

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

**EFEITO DA INTERRUÇÃO ABRUPTA DO
TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE
IPRATRÓPIO NA RESPOSTA CONTRÁTIL DE
TRAQUÉIAS ISOLADAS DE RATOS**

ISABELLE MACIEL DE MORAES

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Ruy Capaz

Fortaleza

2004

FICHA CATALOGRÁFICA

M82e

Moraes, Isabelle Maciel de

Efeito da interrupção abrupta do tratamento crônico com brometo de ipratrópio na resposta contrátil de traquéias isoladas de ratos./ Isabelle Maciel de Moraes; Orientador Francisco Ruy Capaz. - Fortaleza, 2004

126 f.: il.

Dissertação - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina

1. Brometo de ipratrópio 2. Supersensibilidade I. Título

CDD: 615.72

**EFEITO DA INTERRUPÇÃO ABRUPTA DO
TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE
IPRATRÓPIO NA RESPOSTA CONTRÁTIL DE
TRAQUÉIAS ISOLADAS DE RATOS**

ISABELLE MACIEL DE MORAES

**Aprovada com Louvor
06 de Fevereiro de 2004**

BANCA EXAMINADORA

**Professor Dr. Francisco Ruy Capaz
(Orientador)**

Professor. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

Professor Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

**Trabalho realizado no LAFAR (Laboratório de Farmacologia do Aparelho
Respiratório) da Universidade Federal do Ceará**

" O princípio da sabedoria é: adquiere a sabedoria, com todos os teus ganhos, adquiere a inteligência! Estreita-a, e ela te fará crescer; abraça-a, e ela te honrará "
(Provérbios 4, 7- 8)

**Ao Coração de Jesus, fonte de vida e esperança, pela graça de
concluir este trabalho na paz e alegria.**

**Aos meus pais, Elias e Isabel, pela dedicação a minha
formação.**

Ao meu esposo, Corjesu, pelo seu incentivo e paciência.

E a todos os meus parente e amigos pela colaboração.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Ruy Capaz, pela oportunidade concedida, apoio e ensinamento durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Manoel Odorico Moraes pela ajuda na obtenção do medicamento Atrovent[®] junto a Indústria Farmacêutica.

Aos colegas Pós-Graduandos do Laboratório de Farmacologia do Aparelho Respiratório, Carlos Tiago Martins Moura e Fernanda Carvalho Bezerra pela colaboração inestimável na realização deste trabalho.

Aos estudantes de Iniciação Científica, Heloísa Magalhães, Cristiana Moraes e Marcus Aurélio pela amizade e disponibilidade em sempre ajudar.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Iri Sandro P. Lima, Cícero Francisco Bezerra, Flávio Damasceno, Rita Izabel, Virginia Girão pela agradável convivência que desfrutamos.

Aos Professores do curso de Pós-Graduação, pelos ensinamentos científicos imprescindíveis para a minha formação.

À Artemísia Almeida Portela, veterinária responsável pelo Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela disponibilidade presente nas solicitações.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Marta Araújo, Joana Barbosa e Rejane Teixeira, pela presteza e simpatia em nos fornecer ajuda.

As Secretárias do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Silvia Azevedo e Àura Rhanes Yida, pelo cuidado e carinho com que sempre fomos atendidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	14
RESUMO	16
ABSTRACT	18
LISTA DE FIGURAS	20
LISTA DE TABELAS	22
1. INTRODUÇÃO	24
1.1. ANATOMIA E FISIOLOGIA DAS VIAS AÉREAS	25
1.2. CONTROLE NEURAL DAS VIAS AÉREAS	27
1.2.1. Controle Parassimpático	28
1.2.2. Controle Simpático	29
1.2.3. Controle Não Adrenérgico Não Colinérgico	29
1.3. ALGUNS ASPECTOS DO PROCESSO ASMÁTICO	32
1.3.1. Definição e desenvolvimento	32
1.3.2. Resposta asmática	33

1.3.2.1. Resposta asmática precoce	33
1.3.2.2. Resposta asmática tardia	35
1.3.3. Abordagem Terapêutica	37
1.3.3.1. Broncodilatadores	38
1.3.3.1.1. <i>Xantinas</i>	38
1.3.3.1.2. <i>Agonistas beta-adrenérgicos</i>	38
1.3.3.1.3. <i>Antagonistas dos receptores muscarínicos</i>	41
1.3.3.2. Antiinflamatórios	44
1.3.4. Modelos animais de asma	46
1.3.5. Supersensibilidade pré e pós juncional	49
2. OBJETIVOS	53
3. MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1. MATERIAIS	56
3.1.1. Animais	56
3.1.2. Soluções e drogas utilizadas	56
3.1.3. Equipamentos utilizados	57

3.2. MÉTODOS	58
3.2.1. Tratamento crônico com brometo de ipratrópio.	58
3.2.1.1. Sistema de inalação	58
3.2.1.2. Administração crônica do BI	61
3.2.2. Sensibilização e desafio antigênico	61
3.2.3. Avaliação da contratilidade da musculatura traqueal	62
3.2.3.1. Traquéias isoladas	62
3.2.3.2. Curvas concentração-efeito para o carbacol, serotonina e potássio	65
3.2.3.3. Curvas concentração-efeito ao cálcio	65
3.2.3.4. Curvas concentração-efeito para o estímulo elétrico.	65
3.2.4. Análise estatística	66
4. RESULTADOS	67
4.1. RESPOSTA CONTRÁTIL AO CARBACOL APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS SUBMETIDOS A UMA ÚNICA INALAÇÃO DE BROMETO DE IPRATRÓPIO	68
4.2. RESPOSTA CONTRÁTIL AO CARBACOL APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS IMEDIATAMENTE APÓS O TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO	68

