter a área total (L1). Em seguida, para a diferenciação das quatro zonas da glândula adrenal foram realizados mais três círculos concêntricos (L2, L3 e L4). Para obter a área da zona glomerulosa, a área da L1 foi diminuída da L2. Para a obtenção da zona fasciculata, a área da L2 foi diminuída da L3. A área da zona reticulada foi obtida diminuindo-se a L3 da L4. A área da medula representava a área da L4 (*Figura 12*).

FIGURA 12. FOTOMICROGRAFIA QUE EXEMPLIFICA O DELINEAMENTO DAS DIFERENTES ZONAS DA GLÂNDULA ADRENAL: 1. GLOMERULOSA; 2. FASCICULATA; 3. RETICULARIS; 4. MEDULA; REALIZADO COM O AUXÍLIO DO SOFTWARE *IMAGE PRO-PLUS* (VERSÃO 4.5.0.29, MEDIA CYBERNETICS, EUA).

3.18 Análise Estatística

A análise estatística foi feita pelo programa *SigmaStat* (SPSS Inc, Chicago, EUA) utilizando a análise de variância a dois fatores (Two Way ANOVA) sendo estes sensibilização e estresse. Os gráficos foram expressos na forma de barras e erro padrão. Para os resultados comparando dois grupos (tempo de natação), foi realizado usando o t-test. Foi considerado estatisticamente significativo um $P < 0,05$ para todas as análises.

RESULTADOS

4.1 Tempo de Inalação e de Natação Forçada

Os animais dos grupos controle SAL e SAL-NAT permaneceram em contato com a inalação de salina por 15 minutos durante as sete inalações. As cobaias dos grupos OVA e OVA-NAT apresentaram uma diminuição progressiva do tempo de contato com o antígeno inalatório sem desenvolver desconforto respiratório (TI). Na *Figura 13* apresentamos o TI da sétima e última inalação dos animais dos quatro grupos. Houve uma diminuição significativa no tempo de inalação quando comparamos os grupos sensibilizados OVA e OVA-NAT ($505,13 \pm 81,57$ seg e $588,11 \pm 76,90$ seg) aos grupos não sensibilizados SAL e SAL-NAT ($900,00 \pm 81,57$ seg e $900,00 \pm 81,57$ seg, $p < 0,05$ para as duas comparações).

Considerando as dez sessões de natação forçada que os animais dos grupos SAL-NAT e OVA-NAT, não observamos diferenças significativas entre as médias de tempo de natação nestes dois grupos experimentais ($459,9 \pm 15,15$ seg e $459,51 \pm 7,32$ seg).

4.2 Avaliação da Velocidade de Transporte Mucociliar (VTM)

A *Figura 14* mostra os valores da velocidade de transporte mucociliar em todos os grupos experimentais. Não observamos diferenças significativas entre os animais que receberam inalações de salina (SAL: $1,80 \pm 0,33$ e SAL-NAT: $1,13 \pm 0,15$ $\mu\text{m}/\text{seg}$). Os animais que receberam inalações de ovoalbumina (OVA: $0,54 \pm 0,06$; OVA-NAT: $0,33 \pm 0,28$ $\mu\text{m}/\text{seg}$) obtiveram

valores reduzidos quando comparados aos controles ($p < 0,001$). Porém, no grupo sensibilizado que foi submetido ao protocolo de natação forçada (OVA-NAT) observamos uma diminuição na VTM, quando comparado aos animais que foram sensibilizados e não submetidos ao protocolo de natação forçada (OVA) ($p < 0,05$).

4.3 Avaliação da Frequência de Batimento Ciliar (FBC)

A *Figura 15* mostra os dados de frequência de batimento ciliar na traquéia. Não houve diferença significativa entre os valores de frequência de batimento ciliar nos grupos experimentais (SAL: $16,41 \pm 0,2$; OVA: $15,60 \pm 0,2$; SAL-NAT: $15,53 \pm 0,2$; OVA-NAT: $15,66 \pm 0,3$ Hz).

4.4 Avaliação da Diferença de Potencial Transepitelial (PD)

A *Figura 16* mostra a diferença de potencial transepitelial na traquéia dos grupos experimentais. Os animais expostos a inalações de ovoalbumina (OVA: $3,27 \pm 0,4$; OVA-NAT $2,63 \pm 0,3$ mV) apresentaram valores menores quando comparados aos animais controle (SAL: $8,38 \pm 0,4$; SAL-NAT: $6,56 \pm 0,9$ mV, $p < 0,05$). Não houve diferenças significativas entre os grupos OVA e OVA-NAT.

4.5 Avaliação do Ângulo de Contato

A *Figura 17* mostra os valores do ângulo de contato do muco dos quatro grupos experimentais. Nos grupos expostos à ovoalbumina (OVA-NAT $49,00 \pm 2,10$; OVA: $42,37 \pm 1,83$ graus) observamos aumento significativo no ângulo de contato comparativamente aos grupos controle (SAL: $28,37 \pm 1,19$; SAL-NAT: $30,37 \pm 0,88$ graus; $p < 0,05$). Entretanto os animais sensibilizados com ovoalbumina e submetidos ao protocolo de natação forçada (OVA-NAT) apresentaram valores aumentados quando comparados aos animais sensibilizados e que não foram submetidos ao protocolo de estresse ($p < 0,05$).

4.6 Avaliação da Transportabilidade pela Tosse

A *Figura 18* mostra os resultados da avaliação da transportabilidade pela tosse dos grupos experimentais. Os animais expostos a inalações de ovoalbumina (OVA: $22,63 \pm 2,3$; OVA-NAT $24,75 \pm 2,6$ mm) apresentaram valores menores quando comparados aos animais controle (SAL: $31,75 \pm 4,7$; SAL-NAT: $32,37 \pm 2,9$ mm, $p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA e OVA-NAT.

4.7 Avaliação da Área de Epitélio Brônquico

A *Figura 19* mostra os valores da medida da área de epitélio das vias aéreas dos grupos experimentais. Não houve diferença significativa entre os animais que foram expostos à nebulização com salina (SAL: $170,00 \pm 11,6$; SAL-NAT: $171,25 \pm 6,9 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$). Os animais expostos à nebulização com ovoalbumina (OVA: $228,50 \pm 20,7$; OVA-NAT: $263,50 \pm 17,0 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$) tiveram valores maiores do que os controles ($p < 0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA e OVA-NAT.

4.8 Avaliação da Área de Muco Ácido

A *Figura 20* mostra os valores da área de muco ácido armazenado no epitélio da via aérea dos quatro grupos experimentais. Nos grupos expostos à ovoalbumina (OVA-NAT: $55,12 \pm 6,41$; OVA: $27,50 \pm 4,64 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$) observamos aumento na área de muco ácido quando comparados aos grupos controle (SAL: $7,00 \pm 3,54$; SAL-NAT: $6,37 \pm 1,62 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$, $p < 0,01$). Entretanto, os animais sensibilizados com ovoalbumina e submetidos ao protocolo de natação forçada (OVA-NAT) apresentaram valores aumentados quando comparados aos animais que não foram submetidos ao protocolo de estresse ($p < 0,05$).

4.9 Avaliação da Área de Muco Neutro

Não houve diferenças significativas nos valores da área de muco neutro armazenado no epitélio das vias aéreas nos quatro grupos experimentais estudados (SAL: $13,75 \pm 3,2$; OVA: $16,25 \pm 2,6$; SAL-NAT: $15,00 \pm 2,2$; OVA-NAT: $19,75 \pm 5,3 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$).

4.10 Avaliação Morfométrica do Infiltrado Eosinofílico

A *Figura 21* mostra o número de eosinófilos na parede das vias aéreas de todos os grupos experimentais. Os animais expostos à nebulização com ovoalbumina (OVA: $8,60 \pm 0,3$; OVA-NAT: $8,46 \pm 0,2$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) tiveram aumento significativo quando comparados aos animais que receberam nebulização com salina (SAL: $1,99 \pm 0,2$; SAL-NAT: $2,32 \pm 0,3$; $p < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos sensibilizados.

4.11 Avaliação Morfométrica das Células Inflamatórias IL-13 Positivas na Parede das Vias Aéreas

A *Figura 22* mostra o número de células inflamatórias IL-13 positivas na parede das vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Os animais submetidos à nebulização com ovoalbumina (OVA-NAT: $8,11 \pm 0,40$; OVA: $8,65 \pm 0,43$ células/ $10^4 \mu\text{m}^2$) apresentaram valores maiores quando comparados aos animais controle (SAL-NAT: $5,25 \pm 0,40$; SAL: $6,81 \pm 0,43$

células/ $10^4\mu\text{m}^2$; $p<0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA e OVA-NAT.

4.12 Avaliação Morfométrica da Área de IL-13 Positiva no Epitélio

A *Figura 23* mostra a área positiva para IL-13 no epitélio das vias aéreas dos quatro grupos experimentais. Os animais submetidos à nebulização com ovoalbumina (OVA-NAT: $3,81\pm0,23$; OVA: $3,83\pm0,17\ \mu\text{m}^2$) apresentaram valores maiores quando comparados aos animais controle (SAL-NAT: $2,50\pm0,22$; SAL: $2,53\pm0,21\ \mu\text{m}^2$; $p<0,05$). Não houve diferenças entre os grupos OVA e OVA-NAT.

4.13 Peso dos Animais

Na *Figura 24* observamos a média dos pesos dos animais dos quatro grupos experimentais. Não houve diferença significativa entre os valores de peso dos animais nos grupos experimentais (SAL: $573,2\pm26,6$; OVA: $568,2\pm23,8$; SAL-NAT: $564,9\pm27,8$; OVA-NAT: $566,2\pm24,6\ \text{g}$).