4.3.RESPOSTA CONTRÁTIL AO CARBACOL APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS 4 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO	69
4.4.RESPOSTA CONTRÁTIL AO CARBACOL APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS 8 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO	69
4.5.RESPOSTA CONTRÁTIL AO CARBACOL APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS 12 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO	70
4.6.RESPOSTA CONTRÁTIL A SEROTONINA APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS 12 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO .	70
4.7.RESPOSTA CONTRÁTIL AO POTÁSSIO APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS 12 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO .	71
4.8.RESPOSTA CONTRÁTIL AO ESTÍMULO ELÉTRICO APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS 12 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO	71
4.9.RESPOSTA CONTRÁTIL AO CALCIO, SUBSEQUENTE A CONTRAÇÃO INDUZIDA PELO CARBACOL, EM TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS 12 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO.	72
4.10.RESPOSTA CONTRÁTIL AO CÁLCIO, SUBSEQUENTE A CONTRAÇÃO INDUZIDA PELO POTÁSSIO, EM TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS 12 HORAS APÓS A SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO. .	72

4.11.RESPOSTA CONTRÁTIL AO CARBACOL, APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS SENSIBILIZADOS E DESAFIADOS A OVOALBUMINA IMEDIATAMENTE APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO.	73
4.12.RESPOSTA CONTRÁTIL AO CARBACOL, APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS SENSIBILIZADOS E DESAFIADOS A OVOALBUMINA 12 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO.	74
5. DISCUSSÃO.	99
6. CONCLUSÃO.	.109
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	.111

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
AMPC	Adenilato monofostato cíclico
BI	Brometo de ipratrópio
Cch	Carbacol
CCE	Curva concentração-efeito
CFE	Curva frequência-efeito
CONT	Controle
DESF	Desafiado
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
gF	grama força
IgG	Imunoglobulina G
IgE	Imunoglobulina E
IL-5	Interleucina 5
KCl	Cloreto de potássio
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄

n	Número de experimentos
NO	Óxido Nítrico
NANC	Não Adrenérgico Não Colinérgico
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
NO	Óxido Nítrico
OVA	Ovoalbumina
PAF	Fator de ativação plaquetária
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PKA	Proteína quinase A
ROC	Canais operados por receptor
RS	Retículo Sarcoplasmático
SNC	Sistema Nervoso Central
SENS	Sensibilizado
SP	Substância P
SS	Supersensibilidade
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo
VOC	Canais voltagem dependente

RESUMO

Efeito da interrupção abrupta do tratamento crônico com brometo de ipratrópio na resposta contrátil de traquéias isoladas de ratos De Moraes, I.M. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Farmacologia. Data da defesa: 06 de fevereiro de 2004. Orientador: Prof. Dr. Francisco Ruy Capaz.

Visando estudar os efeitos da retirada abrupta após o tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI) ratos machos pesando 200-250 g no início dos experimentos, foram introduzidos em uma caixa de acrílico e submetidos durante 7 minutos à inalação de brometo de ipratrópio ($600\mu\text{M}$). Este procedimento se repetiu a cada quatro horas durante um período de 14 dias. Foram utilizadas duas câmaras de inalação, uma para o grupo experimental (tratado com BI) e outra para o grupo controle (CONT, salina). Outro grupo de animais foi sensibilizado (SENS) e submetido ao mesmo protocolo de inalação com BI que inalaram o brometo de ipratrópio e outra para os animais controle. Os animais SENS foram desafiados 24 horas antes do sacrifício com inalações do antígeno (OVA: 1mg/ml; 5mg/ml; 15/15 minutos; grupo DESF). Ao fim de uma única inalação ou ao término do período de tratamento crônico com BI os animais foram sacrificados 0, 4, 8, 12 horas após a última inalação e as traquéias rapidamente removidas. Após a dissecação a traquéia foi montada sob a forma de anéis, em banho para órgão isolado contendo 8 ml de solução de Krebs-Henseleit (37°C , 95% O_2 , 5% CO_2). Foram então, confeccionadas curvas concentração-efeito (CCE), ao carbachol (Cch), serotonina (5-HT), potássio (KCl), cálcio (CaCl_2) e estímulo elétrico. As CCE ao Cch obtidas com traquéias isoladas de ratos após uma única inalação de brometo de ipratrópio demonstrou desvio para a direita com significativo aumento da CE_{50} [$\text{CE}_{50} \times 10^{-7}\text{M}$: CONT=1,78(1,32 – 2,32); BI 14,6(2,05 – 58,1), $p < 0,05$). Imediatamente após o fim do tratamento crônico as CCE ao Cch também apresentaram aumento significativo da CE_{50} [$\text{CE}_{50} \times 10^{-7}\text{M}$: CONT=2,33(1,25 – 4,32); BI=42,5(21,1 – 85,8), $p < 0,01$). Nos experimentos realizados com traquéias isoladas de ratos 4, 8 e 12 horas após o fim do tratamento crônico ocorreu um progressivo aumento da contratilidade, com a resposta máxima (RM) atingindo um valor máximo 12 horas após a supressão do tratamento crônico com BI (RM 12h: CONT= $1,69 \pm 0,04$, BI $2,64 \pm 0,23$ gF, $p < 0,01$). Esta supersensibilidade caracterizada por aumento vertical, também se manifestou para outros agonistas e estímulos contráteis. Assim, ocorreu supersensibilidade para a serotonina (RM-12h: CONT= $0,59 \pm 0,04$; BI= $1,06 \pm 0,10$ gF, $p < 0,01$) potássio (RM: CONT= $0,70 \pm 0,05$; BI= $1,27 \pm 0,17$ gF; $p < 0,01$) e ao estímulo elétrico (RM: CONT= $1,25 \pm 0,07$; BI= $1,64 \pm 0,06$ gF; $p < 0,01$). As CCE obtidas 12 horas após o fim do tratamento crônico com BI, pela adição de cálcio ao líquido de incubação, após ter sido obtida resposta contrátil ao KCl ou ao Cch, as quais avaliaram, respectiva e indiretamente, a entrada de cálcio via canais VOC e ROC demonstraram que a entrada de cálcio está facilitada em ambos os tipos de canal de cálcio estudados (RM-12h CaCl_2/KCl : CONT= $1,00 \pm 0,09$; BI= $1,54 \pm 0,19$ gF; $p < 0,01$) (RM-12h CaCl_2/Cch :