4.14 Peso das Adrenais

Na *Figura 25* observamos a média dos pesos das duas adrenais dos animais dos quatro grupos experimentais. Houve aumento significativo da média do peso das adrenais dos animais dos grupos submetidos à natação forçada (SAL-NAT: $0,34 \pm 0,04$ g, OVA-NAT: $0,32 \pm 0,03$ g) em comparação aos animais dos grupos OVA ($0,20 \pm 0,01$ g) e SAL ($0,23 \pm 0,02$ g, $p < 0,05$ para ambas as comparações).

4.15 Área Total das Adrenais

A *Figura 26* mostra os valores da área total das adrenais nos quatro grupos experimentais. Os animais sensibilizados à ovoalbumina (OVA: $2,21 \pm 0,58$ mm²) apresentaram valores diminuídos quando comparados ao grupo controle (SAL: $8,03 \pm 0,54$ mm²). Os animais submetidos ao protocolo de natação forçada (SAL-NAT: $9,97 \pm 0,54$ e OVA-NAT: $11,90 \pm 0,54$ mm²), apresentaram aumento na área total da adrenal comparativamente aos animais que não nadaram ($p < 0,05$ para todas as comparações). Além disto, a área total da adrenal do grupo sensibilizado e submetido à natação forçada (OVA-NAT) foi significativamente maior do que o observado no grupo não-sensibilizado e estressado (SAL-NAT, $p < 0,05$).

4.16 Área da Zona Glomerulosa das Adrenais

A *Figura 27* mostra os valores da área da zona glomerulosa da glândula adrenal de todos os grupos experimentais. Os animais sensibilizados à ovoalbumina (OVA: $0,21 \pm 0,01 \text{ mm}^2$) apresentaram valores diminuídos quando comparados aos grupos controle (SAL: $0,88 \pm 0,05$; SAL-NAT: $0,91 \pm 0,07 \text{ mm}^2$). Os animais sensibilizados e submetidos à natação forçada (OVA-NAT: $1,28 \pm 0,04 \text{ mm}^2$) apresentaram aumento em relação ao grupo OVA e aos grupos controle (SAL e SAL-NAT, $p < 0,05$ para todas as comparações).

4.17 Área da Zona Fasciculata das Adrenais

A *Figura 28* mostra os valores da área da zona fasciculata da glândula adrenal de todos os grupos experimentais. Os animais sensibilizados à ovoalbumina (OVA: $0,92 \pm 0,02 \text{ mm}^2$) apresentaram valores diminuídos quando comparados aos grupos controle (SAL: $3,27 \pm 0,17$ e SAL-NAT: $4,68 \pm 0,48 \text{ mm}^2$). Os animais sensibilizados e submetidos ao protocolo de natação forçada (OVA-NAT: $6,05 \pm 0,25 \text{ mm}^2$) mostraram aumento quando comparados aos demais grupos (OVA, SAL e SAL-NAT, $p < 0,05$ para todas as comparações).

4.18 Área da Zona Reticularis das Adrenais

A *Figura 29* mostra os valores da área da zona reticularis da glândula adrenal de todos os grupos experimentais. Os animais sensibilizados à ovoalbumina (OVA: $0,94 \pm 0,03 \text{ mm}^2$) apresentaram valores diminuídos quando comparados aos demais grupos (SAL: $3,36 \pm 0,26$; SAL-NAT: $3,81 \pm 0,29$ e OVA-NAT: $3,90 \pm 0,25 \text{ mm}^2$, $p < 0,05$ para todas as comparações).

4.19 Área Medular das Adrenais

A *Figura 30* mostra os valores da área medular das glândulas adrenais de todos os grupos experimentais. Os animais sensibilizados à ovoalbumina (OVA: $0,15 \pm 0,01 \text{ mm}^2$) apresentaram valores diminuídos quando comparados aos grupos controles (SAL: $0,52 \pm 0,03$ e SAL-NAT: $0,58 \pm 0,05 \text{ mm}^2$). O grupo sensibilizado e submetido ao protocolo de natação forçada (OVA-NAT: $0,68 \pm 0,03 \text{ mm}^2$) teve aumento significativo quando comparado aos animais que não nadaram (SAL e OVA, $p < 0,05$ para todas as comparações).

4.20 Quantificação do Cortisol Sérico

A *Figura 31* mostra os valores de cortisol sérico dos quatro grupos experimentais. Houve uma tendência a redução dos níveis de cortisol nos animais sensibilizados à ovoalbumina (OVA: $21,30 \pm 3,32 \text{ } \mu\text{g/dL}$) comparativamente ao seu controle (SAL: $29,75 \pm 1,41$, $p = 0,10$). Os animais que foram submetidos à natação forçada (SAL-NAT: $39,14 \pm 2,70$ e OVA-

NAT: $31,75 \pm 2,35$ $\mu\text{g/dL}$) apresentaram aumento significativo do nível de cortisol sérico comparativamente ao grupo OVA ($p < 0,05$).

4.21 Fotomicrografias

A *Figura 32* mostra fotomicrografias representativas das paredes das vias aéreas coradas com PAS-Alcian Blue (painéis A, B, C e D), LUNA (painéis E, F, G e H) e imunohistoquímica para detectar a expressão de IL-13 nas células epiteliais das vias aéreas (painéis I, J, K e L), em cobaias inaladas com solução fisiológica (painéis A, E e I) ou aquelas cronicamente expostas à ovoalbumina (painéis B, F e J). As cobaias submetidas a exposições repetidas ao evento estressor e inaladas com solução fisiológica (painéis C, G e K) ou ovoalbumina (painéis D, H e L) também estão representadas. Cobaias expostas à ovoalbumina (grupos OVA e OVA-NAT) apresentaram aumento no número de eosinófilos, na área positiva para muco ácido e na expressão de IL-13 nas células epiteliais brônquicas comparadas aos controles (grupos SAL e SAL-NAT). As exposições repetidas ao estresse físico nos animais sensibilizados (OVA-NAT) aumentaram somente a área de muco ácido comparadas ao grupo OVA.

Figura 13. Média e erro padrão dos valores de tempo de inalação (segundos) obtidos na 7ª inalação dos quatro grupos experimentais. Os grupos OVA e OVA-NAT apresentaram uma redução do tempo quando comparados com os controles (* $p < 0,05$, $n=8$).

Figura 14. Média e erro padrão dos valores de velocidade de transporte mucociliar ($\mu\text{m}/\text{seg}$) dos quatro grupos experimentais. Os animais sensibilizados com ovoalbumina apresentaram uma diminuição significativa quando comparados aos animais não sensibilizados (* $p < 0,001$). Os animais sensibilizados que foram induzidos ao estresse apresentaram diminuição significativa quando comparados aos animais não estressados (** $p < 0,05$, $n=8$).

Figura 15. Média e erro padrão dos valores de frequência de batimento ciliar dos quatro grupos experimentais. Não houve diferença significativa entre os grupos (n=8).

Figura 16. Média e erro padrão dos valores de diferença de potencial transepitelial dos quatro grupos experimentais. Os animais que foram submetidos à sensibilização com ovoalbumina apresentaram diminuição significativa quando comparados aos animais não sensibilizados (* $p < 0,05$, $n=8$).

Figura 17. Média e erro padrão dos valores do ângulo de contato dos quatro grupos experimentais. Os animais sensibilizados com ovoalbumina apresentaram um aumento significativo quando comparados aos animais não sensibilizados (* $p < 0,05$). Os animais sensibilizados que foram induzidos ao estresse apresentaram aumento significativo quando comparados aos animais sensibilizados e não estressados (** $p < 0,05$; $n=8$).

Figura 18. Média e erro padrão dos valores da transportabilidade pela tosse dos quatro grupos experimentais. Os animais que foram submetidos à sensibilização com ovoalbumina apresentaram diminuição significativa quando comparados aos animais não sensibilizados (* $p < 0,05$, $n = 8$).

Figura 19. Média e erro padrão dos valores de área de epitélio brônquico dos quatro grupos experimentais. Os animais que foram submetidos às inalações com ovoalbumina apresentaram valores significativamente diminuídos quando comparados aos animais que inalaram solução salina (* $p < 0,05$, $n=8$).

Figura 20. Média e erro padrão dos valores de área de muco ácido dos quatro grupos experimentais. Os animais sensibilizados com ovoalbumina apresentaram um aumento significativo quando comparados aos animais não sensibilizados (* $p < 0,01$). Os animais sensibilizados que foram induzidos ao estresse apresentaram aumento significativo quando comparados aos animais não estressados (** $p < 0,05$, $n=8$).

Figura 21. Média e erro padrão dos valores de número de eosinófilos na via aérea dos quatro grupos experimentais. Os animais submetidos ao protocolo de inalações com ovoalbumina apresentaram um aumento significativo quando comparados aos animais que inalaram solução salina ($p < 0,001$, $n=8$).

Figura 22. Média e erro padrão do número de células positivas para IL-13 na parede das vias aéreas de todos os grupos experimentais. Os animais sensibilizados com ovoalbumina apresentaram aumento significativo quando comparados aos animais não sensibilizados (* $p < 0,05$; $n = 8$).

Figura 23. Média e erro padrão da área positiva para IL-13 no epitélio das vias aéreas de todos os grupos experimentais. Os animais sensibilizados com ovoalbumina apresentaram um aumento significativo quando comparados aos animais não sensibilizados (* $p < 0,05$; $n = 8$).

Figura 24. Média e erro padrão do peso total dos animais dos quatro grupos experimentais. Não houve diferença significativa entre os grupos (n=8).

Figura 25. Média e erro padrão do peso das adrenais dos quatro grupos experimentais. Os grupos submetidos ao protocolo de natação forçada apresentaram valores aumentados quando comparados aos animais que não foram submetidos a este protocolo (* $p < 0,05$, $n=8$).

Figura 26. Média e erro padrão dos valores de área total das adrenais de todos os grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-NAT. ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e OVA.