CONT=1,27±0,10; BI=1,66±0,05 gF; p<0,01). Nos experimentos realizados com animais desafiados, a supressão do tratamento crônico imediatamente após última inalação diminuiu a sensibilidade desviando para a direita a CCE ao Cch [CE50x10⁻⁷M: CONT=2,10(1,28 – 3,44); BI=17,12(4,37 – 67,05), p<0,01)]. Enquanto que, traquéias isoladas de animais desafiados 12 horas após o fim do tratamento ocorreu aumento significativo da contratilidade e da resposta máxima obtida para o carbacol (RM-12h: CONT=2,48±0,19; BI=3,48±0,13 gF; p<0,01). Estes resultados sugerem que a supressão do processo de inalação crônica com BI induz um aumento de resposta contrátil ao Cch atingindo um valor máximo 12 horas após a interrupção do tratamento crônico. Esta supersensibilidade 12 horas após a supressão do tratamento crônico com BI, também foi manifestada para vários outros agonistas, bem como para o estímulo elétrico. A supersensibilidade foi também detectada na resposta contrátil ao Cch, seguindo o mesmo protocolo experimental de interrupção do tratamento em traquéias isoladas de ratos desafiados a OVA. Este aumento de resposta contrátil observado na musculatura traqueal de ratos, 12 horas também que a supersensibilidade está presente, após o desafio antigênico, com incremento ainda maior na resposta contrátil quando comparada traquéias isoladas de animais não desafiados submetidos à retirada abrupta após tratamento crônico com BI.

ABSTRACT

Effect of ipratropium bromide abrupt withdrawal, after chronic treatment, in contractile response of isolated rat tracheas. Moraes, I.M. Dissertation submitted the partial fulfillment of the requirement to degree of master's in Pharmacology to the Graduation Pharmacology Course of Physiology and Pharmacology Departament of Medicine Faculty of the Federal Ceará University. Defense date: 2004, February 06. Professor: Francisco Ruy Capaz.

In order to evaluate ipratropium bromide (IB) abrupt withdrawal effects after chronic treatment in isolated rat tracheas, male rats weighing 200-250g were placed in plastic chambers and submitted to inhalation of IB (600 μ M) during seven minutes. This protocol was repeated each four hours during 14 days. Two inhalation chambers were used, one with experimental group (IB inhalation) and the other with control group (CONT, saline). Another group was ovalbumin (OVA) actively sensitized (SZ) and submitted to the same protocol of *inhalation*. These animals were challenged 24hours before the beginning of the experiments by antigen inhalation (OVA: 1mg/ml; 5mg/ml; 15/15 minutes) (group DESF). At the end of IB treatment period the animals were killed and 0, 4, 8, 12 hours after the last inhalation the tracheas were quickly removed. After dissection the tracheal rings were transferred to a 8 ml organ bath containing Krebs-Henseleit solution mMol/l: NaCl 113.0; KCl 4.7; CaCl₂.2H₂O 1.2; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄.7H₂O 1.2; NaHCO₃ 25.0; Glucose 11.0; 37° C; 95%O₂/5%CO₂). Concentration-effect curves (CEC) were constructed to carbachol (Cch), serotonin (5-HT), potassium (KCl), calcium (CaCl₂) and electric stimulus. CEC to Cch obtained with tracheas isolated from rats submitted to only one IB inhalation showed shift to the right with an increase in the EC₅₀ values [EC₅₀×10⁻⁷M: CONT=1.78(1.32-2.32); IB=14.6(2.05-58.1) p<0.05]. Immediately after chronic treatment CEC to Cch also showed significant increase at EC₅₀ level [EC₅₀×10⁻⁷M: CONT=2.33(1.25-4.32); IB=42.5(21.1-85.8); p<0,01]. Experiments realized with isolated rats tracheas 4, 8, 12 hours after ended the IB chronic treatment showed a Cch maximum response (MR) progressive increase, reaching the greater value 12 hours after IB chronic treatment interruption [MR-12h: CONT=1.69±0.04; IB=2.64±0.23 gF, p<0.01]. This kind of supersensitivity characterized by a vertical increase, was also obtained to other agonists and contractile stimulus. In this way the results showed supersensitivity to serotonin (MR-12h: CONT=0.59±0.04; IB=1.06±0.10; gF; p<0.01), potassium (MR-12h: CONT=0.70±0.05; IB=1.27±0.17; gF; p<0.01) and electric stimulus (MR-12h: CONT=1.25±0.07; IB=1.64±0.06; gF; p<0.01). Calcium CCE were obtained 12hours after the end of IB chronic treatment, after the addition of KCl or Cch in calcium free buffer. This kind of experiment measured, respectively and indirectly the influx of calcium by voltage operated channels(VOC) and by receptor operated channels(ROC). The results demonstrated that influx of calcium was facilitated in both calcium channels studied in this work (MR-12h: CaCl₂/KCl: CONT=1.00±0.09; IB=1.54±0.19; gF; p<0.01) (MR-12h: CaCl₂/Cch; CONT= 1.27±0.10; IB=1.66±0.05; gF; p<0.01). The experiments with OVA challenged animals, realized immediately after the

end of chronic treatment, showed a decreased in the sensibility. The CEC to Cch were shift to the right [EC₅₀10⁻⁷M: CONT=2.10(1.28-3.44); IB=17.13(4.37-67.05), P<0,01]. However, trachea isolated from rat challenged 12 hours after the end of the treatment, showed an increase in the contractility and in the MR obtained to carbachol (MR-12h: CONT=2.48±0.19; IB=3.48±0.13; gF; p<0,01). These data suggest that IB chronic inhalation process follow suppression induced an evident Cch contractile response increase in isolated rat trachea, reaching a maximum value 12 hours after interrupted IB chronic treatment abrupt suppression, was here demonstrated to several agonists and electric stimulus. Supersensitivity was also detected to carbachol contractile response through the same withdrawal experimental protocol in isolated tracheas from rats challenged with OVA. This increased contractile response obtained in rats tracheal smooth muscle, 12 hours after the end of ipratropium bromide chronic treatment, could be related with a component linked with the facilitation influx of calcium by voltage operated channels (VOC) and/or receptor operated channels (ROC).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Câmara de inalação	59
Figura 2. Esquema do circuito elétrico utilizado para controlar temporalmente o sistema de inalação	60
Figura 3. Aparelho utilizado para o registro de contrações de órgãos isolados	64
Figura 4. Curvas concentração-efeito ao carbacol em traquéias isoladas de ratos submetidos a uma única inalação de brometo de ipratrópio (BI)	75
Figura 5. Curvas concentração-efeito ao carbacol em traquéias isoladas de ratos imediatamente após o tratamento crônico com brometo de ipratrópio	77
Figura 6. Curvas concentração-efeito ao carbacol em traquéias isoladas de ratos 4 horas após supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio	79
Figura 7. Curvas concentração-efeito ao carbacol em traquéias isoladas de ratos 8 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio	81
Figura 8. Curvas concentração-efeito ao carbacol em traquéias isoladas de ratos 12 horas após supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio	83

- Figura 9.** Curvas concentração-efeito à serotonina em traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio **85**
- Figura 10.** Curvas concentração-efeito ao potássio em traquéias isoladas de ratos 12 horas após supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio **87**
- Figura 11.** Curvas frequência-resposta à estimulação elétrica em traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio **89**
- Figura 12.** Curvas concentração-efeito ao cálcio(CaCl_2), subsequente à contração induzida pelo carbacol(10^{-6} M) em traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio. **91**
- Figura 13.** Curvas concentração-efeito ao cálcio(CaCl_2), subsequente à contração induzida pelo potássio(10^{-1} M) em traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio **93**
- Figura 14.** Curvas concentração-efeito ao carbacol, em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados a ovoalbumina(OVA). Experimento realizado imediatamente após o tratamento crônico com brometo de ipratrópio **95**
- Figura 15.** Curvas concentração-efeito ao carbacol, em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados a ovoalbumina(OVA). Experimento realizado 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio **97**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao carbacol(Cch) realizadas com traquéias isoladas de ratos submetidos a uma única inalação de brometo de ipratrópio . **76**
- Tabela 2.** CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao carbacol(Cch) realizadas com traquéias isoladas de ratos imediatamente após o tratamento crônico com brometo de ipratrópio **78**
- Tabela 3.** CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao carbacol(Cch) realizadas com traquéias isoladas de ratos 4 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio **80**
- Tabela 4.** CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao carbacol(Cch) realizadas com traquéias isoladas de ratos 8 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio **82**
- Tabela 5.** CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao carbacol(Cch) realizadas com traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio **84**
- Tabela 6.** CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito à serotonina(5-HT) realizadas com traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio **86**

Tabela 7. CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao potássio(KCl) realizadas com traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio **88**

Tabela 8. FE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas frequência-resposta à estimulação elétrica realizadas com traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio **90**

Tabela 9. CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao cálcio, subseqüentes a contração induzida pelo carbacol em traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio **92**

Tabela 10.CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao cálcio, subseqüente a contração induzida pelo potássio realizadas com traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio **94**