Figura 27. Média e erro padrão dos valores da zona glomerulosa da glândula adrenal de todos os grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-NAT, ** $p < 0,05$ comparativamente ao grupo OVA.

Figura 28. Média e erro padrão dos valores de zona fasciculata das adrenais de todos os grupos experimentais. * $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e SAL-NAT, ** $p < 0,05$ comparativamente aos grupos SAL e OVA.

Figura 29. Média e erro padrão dos valores da zona reticularis das glândulas adrenais de todos os grupos experimentais (n=8). *p<0,05 comparativamente aos demais grupos.

Figura 30. Média e erro padrão dos valores da área medular das glândulas adrenais de todos os grupos experimentais. Os animais sensibilizados à ovoalbumina (OVA) apresentaram valores diminuídos quando comparados aos grupos controle (SAL e SAL-NAT, * $p < 0,05$). O grupo sensibilizado e submetido ao protocolo de natação forçada (OVA-NAT) teve aumento significativo quando comparado aos animais que não nadaram (SAL e OVA, ** $p < 0,05$, $n=8$).

Figura 31. Média e erro padrão dos valores de cortisol sérico entre os animais que foram submetidos ao protocolo de estresse e os animais que não foram estressados. Houve aumento significativo do cortisol sérico nos grupos experimentais submetidos ao estresse físico (SAL-NAT e OVA-NAT) comparativamente ao grupo OVA (* $p < 0,05$).

Figura 32. Fotomicrografias representativas das paredes das vias aéreas coradas com PAS-Alcian Blue (painéis A, B, C e D) (400x), LUNA (painéis E, F, G e H) (1000x) e imunohistoquímica para detectar a expressão de IL-13 nas células epiteliais das vias aéreas (painéis I, J, K e L) (400x), em cobaias inaladas com solução fisiológica (painéis A, E e I) ou aquelas cronicamente expostas à ovoalbumina (painéis B, F e J). As cobaias submetidas a exposições repetidas ao evento estressor e inaladas com solução fisiológica (painéis C, G e K) ou ovoalbumina (painéis D, H e L) também estão representadas.

5

DISCUSSÃO

Vários estudos sugerem uma interação do estresse e a resposta funcional e inflamatória presente em asmáticos (GINA, 2007). A maior parte dos autores conclui que o estresse desempenha um importante papel na fisiopatologia da asma, porém os mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos. Neste sentido, são necessários estudos clínicos e experimentais para o melhor entendimento da importância do evento estressor e da sua duração na modulação da resposta inflamatória e do transporte mucociliar na asma (Del Donno, 2000; Vig, 2006).

No presente trabalho, utilizando modelo de inflamação alérgica pulmonar, observamos que a sensibilização reduziu o transporte mucociliar, sem modificação da frequência dos batimentos ciliares, mas com alteração das propriedades físicas do muco decorrente do aumento da hidrofobicidade e adesividade do muco, aumento do transporte iônico pelo epitélio brônquico e aumento da quantidade de muco ácido. Houve potencialização da resposta eosinofílica e aumento da expressão de IL-13 no epitélio brônquico e nas células inflamatórias presentes ao redor das vias aéreas, o que sugere um perfil Th2 de resposta de citocinas. As repetidas exposições a ovoalbumina reduziram a área total da adrenal e de cada uma de suas camadas, sugerindo uma inibição do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o que pode ser decorrente da liberação de mediadores inflamatórios presentes neste modelo experimental.

Os animais submetidos ao protocolo de estresse físico repetido (grupos SAL-NAT e OVA-NAT) apresentaram um aumento nos níveis de cortisol

sérico, no peso e na área das adrenais. O estresse físico repetido nos animais sensibilizados piorou o transporte mucociliar, aumentou a quantidade de muco ácido e a hidrofobicidade e adesividade do muco, alterações estas previamente modificadas pelo processo inflamatório crônico, mas potencializadas pela reação ao estresse.

Em relação ao tempo de inalação, encontramos uma redução no tempo em que o animal permanece exposto aos aerossóis nos grupos OVA e OVA-NAT. O tempo de inalação sinaliza a resposta imediata ao contato com antígeno. Como discutido anteriormente, esta depende da desgranulação dos mastócitos e é mediada fundamentalmente pela histamina e pelos cisteinil leucotrienos, que levam à contração da musculatura peribrônquica (Bisgaard, Groth e Madsen, 1985). É interessante notar que não houve diferenças entre os grupos OVA e OVA-NAT, o que sugere que a resposta ao estresse repetido aparentemente não modificou esta resposta. No entanto, quando avaliamos a mecânica do sistema respiratório observamos que o estresse físico potencializou a resposta máxima de elastância do sistema respiratório ao desafio com altas doses de ovoalbumina (30mg/ml) (dados não mostrados). Estes resultados sugerem que o estresse repetido modula, pelo menos parcialmente, a resposta imediata e que este efeito se deve, fundamentalmente, a alterações das vias aéreas distais e do parênquima pulmonar.

Quanto à produção de anticorpos é importante ressaltar que o protocolo de indução de estresse só foi iniciado após a quarta semana, momento no qual

os animais já haviam desenvolvido uma resposta de anticorpos IgG1 (1/320) e aumento de eosinófilos e células mononucleares em vias aéreas, como previamente demonstrado neste modelo (Tibério *et al.*, 1997; Leick-Maldonado *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2005). Isto é um fator relevante, para que pudéssemos avaliar o papel do estresse físico na modulação de um processo inflamatório já estabelecido, sem interferência com a produção de anticorpos. Além disto, como já havia um processo inflamatório poderíamos avaliar o efeito potencializador ou não da resposta inflamatória pela exposição repetida ao estresse físico.

A modulação pelo estresse da desgranulação de mastócitos e da produção de cisteinil leucotrienos já foi avaliada por outros autores (Bisgaard, 2000). Ersoy *et al.* (2008) estudando modelo de estresse por privação de sono por 5 dias mostraram que, na mucosa gastrintestinal, o tratamento com montelucaste sódico, antagonista do receptor de cisteinil leucotrienos, reduziu a resposta inflamatória e a desgranulação mastocitária. No presente modelo, não realizamos colorações específicas para mastócitos, embora frente aos achados citados da resposta de mecânica respiratória não possamos excluir a possibilidade de efeitos deste tipo de resposta inflamatória na modulação das respostas ao estresse físico repetido. Novos estudos serão necessários para a elucidação desta questão no presente modelo experimental.

Não encontramos diferenças entre os animais do grupo SAL-NAT e do grupo OVA-NAT em relação ao tempo de natação forçada. O protocolo de natação

forçada é muito utilizado como um indutor do estresse (Takao *et al.*, 1995; Deak *et al.*, 2003; Forsythe *et al.*, 2003; Zivicovic *et al.*, 2005). Porém, também é usado como um protocolo de avaliação de ansiedade e depressão, e como uma forma de atividade física (Hart *et al.*, 2001; Osorio *et al.*, 2003; Barftai *et al.*, 2004; Magalhães *et al.*, 2004). A diferença entre as duas abordagens relaciona-se à quantidade de exposições às quais o animal é submetido, ao tempo de duração de cada sessão de natação e à temperatura da água. Utilizamos o protocolo com duração de dez dias, com intervalo de dois dias, para que o estresse fosse repetido, porém impedindo que o animal ganhasse condicionamento físico, conforme mostrado por Capellozzi *et al.* (2007) em outro trabalho envolvendo a natação forçada em cobaias. Os autores demonstraram um aumento no tempo de natação de cobaias apenas após o décimo dia de natação. A temperatura da água utilizada foi de 25° C. Embora seja considerada uma temperatura relativamente fria, os animais recuperavam a temperatura rapidamente ao serem retirados da água.

Para o estudo do transporte mucociliar optamos por desenvolver um modelo *ex vivo*, utilizando a própria traquéia do animal. Este modelo foi adaptado de outros previamente utilizados neste laboratório, tais como: modelo de avaliação *in situ*, utilizada para estudo do efeito da reanastomose brônquica no transporte mucociliar de ratos (Rivero *et al.*, 2001), modelo de avaliação *ex vivo* no palato de rã, amplamente utilizado para avaliar o transporte mucociliar (Saldiva, 1990; King, 1998; Carvalho-Oliveira *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2006). O desenvolvimento deste modelo permitiu avaliar a interação

muco-cílio do próprio animal, diferentemente do modelo mais utilizado na literatura que é o do palato de rã, que avalia a velocidade relativa do muco da amostra e o muco do próprio animal no epitélio ciliado da rã.

Observamos também que o estresse físico repetido nos animais sensibilizados potencializou a redução no transporte mucociliar decorrente do efeito inflamatório crônico. Há poucos estudos que avaliaram o transporte mucociliar no sistema respiratório particularmente em situações de estresse (Akiyama *et al.*, 2005). Quanto ao intestino delgado, Mertz (2003) observou que o estímulo com CRF causou aumento da permeabilidade intestinal, aumento na secreção de mucina e hiperreatividade do músculo liso humano. Yates *et al.* (2001) estudaram modelo de estresse por privação de sono e mostraram que a resposta ao estresse agudo aumenta a secreção de íons e a permeabilidade colônica. Além disto, demonstraram que os opióides aumentam o líquido periciliar e diminuem o transporte mucociliar.

Alguns estudos experimentais mostraram que a terapia com corticosteróides pode suprimir a produção de muco, inibindo diretamente as células caliciformes assim como reduzindo as citocinas pró-inflamatórias que estimulam a produção de muco (Kai *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 2005). Entretanto, nas situações estressantes, é possível que os efeitos dos corticosteróides estejam atenuados como previamente discutido no modelo de resistência aos glicocorticóides (Miller *et al.*, 2001).