Tabela 11.CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao carbacol(Cch) realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados a ovoalbumina(OVA) imediatamente após o tratamento crônico com brometo de ipratrópio **96**

Tabela 12.CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao carbacol(Cch) realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados a ovoalbumina 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio **98**

1. INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

1.1. ANATOMIA E FISIOLOGIA DAS VIAS AÉREAS

As vias aéreas podem ser divididas em superiores e inferiores, sendo as primeiras constituídas pelas fossas nasais, nasofaringe, orofaringe, laringe e a parte inferior composta pela traquéia, brônquios, bronquíolos e partes distas (alvéolos). A traquéia localiza-se abaixo da laringe, apresentando o formato de um tubo, e além de desempenhar outras funções, funciona como um condutor de ar. A traquéia apresenta uma porção cervical e uma torácica sendo formada por um número variável de anéis (16 a 20) ou semi-anéis cartilagosos sobrepostos em forma de U e ligados pela membrana cricotraqueal. Na parte posterior da traquéia não existe o anel cartilaginoso, esta porção é mole e apresenta um músculo, o músculo traqueal, que tensiona as bordas da cartilagem e não deixa que elas se abram, resultando em uma mobilidade desta porção. A membrana cricotraqueal reveste externamente todo o órgão e vai unindo os anéis até a carina local onde a traquéia se divide em brônquio direito e esquerdo.

As vias aéreas continuam a se subdividir em vários ramos, tornando-se cada vez mais curtas, com diâmetro menor e mais numerosas à medida que penetram no pulmão. A traquéia é denominada de via respiratória de primeira geração, e os dois brônquios principais direito e esquerdo de segunda geração e assim sucessivamente. Existem cerca de 20 a 25 gerações antes que o sistema tubular das vias aéreas alcance os alvéolos.

O tecido traqueal e bronquiolar são formados por quatro camadas: camada mucosa (epitélio pseudo-estratificado cilindro ciliado e uma lâmina própria), uma camada submucosa, uma camada de músculo liso com peças cartilaginosas e uma camada adventícia. Existem três tipos comuns de células no epitélio traqueobrônquico: células ciliadas, células caliciformes e células basais (ROSS et al., 1993).

As células ciliadas são encontradas em todo trato respiratório e promovem o batimento ciliar, que visa eliminar a secreção e materiais estranhos a árvore brônquica. As células caliciformes estão localizadas entre as células ciliadas, sua função está relacionada à produção do muco que vem se somar com aquele produzido pelas glândulas submucosas das vias de condução. Existem ainda as células basais que funcionam como fonte de novas células, estando localizadas sobre a lâmina basal.

À medida que os brônquios se ramificam suas paredes vão perdendo gradualmente alguns componentes, daí a ausência de cartilagens e de glândulas submucosas nos bronquíolos da zona de condução. Nestes bronquíolos o epitélio e a musculatura são seus principais componentes. Os bronquíolos respiratórios, presentes na zona de respiração, são constituídos por epitélio cilíndrico ou cúbico. Na porção da traquéia e dos brônquios não ocupadas por lâminas de cartilagem, as paredes são predominantemente formadas por músculo liso, com exceção dos bronquíolos respiratórios que apresentam apenas algumas fibras musculares lisas. O saco alveolar, conjunto de alvéolos, localizado na extremidade distal das vias aéreas da zona respiratória, é responsável pela troca gasosa. As paredes dos alvéolos são delgadas, sendo recobertas basicamente por três tipos de células epiteliais: pneumócitos do tipo I, pneumócitos do tipo II e as células em escova.

A umidade constante das vias aéreas é garantida por uma camada de muco que reveste toda a superfície epitelial. O muco é secretado por células caliciformes isoladas presentes no revestimento epitelial das vias aéreas, e também por pequenas glândulas submucosas. Este muco é removido das vias aéreas por meio do epitélio ciliado presente no nariz e nas vias aéreas inferiores até a zona de condução. A traquéia é revestida por uma mucosa especial chamada mucosa respiratória que apresenta um epitélio estratificado ciliado.

1.2. CONTROLE NEURAL DAS VIAS AÉREAS

O Sistema Nervoso Autônomo atua tanto na broncoconstrição como na broncodilatação das vias aéreas, através dos sistemas parassimpático, via acetilcolina, e simpático, este último via adrenalina liberada pela supra-renal. Esses sistemas exercem essas ações em várias espécies (Van Nieuwstadt et al., 1994). Laitinen et al. (1987), descreveram outro sistema distinto dos sistemas parassimpático e simpático o qual interferia na contratilidade da musculatura lisa das vias aéreas, o chamado sistema não adrenérgico e não colinérgico (NANC). Sendo assim, a inervação das vias aéreas é exercida por quatro classes de nervos autonômicos: nervos colinérgicos, nervos adrenérgicos, nervos excitatórios não adrenérgicos e não colinérgicos e nervos inibitórios não adrenérgicos e não colinérgicos. Van Nieuwstadt et al. (1994) destacaram a existência bem como a diferença quanto a distribuição da densidade dos receptores entre as espécies para os três controles: parassimpático, simpático e NANC.