Chu *et al.* (2000) mostraram que alguns mediadores liberados, tanto pela resposta a um estímulo estressor, quanto pelo processo inflamatório alérgico como, por exemplo, neuropeptídeos, como a substância P, podem atuar de maneira sinérgica e aumentar a produção de muco nas vias aéreas.

Nossos resultados não mostram diferenças entre os grupos quando analisamos a frequência de batimento ciliar. Estes dados corroboram achados prévios em células epiteliais de asmáticos onde não foram encontradas diferenças no batimento dos cílios (Wanner *et al.*, 1986; Bayran *et al.*, 1998). Cabe lembrar que o batimento ciliar pode ser modulado pela ativação adrenérgica. Além disto, uma das terapias mais usadas para o tratamento da asma é representada pelos β_2 adrenérgicos que, ao aumentarem o cAMP, relaxam a musculatura lisa peribrônquica e também aumentam os batimentos ciliares. Neste modelo de estresse físico repetido, apesar do aumento da zona medular parece haver uma resistência aos efeitos adrenérgicos. Além disto, alguns autores têm sugerido que a resposta adrenérgica ao estresse parece mais relevante em formas agudas de exposição a agentes estressores (McEwen, 2000). Este fato pode se associar a diminuição da expressão de receptores β_2 adrenérgicos em situações de aumento de estímulo (McEwen, 1998).

Houve diminuição na diferença de potencial transepitelial (PD), uma medida do transporte iônico epitelial da via aérea, nos animais expostos à ovoalbumina. Não observamos efeitos do estresse nestas medidas. Chung *et al.* (2003) também não observaram diferenças na PD nasal de asmáticos

comparativamente aos controles e sugerem que, o transporte iônico através do epitélio, de pacientes com asma intermitente não contribui para o acúmulo de muco nestes pacientes.

Considerando os modelos animais, Winter e Yeates (1997) estudaram interações entre o transporte iônico e o *clearance* mucociliar em cachorros. Os autores sugerem que a furosemida causa um aumento no fluxo de água para a luz da via aérea, facilitando um aumento do transporte mucociliar. Nakagawa *et al.* (2004) mostraram que cachorros submetidos à hipovolemia apresentaram redução na PD traqueal. Estes dados sugerem que o estado hipovolêmico dos animais pode afetar o transporte iônico na membrana da traquéia. Akiyama *et al.* (2005), analisando a traquéia de animais expostos ao estresse agudo, mostraram que o estresse agudo afeta o epitélio, aumentando a resposta à substância P, provavelmente por meio da ativação de mastócitos.

A avaliação do ângulo de contato mostrou que houve aumento deste parâmetro nos animais expostos à ovoalbumina comparativamente aos seus controles. Além disto, o estresse físico repetido potencializou aumento da hidrofobicidade e adesividade do muco induzido pela resposta inflamatória alérgica crônica. Cabe lembrar que o ângulo de contato avalia propriedades físicas fundamentais para o transporte do muco, e as amostras com um aumento do ângulo de contato se associam à piora do transporte mucociliar (King, 1998; Trindade *et al.*, 2007; Rivero *et al.*, 2001; Albertini-Yagi *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2006). Comparando o muco, de pacientes que

receberam claritromicina, entre indivíduos saudáveis e indivíduos portadores de rinite alérgica, Rubin *et al.* (1997) mostraram que a claritromicina diminuiu o ângulo de contato nos indivíduos portadores de rinite. Deneuille *et al.*, (1997), estudando pacientes portadores de fibrose cística, mostraram que houve uma correlação negativa e significativa entre o transporte pela tosse e o ângulo de contato do muco ($r = -0.81$, $p < 0,0001$).

Observamos que a sensibilização reduziu a transportabilidade pela tosse. Não houve potencialização desta resposta pela exposição ao estresse repetido. Em indivíduos saudáveis, o muco é primariamente transportado pelos cílios, todavia em situações em que ocorre aumento da produção de muco, como na asma, a tosse apresenta um papel importante no transporte do muco (Trindade *et al.*, 2007). Comparando pacientes de fibrose cística e indivíduos saudáveis, os portadores de fibrose cística mostraram aumento no transporte pela tosse usando a máquina simuladora de tosse (Deneuille *et al.*, 1997).

Alguns estudos têm avaliado a relação entre a produção de muco e a inflamação pulmonar. Lu *et al.* (2001) mostraram que cobaias sensibilizadas à ovoalbumina apresentam aumento da expressão dos genes de mucina (MUC5AC e MUC2) em resposta a um desafio antigênico. Os autores sugerem que este aumento parece ocorrer antes da infiltração de eosinófilos. Cohn *et al.* (1997) sugerem que as células Th2 induzem à produção epitelial de muco. Os autores mostraram que, com a inflamação instalada, as células Th2 estimulam a produção de muco na ausência da IL-

4. Louahed *et al.* (2000) mostraram que a IL-9 aumenta a regulação de alguns tipos de genes de mucinas (MUC5AC e MUC2) nas células pulmonares *in vivo* e *in vitro*.

Vários estudos demonstraram que em sujeitos saudáveis a quantidade de muco produzida é bastante pequena. Porém, frente a vários estímulos estressores pode haver aumento na produção de muco (Rogers, 1994; Holgate, 2007). Com relação ao transporte mucociliar, Rogers (1994) sugere que animais sensibilizados e submetidos ao protocolo de estresse podem ter alterações nas propriedades reológicas do muco, com produção de grandes quantidades de muco associada à hiperplasia ou hipertrofia das células caliciformes. Alegra *et al.* (1989) demonstraram que há grande número de células na luz da via aérea de pacientes asmáticos, o que também pode alterar a viscosidade do muco. Embora na fase estável da asma os pacientes não produzem uma grande quantidade de muco, as rolhas de muco viscoso são achados comuns em autópsias de pacientes que morreram de asma (Dunnill *et al.*, 1960).

Para avaliar se havia interferência do estresse repetido na resposta de citocinas inflamatórias de perfil Th2, o que poderia estar contribuindo para as alterações do transporte mucociliar e das propriedades reológicas do muco encontradas, optamos por avaliar a expressão de IL-13 no epitélio e nas células inflamatórias ao redor das vias aéreas. Nossos resultados, tanto da área positiva de IL-13 no epitélio, quanto no número de células positivas para IL-13 ao redor das vias aéreas mostraram aumento nos animais

expostos à ovoalbumina. Entretanto, não houve influência do estresse físico repetido nessa resposta. Estes dados corroboram os dados de Forsythe *et al.* (2003) que estudaram o efeito do estresse agudo (3 dias) e crônico (7 dias), em camundongos utilizando a restrição de movimento e a natação forçada como indutores do estresse. Os autores observaram uma diminuição de células inflamatórias, e aumento na expressão de IL-6, IL-9 e IL-13 nos animais estressados agudamente. Nos animais estressados cronicamente houve aumento no número de células inflamatórias, porém não houve alteração do perfil de citocinas produzidas.

Ao analisarmos a resposta eosinofílica, observamos que os animais sensibilizados tiveram aumento na densidade destas células, porém a exposição ao estresse físico repetido não modificou a resposta. Os trabalhos que estudaram os efeitos do estresse no recrutamento de eosinófilos apresentam resultados conflitantes (McEwen, 1998; Forsythe *et al.*, 2004). Considerando modelos animais, Portela *et al.* (2004) observaram que, em ratos sensibilizados e submetidos ao estresse por choques, houve aumento da formação do edema na via aérea e na infiltração linfocitária, porém o número de eosinófilos ficou inalterado. Por outro lado, Capelozzi *et al.* (2007) encontraram aumento da densidade de eosinófilos em cobaias submetidas à natação forçada após 30 dias de exposição diária. Em humanos, Liu *et al.* (2002) analisaram os efeitos do estresse, em períodos de prova, de universitários asmáticos e observaram um aumento no número de eosinófilos durante um período estressante. Como vimos, torna-se difícil

comparar as diversas respostas encontradas, tendo em vista os diferentes protocolos, tempo de exposição ao estresse e espécies estudadas.

A resposta do estresse pode ser modulada por várias substâncias, tais como esteróides adrenais, catecolaminas e neuropeptídeos. Estes moduladores do estresse podem ter efeitos diferentes no recrutamento e na apoptose dos eosinófilos (Nankova *et al.*, 1996; McEwen *et al.*, 2000; Sapolski *et al.*, 2000; Frieri, 2000). A apoptose de eosinófilos é mediada pela presença de citocinas como IL-3, IL-5 e GM-CSF. Entretanto, em grandes concentrações estas citocinas podem inibir o efeito pró-apoptótico dos glicocorticóides (Machida *et al.*, 2005).

Portela *et al.* (2007) sugeriram que o estresse induzido por choque pode afetar o tônus do músculo liso das vias aéreas durante uma reação anafilática, e que o estresse e os neuropeptídeos têm um importante papel na função pulmonar de ratos sensibilizados. Analisando os efeitos dos neuropeptídeos no recrutamento de eosinófilos, Tibério *et al.* (2003) mostraram que, tanto a substância P, quanto a neurocinina A, contribuem para o recrutamento eosinofílico nas vias aéreas distais e na parede dos alvéolos. No entanto, os mesmos autores não conseguiram evidenciar um efeito protetor do recrutamento eosinofílico em cobaias sensibilizadas à ovoalbumina, mas previamente depletadas de neuropeptídeos pelo tratamento prévio com altas doses de capsaicina (Tibério *et al.*, 1997).

Embora também tenhamos feito a dosagem de cortisol sérico, há limitações para a interpretação destes dados. Por motivos éticos, só foi possível obter as amostras nos animais anestesiados, o que pode ter modificado os níveis séricos. Além disto, houve variação no horário de coleta, o que também pode interferir com os níveis deste hormônio. Não conseguimos padronizar a dosagem do cortisol salivar, o que poderia ter contribuído para superar as limitações acima descritas. Considerando todos estes fatos, julgamos fundamental incluir a avaliação do peso, área e de todas as camadas das adrenais neste estudo.