1.2.1. Controle Parassimpático

A participação colinérgica no controle das vias aéreas é feita principalmente pelas fibras pós-ganglionares do Sistema Nervoso Parassimpático. A inervação parassimpática tem grande e preponderante importância na manutenção do tônus da musculatura lisa das vias aéreas de vários animais (Gross & Skorodin, 1984 e Van Der Velden & Hulsman, 1999). Os gânglios parassimpáticos estão intimamente inseridos nas paredes dos brônquios e bronquíolos, e as fibras pós-ganglionares inervam diretamente a musculatura lisa respiratória, o músculo liso vascular e as glândulas. A ativação dos nervos parassimpáticos tem como consequência a liberação de acetilcolina, resultando por sua vez em broncoconstrição e secreção de muco.

Nas vias aéreas humanas o sistema nervoso parassimpático é a via neuronal dominante no tônus do músculo liso respiratório. A estimulação dos nervos colinérgicos causa broncoconstrição, secreção de muco, e vasodilatação arterial (Minette & Barnes, 1988).

A acetilcolina liberada pelos nervos pós-ganglionares nas vias aéreas atua principalmente sobre receptores colinérgicos muscarínicos tipo M_2 e M_3 . Os receptores M_2 são “auto-receptores”, que medeiam os efeitos de retroalimentação negativa da acetilcolina sobre os nervos colinérgicos. Os receptores M_3 são encontrados no músculo liso brônquico e nas glândulas e medeiam secreção. A estimulação do vago provoca broncoconstrição principalmente das vias aéreas de maior calibre.

1.2.2. Controle Simpático

A inervação simpática na musculatura lisa respiratória é pobre (Van Nieuwstadt et al., 1994). A musculatura lisa das vias aéreas de humanos parece estar isenta de nervos adrenérgicos (Zaagsma et al., 1987). Esta ausência de inervação adrenérgica foi reafirmada por Rang et al. (2001), relatando que a musculatura lisa bronquial não sofre influência do sistema simpático. Richardson (1979) comenta a existência de nervos simpáticos controlando os vasos sanguíneos bronquiais, mas também a sua ausência na musculatura lisa das vias aéreas humanas.

Apesar da inexistência, em seres humanos, ou existência pobre em outros animais, de fibras adrenérgicas na musculatura lisa das vias aéreas, os receptores adrenérgicos (tipo β_2) possui importante papel no relaxamento bronquial, provavelmente através da ativação pela adrenalina circulante. Estes receptores adrenérgicos estão abundantemente presentes na musculatura lisa das vias aéreas de humanos, quando estimulados provocam broncodilatação (Van Der Velden & Hulsmann, 1999).

1.2.3. Controle Não Adrenérgico Não Colinérgico (NANC)

Uma terceira possibilidade de atuação no controle neural da respiração ao nível da musculatura lisa bronquial está presente no chamado Sistema Nervoso Não-adrenérgico Não-colinérgico (NANC) (Barnes, 1986a; Barnes, 1991). Richardson (1979) demonstrou a existência de mecanismos NANC excitatórios e inibitórios nas vias aéreas de animais e seres humanos.

Assim, no sistema NANC existem mediadores ligados ao relaxamento da musculatura lisa bronquial (inibitórios): peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e óxido nítrico (NO); além de mediadores que causam contração da musculatura lisa das vias aéreas (excitatórios): substância P (SP) e neurocinina A (NKA). O mecanismo NANC excitatório e inibitório aparentemente apresenta importante papel na patogênese da asma (Joos et al., 2000).

Os neurônios inibitórios NANC que contém VIP e NO podem ser a única via neural de broncodilatação no sistema respiratório no homem (Fisher et al., 1996,b;Hauser-Kronberger et al., 1996). Esses agentes aparentemente se antepõem e freiam o mecanismo broncoconstritor dos nervos colinérgicos parassimpáticos. Quando comparados indivíduos asmáticos com indivíduos saudáveis, foi detectada uma diferença na resposta inibitória NANC, e em função deste fato, foi proposto que na asma existiria uma disfunção da atividade inibitória dos nervos NANC (Van der Velden & Hulsmann, 1999).

Vale salientar que em adição ao sistema eferente NANC inibitório nas vias aéreas, existe também um sistema nervoso aferente cuja estimulação protege as vias aéreas contra inalantes irritantes, partículas químicas (Barnes, 1991; Lundberg et al., 1983). Esses nervos aferentes NANC participam de uma importante função regulatória das vias aéreas. Sua ativação promove a condução das informações periféricas ao Sistema Nervoso Central resultando, reflexamente, na manutenção da homeostase pulmonar, induzindo broncoconstrição, secreção de muco e tosse (Barnes, 1986a).

Nervos excitatórios NANC foram estudados extensivamente em vias aéreas de animais e foram detectados em vias aéreas de humanos (Lundberg et al., 1984; Joos et al., 1994). Existem relatos que as Fibras-C, não mielinizadas, se caracterizam pela sensibilidade à capsaicina, e estariam localizadas no inferior do epitélio das vias aéreas, ao redor dos vasos sanguíneos, nas glândulas submucosas, na camada de músculo liso e também ao redor local de células glânglionares traqueobronquiais. Quando nervos NANC excitatórios são estimulados, neuropeptídeos são liberados via mecanismo reflexo axonal. Esses neuropeptídeos afetam as funções das vias aéreas, pois contraem o músculo liso respiratório, dilatam as artérias bronquiais, aumentam a permeabilidade vascular, aumentam a produção de muco e modulam a transmissão ganglionar delineando um quadro semelhante ao apresentado na patogênese da asma (Barnes, 1986 a; Barnes et al., 1991; Joos et al., 2000). Em adição esses neuropeptídeos podem influenciar o recrutamento, proliferação e ativação de leucócitos e células inflamatórias residentes no tecido, como os mastócitos (Barnes, 1986a).

O controle neuronal das vias aéreas podem ser anormal em asmáticos e mecanismos neurogênicos podem contribuir para o desenvolvimento da patogênese da asma. Embora não tenha sido detectada alteração no número de nervos sensoriais nas vias aéreas, na asma crônica grave, verificou-se que ocorre um aumento da inervação resultante da ação do epitélio e células inflamatórias através da secreção de fatores de crescimento neuronais (Barnes, 1991).

1.3. ALGUNS ASPECTOS DO PROCESSO ASMÁTICO

1.3.1. Definição e desenvolvimento

A asma é uma doença determinada pela interação de fatores genéticos e ambientais levando a um processo de inflamação crônica e complexa das vias aéreas caracterizada por obstrução variável e reversível (embora não completamente em alguns pacientes) espontaneamente ou com tratamento. A asma também desencadeia hiperreatividade (resposta exagerada das vias aéreas a estímulos não-alérgicos) que envolve a ativação de diversas células inflamatórias e liberação de mediadores inflamatórios (Barnes et al., 1989).

A asma também é caracterizada como sendo uma condição inflamatória crônica das vias aéreas, cuja causa não está completamente elucidada (British Thoracic Society, 1993). Como consequência da inflamação, as vias aéreas tornam-se hiperresponsivas e se estreitam facilmente em resposta a inúmeros estímulos. Isto pode resultar em tosse, sibilos, sensação de opressão torácica e dispnéia, sendo estes sintomas mais comuns à noite. O estreitamento das vias aéreas é geralmente reversível, porém, em pacientes com asma crônica, a inflamação pode determinar obstrução irreversível ao fluxo aéreo. As características patológicas incluem a presença de células inflamatórias nas vias aéreas, exsudação de plasma, edema, hipertrofia muscular, rolhas de muco e descamação do epitélio.

1.3.2.Resposta asmática

Durante as décadas de 70 e 80, muitos trabalhos focalizaram os mecanismo broncoconstritores da asma e nas anormalidades eventualmente apresentadas pela musculatura lisa das vias aéreas de asmáticos. Desta forma, a terapia com broncodilatadores era fortemente empregada (Oates & Wood, 1989). Entretanto, a asma brônquica crônica é caracterizada, além disso, por uma resposta inflamatória acentuada, característica e típica das vias aéreas (Barnes, 1987; Barnes et al., 1989).

Após a provocação induzida por um alérgeno pode-se estabelecer basicamente duas fases na resposta asmática: a reação asmática aguda (resposta que se manifesta precocemente), e a resposta asmática tardia (manifestada algum tempo após o eventual desafio antigênico).

A primeira instala-se rapidamente com um pico de intensidade que se desenvolve em 15 a 30 minutos e cessa dentro de 1 a 3 horas. A reação asmática tardia apresenta intensidade máxima, em seres humanos, cerca de 5 a 8 horas após o estímulo inicial podendo cessar em 24 horas ou persistir por dias ou semanas (Pepys & Hutchcroft, 1975).

1.3.2.1. Resposta asmática precoce

Como já citado, a resposta asmática aguda ou precoce, ocorre em cerca de 15 a 30 minutos, e resulta em broncoconstrição, que se resolve dentro de 1 a 3 horas (Pepys & Hutchcroft, 1975). O estabelecimento do “time-course” da resposta precoce lembra uma reação de hipersensibilidade imediata como a que pode ocorrer normalmente em outros locais. Além disso, o grau de

participação dos mastócitos torna evidente o aumento da ativação destas células, caracterizando-o como sendo o principal evento da asma precoce, tal como ocorre na hipersensibilidade imediata (Holgate et al., 1986).

Existem evidências de que os mediadores liberados pelos mastócitos desempenham papel relacionado com a asma precoce. A provocação das vias aéreas pela inalação do alérgeno está associada com a liberação na circulação periférica de histamina e de fator quimiotático dos neutrófilos de alto peso molecular (Holgate et al, 1985; Howarth et al, 1985). A resposta dos mediadores liberados como consequência do desafio antigênico pode ser inibida pelo pré-tratamento com estabilizadores de membrana como cromoglicato de sódio (Church et al., 1982).

Além da histamina a reação broncoconstritora aguda decorre também da liberação de prostaglandina D_2 (PGD_2) e leucotrieno C_4 (LTC_4) principalmente pelos mastócitos. As ações espasmogênicas da histamina levam a broncoconstrição, enquanto que a PGD_2 e o LTC_4 , juntamente com seus metabólitos, ampliam a reação em intensidade e duração (Holgate et al., 1991). Nesta fase, não é observado edema, sendo a contração da musculatura lisa o principal mecanismo causal da obstrução pulmonar (Jeffries et al., 1981).

Os mastócitos não são as únicas células que são ativadas e que liberam mediadores quando da inalação do alérgeno. Os macrófagos (Joseph et al., 1980), eosinófilos (Capron et al., 1981) e plaquetas (Joseph et al., 1983) também possuem receptores para Imunoglobulina E (IgE). Certamente, os macrófagos e as plaquetas parecem ser ativados após desafios seguidos com alérgenos (Hutson, 1989).