O peso das adrenais está diretamente relacionado à sua função, isto é, em indivíduos com insuficiência adrenal, o peso dela está diminuído (Oelkers, 1996). Em estudos com animais, os autores relatam a relação entre o aumento do peso animal e da adrenal, o nível de corticóide sanguíneo e o estresse (Ball *et al.* 1995; Fenske, 1996; Brotto *et al.*, 2001). No presente estudo, o peso das adrenais dos animais submetidos ao protocolo de natação forçada estava significativamente aumentado, comparativamente aos demais grupos. Além disto, houve redução do peso da adrenal nos animais sensibilizados e este efeito foi revertido pela exposição repetida ao estresse físico. Quando analisamos cada uma das camadas das adrenais observamos que todas estão reduzidas nas cobaias submetidas ao estímulo inflamatório crônico (grupo OVA) e que a exposição repetida ao estresse físico reverteu estas alterações (grupo OVA-NAT).

A interação da resposta inflamatória e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal tem sido bastante estudada (Turnbull e Rivier, 1999). Além disto, tem sido demonstrado, em pacientes atópicos, que há diminuição da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Wamboldt *et al.*, 2003). Inicialmente os estudos estavam concentrados nos pacientes que faziam uso de corticosteróides. Pedersen (2006) demonstrou em uma revisão sistemática de estudos randomizados e controlados, com pacientes em uso de corticosteróides inalatórios por pelo menos 12 meses, que não houve efeito significativo dos corticosteróides nos níveis de cortisol sérico e urinário.

Contudo, atualmente há várias evidências clínicas que sugerem que, mesmo sem o uso de corticosteróides, os pacientes atópicos e/ou asmáticos apresentam uma menor responsividade do eixo (Vig, Forsythe e Vliagoftis, 2006). Buske-Kirschbaum *et al.* (2002) mostraram que há diminuição da resposta de cortisol de crianças e adultos com dermatite atópica quando estes são submetidos a estresse psico-social. Há evidências que em pacientes asmáticos ocorre diminuição do ritmo circadiano de cortisol, com redução dos níveis de cortisol pela manhã (Edwards *et al.*, 2003). Chrousos (2007) demonstrou que, embora o cortisol basal de crianças asmáticas fosse normal, 14% destas crianças não alcançavam a resposta máxima de produção de cortisol após estímulo. Priftis *et al.* (2006) demonstraram, em uma coorte de 12 meses que incluiu adolescentes asmáticos, que 10% destes pacientes apresentavam redução na reserva adrenal pré-tratamento com budesonida. Tanto estes pacientes, como os demais apresentaram

melhora na resposta da adrenal após o estabelecimento do tratamento com a budesonida.

Há vários estudos experimentais que podem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos nestas respostas. Embora a IL-1 e IL-6 administradas por via periférica possam aumentar a atividade do eixo HPA e dos níveis de CRH, ACTH e glicocorticóides (Marik e Zaloga), várias outras citocinas também podem suprimir este eixo e os receptores de glicocorticóides. Neste sentido, a elevação crônica de IL-6 pode reduzir a secreção de ACTH (Mastorakos, Chrousos e Weber, 1993). Harbuz *et al.* (1992) demonstraram que a IL-4 inibe de modo dose dependente a expressão do RNA mensageiro para a pro-opio-melanocortina (POMC) na hipófise anterior, sem afetar o núcleo para ventricular, sugerindo um efeito direto desta citocina na hipófise. Além disto, o TNF-alfa diminui a secreção de ACTH estimulado por CRH (Gaillard *et al.*, 1990). O interferon-alfa também desempenha um papel importante no eixo HPA, diminuindo a secreção de cortisol e ACTH pela manhã, e aumentando durante a noite, estando relacionados às queixas de cansaço e depressão (Raison *et al.*, 2008).

Woods e Judd (2008) em um estudo com células de adrenais bovinas mostraram que, quando estimuladas com ACTH, a IL-4 aumenta a secreção de cortisol, porém diminui a secreção de andrógenos. Engström *et al.* (2008) mostraram que um desafio imunológico sistêmico por lipopolissacarídes ativa um circuito influenciado pela IL-1 dentro da adrenal, que pode explicar a

dissociação entre os níveis de corticosteróide e ACTH durante os estímulos imunológicos crônicos.

Estes dados sugerem que as citocinas inflamatórias podem reduzir a resposta adrenal e que, neste modelo de estresse, a intensa ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal reverteu este bloqueio.

6

CONCLUSÕES

Deste modo, pudemos concluir que:

1. Neste modelo experimental de inflamação alérgica crônica há piora do transporte mucociliar, sem modificação da frequência de batimentos ciliares, mas com alteração das propriedades físicas do muco, com aumento da hidrofobicidade e adesividade do muco, aumento do transporte iônico pelo epitélio brônquico e aumento da quantidade de muco ácido.
2. A resposta inflamatória alérgica crônica neste modelo experimental aumenta a expressão de IL-13 no epitélio brônquico e nas células inflamatórias presentes na parede brônquica, assim como o recrutamento eosinofílico, sugerindo um perfil de resposta de citocinas Th2.
3. Há redução significativa das adrenais e de todas as suas camadas induzida pelo processo inflamatório crônico, sugerindo uma inibição do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal induzido pelos mediadores inflamatórios presentes neste modelo experimental.
4. Neste modelo experimental de inflamação alérgica crônica, o estresse físico repetido piora o transporte mucociliar, fundamentalmente por potencializar o aumento de muco ácido, a hidrofobicidade e adesividade do muco, alterações estas previamente modificadas pelo processo inflamatório crônico.

5. O estresse físico repetido não potencializou a resposta inflamatória eosinofílica e a expressão de IL-13 no epitélio e nas células inflamatórias presentes na parede brônquica.
6. A exposição ao estresse físico repetido reverteu todas as alterações das adrenais induzidas pelo processo inflamatório crônico, sugerindo que neste modelo de estresse há intensa ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, revertendo o bloqueio parcial do mesmo, induzido pela resposta inflamatória crônica.

- Adler KB, Li Y. Airway Epithelium and Mucus Intracellular Signaling Pathways for Gene Expression and Secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 25:397-400.
- Akiyama H, Amano H, Bienestock J. Rat tracheal epithelial responses to water avoidance stress. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 116: 318-24.
- Al-Bazzaz FJ. Regulation of salt and water transport across airway mucosa. *Clin Chest Med*. 1986; 7 (2):259-72.
- Albertini-Yagi CS, Oliveira RC, Vieira JE, Negri EM, de Oliveira LR, Saldiva PHN, Lorenzi-Filho G. Sputum induction as a research tool for the study of human respiratory mucus. *Respir Physiol Neurobiol*. 2005; 145(1): 101-10.
- Allegra L, Fabbri LM, Picotti G, et al. Bronchial epithelium and asthma. *Eur Respir J*. 1989; 2(suppl):460-8.
- Andersen ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37(6): 791-7.
- Angeli P, Prado CM, Xisto DG, Silva PL, Pássaro CP, Nakazato HD, Leick-Maldonado EA, Martins MA, Rocco PRM, Tibério IFLC. Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 294: L1197 - L1205.
- Ball TM, Anderson D, Minto J, Halonen M. Cortisol circadian rhythms and stress responses in infants at risk of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117(2): 306-11.
- Bartfai T, Lu X, Badie-Mahdavi H, Barr AM, Mazarati A, Hua XY, Yaksh T, Haberhauer G, Ceide SC, Trembleau L, Somogyi L, Kröck L, Rebek J. Galmic, a nonpeptide galanin receptor agonist, affects behaviors in seizure, pain, and forced-swim tests. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2004; 101:10470-75.
- Baum A, Gatchel RJ, Schaeffer MA. Emotional, behavioral, and physiological effects of chronic stress at Three Mile Island. *J Consult Clin Psychol*. 1983; 51(4):565-72.

- Bayram H, Devalia JL, Khair OA, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Sagai M, Davies RJ. Comparison of ciliary activity and inflammatory mediator release from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients and the effect of diesel exhaust particles in vitro. *J Allergy Clin Immunol*. 1998; 102(5): 771-82.
- Bisgaard, H. Role of leukotrienes in asthma pathophysiology. *Pediatr Pulmonol*. 2000; 30: 166-176.
- Bisgaard H, Groth S, Madsen F. Bronchial hyperreactivity to leucotriene D4 and histamine in exogenous asthma. *BMJ*. 1985; 290(6480): 1468-71.
- Boucher RC. Human airway ion transport. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 150:581.
- Braga PC. In vivo observation and counting methods for ciliary motion. In: Braga PC, Allegra L. eds. *Methods in bronchial mucology*. New York: Raven Press 1988; 269-76.
- Brotto LA, Gorzalka BB, Barr AM. Paradoxical effects of chronic corticosterone on forced swim behaviours in aged male and female rats. *Eur J Pharmacology*. 2001; 424(3): 203-09.
- Burrows B, Martinez FD, Hanolen M, Barbee Ram Cline MG. Association of asthma with serum IgE: levels and skin-test reactivity to allergens *N Engl J Med*. 1989;320:271-7.
- Buske-Kirschbaum A, Geiben A, Höllig H, Morschhäuser E, Hellhammer D. Altered responsiveness of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the sympathetic adrenomedullary system to stress in patients with atopic dermatitis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87: 4245-51.
- Busse WW, Kiecolt-Glaser JK, Coe C, Martin RJ, Weiss ST, Parker SR. Stress and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 151:249-52.
- Cannon WB. The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *Am J Physiol – Legacy Content*. 1914; 33: 356-72.
- Capelozzi MA, Leick-Maldonado EA, Parra ER, Martins MA, Tibério IFLC, Capelozzi VL. Morphological and functional determinants of fluoxetine (Prozac)-induced pulmonary disease in an experimental model. *Respir Physiol Neurobiol* 2007; 156: 171-8.

- Capelozzi MA. Determinantes funcionais e morfológicos de ação de drogas sobre os pulmões utilizando como modelo experimental em cobaias o cloridrato de fluoxetina. São Paulo, 2004. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina.
- Carvalho-Oliveira R, Saiki M, Pires-Neto RC, Lorenzi-Filho G, Macchione M, Saldiva PHN. Anti-oxidants reduce the acute adverse effects of residual oil fly ash on the frog palate mucociliary epithelium. *Environ Res.* 2005; 98(3): 349-54.
- Chilvers MA, Rutman A, Callaghan O. Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructure in primary ciliary dysknesia. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 112(3): 518-24.
- Chrousos GP, O'Dowd L, Uryniak T, Simpson B, Casty F, Goldman M. Basal and Cosyntropin-Stimulated Plasma Cortisol Concentrations, as Measured by High-Performance Liquid Chromatography, in Children Aged 5 Months to Younger than 6 Years. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 2125 - 2129.
- Chrousos GP. Stress, chronic inflammation, and emotional and physical well-being: concurrent effects and chronic sequela. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106: S275-S291.
- Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med.* 1995; 332: 1351-62.
- Chu HW, Kraft M, Krause JE, Rex MD, Martin RJ. Substance P and its receptor neurokinin 1 expression in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106: 713-22.
- Chung NC, Illek B, Widdicombe JH, Fischer H. Measurement of Nasal Potential Difference in Mild Asthmatics. *Chest.* 2003; 123:1467-71.
- Cohen S, Hamrick N, Rodriguez MS, Feldman PJ, Rabin BS, Manuck SB. Reactivity and Vulnerability to Stress-Associated Risk for Upper Respiratory Illness. *Psychosom Med.* 2002; 64: 302-10.
- Cohen S, Janicki-Deverts D, Miller GE. Psychological Stress and Disease. *JAMA.* 2007; 298: 1685 - 1687

- Cohen S, Miller GE, Rabin BS. Psychological Stress and Antibody Response to Immunization: A Critical Review of the Human Literature. *Psychosom Med.* 2001; 63: 7-18.
- Cohn L, Homer RJ, Marinov A, Rankin J, Bottomly K. Induction of airway mucus production by t helper 2 (th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med.* 1997; 186: 1737.
- Connor TJ, Kelliher P, Shen Y, Harkin A, Kelly JP, Leonard BE. Effect of subchronic antidepressant treatments on behavioral, neurochemical, and endocrine changes in the forced-swim test. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000; 65(4): 591-7.
- Cryan JF, Lucki I. 5-HT₄ receptors do not mediate the antidepressant-like behavioral effects of fluoxetine in a modified forced swim test. *Eur J Pharmacol.* 2000; 409(3): 295-9.
- Deak T, Bellamy C, D'Agostino L. Exposure to forced swim stress does not alter central production of IL-1. *Brain Res.* 2003; 972: 53-63.
- Del Donno M, Bittesnich D, Chetta A, Olivieri D, Lopez-Vidriero MT. The effect of inflammation on mucociliary clearance in asthma. *Chest.* 2000; 118: 1142-9.
- Del Prete GF, De Carli M, D'Elia MM, Maestrelli P, Ricci M, Fabbri L, Romagnini S. Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. *Eur J Immunol.* 1993;23:1445-9.
- Deneuville E, Perrot-Minot C, Pennaforte F, Roussey M, Zahm JM, Clavel C, Puchelle E, de Bentzmann S. Revisited physicochemical and transport properties of respiratory mucus in genotyped cystic fibrosis patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:166–172.
- Dhabhar FS, McEwen BS. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1999; 96:1059-64.
- Dhabhar FS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity: the role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Ann NY Acad Sci.* 2000; 917:876-93.

- Dhabhar FS. Stress-induced augmentation of immune function—The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain Behavior and Immunity* 2002; 16: 785-98.
- Dumser T, Barocka A, Schubert E. Weight of adrenal glands may be increased in persons who commit suicide. *Am J Forensic Med Pathol.* 1998; 19(1):72-6.
- Dunn AJ, Swiergel AH. The role of cytokines in infection-related behavior. *Ann NY Acad Sci.* 1998; 840: 577-85.
- Dunnill MS. The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial Mucosa. *J Clin Path.* 1960; 13: 27-33.
- Eder W, Ege MJ, Von Mutius E. Asthma The asthma epidemic. *N Engl J Med.* 2006; 355: 2226 - 2235.
- Edwards S, Hucklebridge F, Clow A, Evans P. Components of the diurnal cortisol cycle in relation to upper respiratory symptoms and perceived stress. *Psychosom Med.* 2003; 65: 320.
- Einat H, Clenet F, Shaldubina A, Belmaker RH, Bourin M. The antidepressant activity of inositol in the forced swim test involves 5-HT(2) receptors. *Behav Brain Res.* 2001; 118(1): 77-83.
- Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends Endocrinol Metab.* 1999; 10(9): 359-68.
- Engström L, Rosén K, Angel A, Fyrberg A, Mackerlova L, Konsman JP, Engblom D, Blomqvist A. Systemic Immune Challenge Activates an Intrinsically Regulated Local Inflammatory Circuit in the Adrenal Gland. *Endocrinology.* 2008; 149: 1436-50.
- Ersoy Y, Cikler E, Cetinel S, Sener G, Ercan F. Leukotriene D4 receptor antagonist montelukast alleviates water avoidance stress-induced degeneration of the gastrointestinal mucosa. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2008; 78(3): 189-97.
- Fahy JV. Goblet Cell and Mucin Gene Abnormalities in Asthma. *Chest.* 2002; 122:320S-6S.

- Fenske M. Saliva cortisol and testosterone in the guinea pig: Measures for the endocrine function of adrenals. *Steroids* 1996; 61: 647-50.
- Forsythe P, Ebeling C, Gordon JR, Befus AD, Vliagoftis H. Opposing Effects of Short- and Long-term Stress on Airway Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 169: 220-226.
- Frieri M. Neuroimmunology and inflammation: implications for therapy of allergic and autoimmune diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003; 90 (3): 34-40.
- Fritz GK, Overholser JC. Patterns of response to childhood asthma. *Psychosom Med*. 1989; 51: 347-55.
- Gaillard RC, Turnill D, Sappino P, Muller AF. Tumor necrosis factor alpha inhibits the hormonal response of the pituitary gland to hypothalamic releasing factors. *Endocrinology*. 1990; 127: 101.
- Garcia MLB, Paiva PSO, Dolhnikoff M, Jancar S, Saldiva PHN, Martins MA. Airway and pulmonary tissue responses to Platelet-Activating Factor in rats. *Exp Lung Res*. 1994;20:169-84.
- Garrod R, Lasserson T. Role of physiotherapy in the management of chronic lung diseases: An overview of systematic reviews. *Respir Med*. 2007; 101(12): 2429-36.
- Gatto LA. Cholinergic and adrenergic stimulation of mucociliary transport in the rat trachea. *Respir Physiol*. 1993; 92(2): 209-17.
- Girod S, Zahm JM, Plotkowski C, Beck G, Puchelle E. Role of the physiochemical properties of mucus in the protection of the respiratory epithelium. *Eur Respir J*. 1992; 5: 477 - 487.
- Gutstadt LB, Gillette JW, Mrazek DA, Fukuhara JT, LaBrecque JF, Strunk RC. Determinants of school performance in children with chronic asthma. *Am J Dis Child*. 1989; 143: 471-5.
- Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1997
- Hall FC, Walport MJ. Hypereosinophilic syndromes: association with vasculitis, fibrosis and autoimmunity (Editorial; comment). *Clin Exp Allergy*. 1993;23:542-7.

- Harbuz MS, Stephanou A, Knight RA, Chover-Gonzalez AJ, Lightman SL. Action of interleukin-2 and interleukin-4 on CRF mRNA in the hypothalamus and POMC mRNA in the anterior pituitary. *Brain Behav Immun.* 1992; 6(3): 214-22.
- Hart KJ, Shaw JM, Vajda E, Hegsted M, Miller SC. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. *J Appl Physiol.* 2001; 91: 1663 - 1668.
- Herbert TB, Cohen S. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. *Psychosom Med.* 1993; 55: 364.
- Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 120:1233-44
- Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Decramer M. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. *Eur Respir J.* 1999; 13: 1177-88.
- Ishida K, Kelly LJ, Thomson RJ, Beattie LL, Schellenberg RR. Repeated antigen challenge induces airway hyperresponsiveness with tissue eosinophilia in guinea pigs. *J Appl Physiol.* 1989; 67:1133-39.
- James AL, Elliot JG, Abramson MJ, Walters, EH. Time to death, airway wall inflammation and remodelling in fatal asthma. *Eur Respir J.* 2005; 26: 429-34.
- Jeffery PK, Li D. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucus genes. *Eur Resp J.* 1997; 10: 1655-62.
- Joachim RA, Sagach V, Quarcoo D, Dinh T, Arck PC, Klapp BF. Neurokinin-1 receptor mediates stress-exacerbated allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *Psychosom Med.* 2004; 66: 564-71.
- Jones R, Reynd L. Secretory cells and their glycoproteins in health and disease. *Br Med Bull.* 1978; 34: 9-16.
- Kai H, Yoshitake K, Hisatsune A, Kido T, Isohama Y, Takahama K, Miyata T. Dexamethasone suppresses mucus production and Muc2 and Muc5ac gene expression by NCI-H292 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1996; 271:L484-8.

- Kallós P, Kallós L. Experimental asthma in guinea pigs revisited. *Int Arch Allergy Appl Immun.* 1984; 73(1): 77-85.
- King M, Brock G, Lundell C. Clearance of mucus by simulated cough. *J Appl Physiol.* 1985; 58: 1776-82.
- King M. Experimental models for studying mucociliary clearance. *Eur Respir J.* 1998; 11: 222-28.
- Kips JC, Cuvelier CA, Pauwels RA. Effect of acute and chronic antigen inhalation on airway morphology and responsiveness in actively sensitized rats. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 145: 332-6.
- Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest.* 2002; 109:571-7.
- Knowles MR, Buntin WH, Bromberg PA, Gatzky JT, Boucher RC. Measurements of transepithelial electric potential differences in the trachea and bronchi of human subjects in vivo. *Am Rev Resp Dis.* 1982; 126: 108-12.
- Koko V, Djordjeviæ J, Cvijiæ G, Davidoviæ V. Effect of acute heat stress on rat adrenal glands: a morphological and stereological study. *J Exp Biol.* 2004; 207: 4225-30.
- Kumar RK, Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy. *Pharmacol Ther.* 2001; 91(2): 93-104.
- Lacaz-Vieira F, Procópio J. Comparative roles of voltage and Cl⁻ ions upon activation of a Cl⁻ conductive pathway in toad skin. *Pflügers Arch.* 1988; 412:634-640.
- Lazarus RS, Psychological stress and coping in adaptation and illness. *Int J Psychiatry Med.* 1974; 5(4): 321-33.
- Leal T, Lebacq R, Vanbinst R, Lederman CH, De Cock M, Wallemacq P. Successful protocol of anaesthesia for measuring transepithelial nasal potential difference in spontaneously breathing mice. *Lab Anim.* 2006; 40: 43-52
- Leick-Maldonado EA, Kay FU, Leonhardt MC, Kasahara DI, Prado CM, Fernandes FT, Martins MA, and Tibério IFLC. Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatments in

- an experimental model of chronic airway inflammation in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34: 145-52.
- Liu AH, Hygiene theory and allergy and asthma prevention. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2007; 21(3): 2-7.
 - Liu LY, Coe CL, Swenson CA, Kelly EA, Kita H, Busse WW. School examinations enhance airway inflammation to antigen challenge. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165: 1062- 67.
 - Lorenzi G, Bohm GM, Guimaraes ET, Vaz MA, King M, Saldiva PH. Correlation between rheologic properties and in vitro ciliary transport of rat nasal mucus. *Biorheology*.1992; 29(4): 433-40.
 - Louahed J, Toda M, Jen J, Hamid Q, Renauld JC, Levitt RC, Nicolaides NC. Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 22: 649-56.
 - Lu W, Lillehoj EP, Kim KC. Effects of dexamethasone on Muc5ac mucin production by primary airway goblet cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 288:L52- 60.
 - Lungarella G, Menegazzi R, Gardi C, Spessotto P, de Santi MM, Bertoncin P, Patriarca P, Calzoni P, Zabucchi G. Identification of elastase in humans eosinophils: immunolocalization, isolation, and partial characterization. *Arch Biochem Biophys*.1992; 292: 128-35.
 - Macchione M, Guimarães ET, Saldiva PHN, Lorenzi-Filho G. Methods for studying mucociliary clearance. *Braz J Med Biol Res*. 1995; 28:1347-55.
 - Machida K, Inoue H, Matsumoto K, Tsuda M, Fukuyama S, Koto H, Aizawa H, Kureishi Y, Hara N and Nakanishi Y. Activation of PI3K-Akt pathway mediates antiapoptotic effects of (-adrenergic agonist in airway eosinophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288:860-7.
 - Magalhães A, Summavielle T, Tavares MA, Sousa L. Effects of Postnatal Cocaine Exposure and Environmental Enrichment on Rat Behavior in a Forced Swim Test. *Ann NY Acad Sci*. 2004; 1025: 619 - 629.
 - Maia JG, Marcopito LF, Amaral AN, Tavares BF, Lima E, Santos FA. Prevalence of asthma and asthma symptoms among 13 and 14-year-old school children, Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2004; 38(2): 292-99.

- Marik PE, Zaloga GP. Adrenal Insufficiency in the Critically Ill: A New Look at an Old Problem. *Chest*. 2002; 122: 1784-96.
- Marshall GD Jr, Agarwal SK, Lloyd C, Cohen L, Henninger EM, Morris GJ. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical students. *Brain Behav Immun*. 1998; 12: 297-307.
- Marucha PT, Kiecolt-Glaser JK, Favagehi M. Mucosal wound healing is impaired by examination stress. *Psychosom Med*. 1998; 60: 362-5.
- Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993; 77: 1690-94.
- McEwen B. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*. 2007; 87: 873–904.
- McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med*. 1998; 338: 171-9.
- McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*. 2000; 886: 172-89.
- McFadden Jr ER, Gilbert IA. Asthma. *N Engl J Med*. 1992;327(27):1928-37.
- Meewisse ML, Reitsma JB, Vries GJ, Gersons BPR, Olf M. Cortisol and post-traumatic stress disorder in adults: Systematic review and meta-analysis. *The British Journal of Psychiatry*. 2007; 191: 387 – 392.
- Mertz MR. Irritable bowel syndrome. *N Engl J Med*. 2003; 349(22): 2136-46,.
- Miller GE, Cohen S, Ritchey AK. Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory cytokines: a glucocorticoid-resistance model. *Health Psychol*. 2002; 21(6): 531-41.
- Miyamura N, Tsutsumi A, Senokuchi H, Nakamaru K, Kawashima J, Sakai K, Taguchi T, Tokunaga H, Nishida K, Uehara M, Sakakida M, Araki E. A case of ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia: simultaneous expression of several aberrant hormone receptors in the adrenal gland. *Endocr J*. 2003; 50(3): 333-40.

- Molitoris BA, Nelson WJ. Alterations in the establishment and maintenance of epithelial cell polarity as a basis for disease processes. *Clin. Invest.* 1990; 85(1): 3-9.
- Nakagawa NK, Macchione M, Petrolino MS, Guimarães ET, King M, Saldiva PHN, Lorenzi-Filho G. Effects of a heat and moisture exchanger and a heated humidifier on respiratory mucus in patients undergoing mechanical ventilation. *Crit Care Med.* 2000; 28: 312-17.
- Nakagawa NK, Donato-Junior F, Kondo CS, King M, Auler-Junior JOC, Saldiva PHN, Lorenzi-Filho G. Effects of acute hypovolaemia by furosemide on tracheal transepithelial potential difference and mucus in dogs. *Eur Respir J* 2004; 24: 805-10.
- Nakashima AS, Prado CM, Lanças T, Ruiz VC, Kasahara DI, Leick-Maldonado EA, Dolhnikoff M, Martins MA, Tibério IFLC. Oral tolerance attenuates changes in in vitro lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling induced by chronic allergic inflammation in guinea pigs. *J Appl Physiol.* 2008; 104: 1778 - 1785.
- Nankova B, Kvetnansky R, Hiremagalur B, Sabban B, Rusnak M, Sabban EL. Immobilization stress elevates gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and some neuropeptides in rat sympathetic ganglia: Effects of adrenocorticotropin and glucocorticoids. *Endocrinology* 1996; 137: 5597-5604.
- Nussdorfer GG. Paracrine control of adrenal cortical function by medullary chromaffin cells. *Pharmacol Rev.* 1996; 48: 495-530.
- Oelkers W. Adrenal insufficiency. *N Engl J Med.* 1996; 335(16): 1206-12.
- Ohno I, Ohtani H, Nitta Y, Suzuki J, Hoshi H, Honma M, Isoyama S, Tanno Y, Tamura G, Yamauchi K, Nagura H, Shirato K. eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16:212-9.
- Ordoñez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, Hotchkiss JA, Zhang Y, Novikov A, Dolganov G, Fahy JV. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and

- abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163: 517-23.
- Osorio RA, Christofani JS, D'Almeida V, Russo AK, Picarro, IC. Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2003; 135(1): 89-95.
 - Pavia D, Bateman JRM, Shehan NF, Agnew JE, Clarke SW. Tracheobronchial mucociliary transport in asthma: impairment during remission. *Thorax*. 1985; 40: 171-5.
 - Pazetti R, Pêgo-Fernandes PM, Lorenzi-Filho G, Saldiva PHN, Moreira LFP, Jatene FB. Effects of Cyclosporine A and Bronchial Transection on Mucociliary Transport in Rats. *Ann Thorac Surg*. 2008; 85: 1925 – 29.
 - Pedersen S. Clinical safety of inhaled corticosteroids for asthma in children: an update of long-term trials. *Drug Saf*. 2006; 29(7): 599-612.
 - Porsolt RD. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977; 266(5604): 730-2.
 - Portela CP, Leick-Maldonado EA, Kasahara DI, Prado CM, Tibério IFLC, Martins MA, Palermo-Neto J. Effects of Stress and Neuropeptides on Airway Responses in Ovalbumin-Sensitized Rats. *Neuroimmunomodulation*. 2007; 14: 105-11.
 - 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: L1289-95.
 - Prado CM, Leick-Maldonado EA, Arata V, Kasahara DI, Martins MA and Tibério IFLC. Neurokinins and inflammatory cell iNOS expression in guinea pigs with chronic allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288(4): L741-8.
 - Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IFLC. Effects of Nitric Oxide Synthases in Chronic Allergic Airway Inflammation and Remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006; 35: 457 - 465.

- Priftis KN, Papadimitriou A, Gatsopoulou E, Yiallourous PK, Fretzayas A, Nicolaidou P. The effect of inhaled budesonide on adrenal and growth suppression in asthmatic children. *Eur Respir J*. 2006; 27: 316-20.
- Puchelle E,Zahm JM, Girard F, Bertrand A, Polu JM,Aug F,Sadoul P. Mucociliary transport in vivo and in vitro. Relations to sputum properties in chronic bronchitis. *Eur J Respir Dis*. 1980; 61(5): 254-64.
- Raison CL, Borisov AS, Woolwine BJ, Massung B, Vogt G, Miller AH. Interferon-alpha effects on diurnal hypothalamic-pituitary-adrenal axis ctivity: relationship with proinflammatory cytokines and behavior. *Mol Psychiatry*. 2008; 3:.
- Raison CL, Miller AH. When Not Enough Is Too Much: The Role of Insufficient Glucocorticoid Signaling in the Pathophysiology of Stress-Related Disorders. *Am J Psychiatry*. 2003; 160: 1554 - 1565
- Randell SH, Bouche RC. Effective mucus Clearance Is Essential for Respiratory Health. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006; 35: 20-8.
- Rio EBM, Gallo PR, Siqueira AAF. Mortalidade por asma no município de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*. 2002;36(2):146-54.
- Rio EM, Gallo PR, Reis AO. Asthma mortality in the Municipality of Sao Paulo (1993-1995): analysis by multiple cause of death. *Cad Saúde Publica*. 2003;19(5):1541-4.
- Ritz T, Steptoe A, DeWilde S, Costa M. Emotions and stress increase respiratory resistance in asthma. *Psychosom Med*. 2000; 62: 401-12.
- Rivero DHRF, Lorenzi-Filho G, Pazetti R, Jatene FB, Saldiva PHN. Effects of bronchial transaction and reanastomosis on mucociliary system. *Chest*. 2001; 119: 1510-15.
- Rogers DF. Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders. *Eur Respir J*. 1994; 7: 1690-706.
- Rogers DF. Influence of respiratory tract fluid on airway caliber. In: Raeburn D, Giembycz MA eds. Airway smooth muscle: Development, and regulation of contractility. Basel, Birkhäuser Verlag, 1994; pp 375-409.

- Rubin BK, Druce H, Ramirez OE, Palmer R. Effect of clarithromycin on nasal mucus properties in healthy subjects and in patients with purulent rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155(6):2018-2023.
- Saldiva PHN, King M, Delmonte VLC, Macchione M, Parada MAC, Daliberto ML, Sakae RS, Criado PMP, Silveira PLP, Zin WA, Bohm GM. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ. Res.* 1992; 57: 19-33.
- Saldiva PHN. Aparelho mucociliar: Aspectos funcionais e métodos de estudo. *Jornal de Pneumologia*. 1990; 16(3): 161-70.
- Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood*. 1992; 79(12):3101-9.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews* 2000; 21: 55-89.
- Sedgwick JB, Calhoun WJ, Gleich GJ, Kita H, Abrams JS, Schwartz LB, Volovitz B, Ben-Yaakov M, Busse WW. Immediate and late airway response of allergic rhinitis patients to segmental antigen challenge: characterization of eosinophil and mast cell mediators. *Am Rev Respir Dis*. 1991; 144:1274-81.
- Segerstrom SC, Miller GE. Psychological stress and the human immune system: A meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psycholog. Bull*. 2004; 130(4): 601-30.
- Selye H, Horava A. Stress research. *Science* 1953; 117(3045): 509.
- Selye H. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 1936; 138: 32.
- Selye H. The significance of the adrenals for adaptations. *Science*. 1937; 85(2201): 247-8.
- Singh AM, Busse WW. Asthma exacerbations: Aetiology. *Thorax*. 2006; 61: 809 – 816.
- Sleight MA. Ciliary function in transport of mucus. *Eur J Respir Dis*. 1983; 128: 287-92.

- Stark JL, Avitsur R, Padgett DA, Campbell KA, Beck FM, Sheridan JF. Social stress induces glucocorticoid resistance in macrophages. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 2001; 280: 1799-1805.
- Street NE, Mosmann TR. Functional diversity of T-lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J.* 1991;5:171-7.
- Sturgess JM, Chao J, Turner JA. Transposition of ciliary microtubules: another cause of impaired ciliary motility. *N Engl J Med.* 1980; 303: 318 - 322
- Svartengren K, Philipson K, Svartengren M, Anderson M, Camner P. Tracheobronchial deposition and clearance in small and clearance in small airways in asthmatic subjects. *Eur Respir J.* 1996;9(6): 1123-9.
- Takao K, Nagatani T, Kitamura Y, Kawasaki K, Hayakawa H, Yamawaki S. Chronic forced swim stress of rats increases frontal cortical 5-HT₂ receptors and the wet-dog shakes they mediate, but not frontal cortical beta-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* 1995; 294(2-3): 721-6.
- Takeaki N, Fujimori H, Kozumi Y, Ishihara K, Mue S and Ohuchi K. Effects of glucocorticoids on apoptosis of infiltrated eosinophils and neutrophil in rats. *Eur J Pharmacol.* 1998;354:73-81.
- Teixeira MA, Chaguri LCAG, Carissimi AS, Souza NL, Mori CMC, Saldiva PHN, Lemos M, Macchione M, Guimarães ET, King M, Merusse JLB. Effects of an individually ventilated cage system on the airway integrity of rats (*Rattus norvegicus*) in a laboratory in Brazil. *Lab Anim.* 2006; 40: 419 - 431.
- Therien AG, Bernier V, Weicker V, Tawa P, Falgout JP, Mathieu MC, Honsberger J, Pomerleau V, Robichaud A, Stocco R, Dufresne L, Houshyar H, Lafleur J, Ramachandran C, O'Neill GP, Slipetz D, Tan CM. Adenovirus IL-13–Induced Airway Disease in Mice: A Corticosteroid-Resistant Model of Severe Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008; 39: 26 - 35.
- Thornton DJ, Sheehan JK. From mucins to mucus: Toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2004; 1:54-61.

- Tibério IF, Leick-Maldonado EA, Miyahara L, Kasahara DI, Spilborghs GM, Martins MA, Saldiva PH. Effects of neurokinins on airway and alveolar eosinophil recruitment. *Exp Lung Res*. 2003;29(3): 165-77.
- 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.
- Trindade SHK, Mello Junior JF, Mion OG, Lorenzi-Filho G, Macchione M, Guimarães ET, Saldiva PHN. Methods for studying mucociliary transport. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2007; 73(5): 704-12.
- Trout L, King M, Feng W, Inglis SK, Ballard ST. Inhibition of airway liquid secretion and its effect on the physical properties of airway mucus. *Am J Physiol*. 1998; 274: 258-63.
- Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 1999; 79: 1-71.
- Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, HermanJP. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 291:965-73.
- Varner AE, Lemanske RF Jr. The early and late response to allergen. In Busse WW, Holgate ST, Asthma and rhinitis. 2nd ed. London: Blackwell Science, 2000:1172-85.
- Vig RS, Forsythe P, Vliagoftis H. The role of stress in asthma: Insight from studies on the effect of acute and chronic stressors in models of airway inflammation. *Ann NY Acad Sci*. 2006; 1088: 65-77.
- Walz TM, Nishikawa BK, Malm C, Wasteson A. Production of transforming growth factor alpha by normal human blood eosinophils. *Leukemia*. 1993;7(10):1531-7
- Wamboldt MZ, Laudenslager M, Wamboldt FS, Kelsay K, Hewitt J. Adolescents with atopic disorders have an attenuated cortisol response to laboratory stress. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111(3): 509-14.

- Wanner A, Salathe M, O’Riordan TG. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 1868.
- Wanner A, Sielczak M, Mella JF, Abraham WM. Ciliary responsiveness in allergic and nonallergic airways. *J Appl Physiol*. 1986; 60: 1967-1971.
- Wanner A, Zarzecki S, Hirsch J, Epstein S. Tracheal mucous transport in experimental canine asthma. *J Appl Physiol*. 1975; 39: 950-7.
- Wark PAB, Gibson PG. Asthma exacerbations: Pathogenesis. *Thorax*. 2006; 61: 909 – 915.
- Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest*. 1963; 12: 131-55.
- Weller PF. The immunobiology of eosinophils. *N Engl J Med*. 1991;324(16):1110-18.
- Weninger SC, Dunn AJ, Muglia LJ, Dikkes P, Miczek KA, Swiergiel AH, Berridge CW, Majzoub JA. Stress-induced behaviors require the corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor, but not CRH. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:8283-88.
- Williams OW, Sharafkhaneh A, Kim V, Dickey BF, Evans CM. Airway mucus: from production to secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006; 34: 527-36.
- Winters SL, Yeates DB. Interaction between ion transporters and the mucociliary transport system in dog and baboon. *J Appl Physiol*. 1997; 83: 1348–59.
- Woods AM, Judd AM. Interleukin-4 increases cortisol release and decreases adrenal androgen release from bovine adrenal cells. *Domest Anim Endocrinol*. 2008; 34(4): 372-82.
- Wright RJ. Stress and atopic disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 116: 1301-06.
- Wright RJ, Rodriguez M, Cohen S. Review of psychosocial stress and asthma: An integrated biopsychosocial approach. *Thorax*. 1998; 53:1066-74.

- Yates DA, Santos J, Söderholm JD, Perdue MH. Adaptation of stress-induced mucosal pathophysiology in rat colon involves opioid pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 281: 124.
- Ying S, Durham SR, Corrigan CJ, Hamid Q, Kay AB. Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;12(5):477-87.
- Yoshida M, Watson R, Rerecich T, and O'Byrne PM. Different profiles of T-cell IFN-gamma and IL-12 in allergen-induced early and dual responders with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115: 1004-9.
- Zautra AJ,Burleson MH, Matt KS,Roth S, Burrows L. Interpersonal stress, depression, and disease activity in rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Health Psychol*. 1994; 13(2): 139-48.
- Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111(2): 227-42.
- Živković IP, Rakin AK, Petrović-Djergović DM, Kosec DJ, Mičić MV. Exposure to forced swim stress alters morphofunctional characteristics of the rat thymus. *Journal of Neuroimmunology*. 2005; 160(1).77-86.