1.3.2.2. Resposta asmática tardia

Nos últimos 30 anos, as respostas asmáticas tardia, conseqüentes ao desafio induzido pelo alérgeno, vêm sendo cada vez melhor compreendidas. Em 1970, Altounyan observou que após a inalação do alérgeno ocorria gradual aumento da resposta bronquial para histamina. Posteriormente Cockcroft et al., (1977), observaram o mesmo para a metacolina e demonstraram que esta hiperreatividade bronquial poderia ser correlacionada com a resposta asmática tardia.

Em situações experimentais, o desafio antigênico provoca a resposta asmática tardia em aproximadamente 50% dos pacientes (Pepys, 1977). O fator que determina a reação alérgica diminui após uma resposta imediata ou avança para uma resposta asmática tardia. Estas evidências sugerem que o nível de anticorpos IgE circulantes pode ser o fator preponderante, pois a resposta tardia ocorre com maior probabilidade em indivíduos com alto grau de sensibilização ao alérgeno (Robertson et al., 1974). A magnitude da resposta precoce e, portanto o nível de reatividade das vias aéreas parece também ser importante no desenvolvimento subsequente da resposta tardia (Hargreave et al., 1974). Pacientes asmáticos com alta reatividade nas vias aéreas tem mais probabilidade de desenvolver a resposta asmática tardia.

A formação de edema e o aumento na produção de muco são características encontradas com freqüência na asma tardia. Ocorre infiltração celular de grande magnitude pelos mediadores que induzem quimiotaxia destacam-se o leucotrieno B₄ (LTB₄), o fator de ativação plaquetária (PAF), a interleucina 5 (IL-5) e o fator quimiotático para linfócito (Rand et al., 1990).

Diversos trabalhos detectaram a presença de células inflamatórias no fluido do lavado bronco alveolar após um desafio antigênico. De Monchy et al. (1985), demonstraram a presença destas células no lavado bronco alveolar de humanos durante a resposta asmática tardia (6 a 7 horas após a inalação do alérgeno). Estes pesquisadores verificaram ainda que o número de eosinófilos estava aumentado no lavado e que as outras células inflamatórias não apresentavam alterações significativas. Porém outros pesquisadores evidenciaram que não somente os eosinófilos, mas também o número de neutrófilos e linfócitos encontrava-se aumentado no fluido do lavado bronco alveolar durante a resposta asmática tardia (Diaz et al., 1986; Metzger et al., 1987).

Assim a inflamação parece ser fundamental para o desenvolvimento do processo asmático em seres humanos. Existem evidências de que os granulócitos interagem com o epitélio da vias aéreas e com as células endoteliais produzindo regionalmente mediadores como o PAF e LTs. Tais mediadores, juntamente com a lesão da mucosa provocada pelo processo inflamatório, levam a um incremento da resposta broncoconstritora da musculatura lisa para diversos estímulos (Leff et al., 1991).

Na resposta asmática tardia ocorre edema da mucosa, aumento da secreção e outros efeitos inflamatórios, que podem ser resultantes da liberação de produtos de células inflamatórias que se acumularam nas vias aéreas. Eosinófilos e neutrófilos parecem ser as células predominantes na resposta tardia em humanos e ambas as células tem capacidade de produzir mediadores pró-inflamatórios os quais podem contribuir para o desenvolvimento da resposta tardia da asma. Está claro que existe uma grande variedade de tipos celulares e mediadores que contribuem de forma importante

para o desenvolvimento da resposta asmática tardia. Provavelmente, são os responsáveis pela broncoconstrição e pelo desenvolvimento de uma hiper-reatividade inespecífica cuja associação com a resposta asmática tardia ainda não é muito bem compreendida (Hutson, 1989).

1.3.3. Abordagem terapêutica da resposta asmática

A asma é uma doença complexa, multifatorial e se manifesta de forma diferente nas várias idades. Múltiplas abordagens são necessárias para o seu controle, todas passando, pela compreensão do paciente acerca de sua doença, possibilitando assim um manuseio mais seguro. A asma pode ser controlada na grande maioria dos casos, embora não possa ser curado, sendo o tratamento inapropriado um fator importante na morbidade e mortalidade da doença.

O objetivo do tratamento é a melhoria na qualidade de vida, através de um constante monitoramento, buscando a cessação das crises de broncoespasmo, redução nas internações hospitalares e visitas a serviços de emergência, a tolerância normal ao exercício com manutenção dos níveis normais de atividade, provas de função respiratória normais, a redução e mesmo a interrupção do uso de broncodilatadores, a ausência de efeitos colaterais decorrentes do tratamento, a prevenção do desenvolvimento da limitação irreversível do fluxo aéreo, e a prevenção da mortalidade da asma.

A educação do paciente acerca de sua doença é essencial, tendo como objetivos conseguir que cooperem com o tratamento e reduzam a ansiedade diante da doença. A estratégia farmacológica do tratamento da

asma apresenta dois objetivos: 1) promoção da broncodilatação quando necessário e 2)atenuação e/ou supressão da inflamação das vias aéreas.

1.3.3.1. Broncodilatadores

As drogas utilizadas como broncodilatadores incluem: as xantinas, os agonistas dos receptores β_2 -adrenérgicos e os antagonistas colinérgicos muscarínicos.

1.3.3.1.1. Xantinas

Existem três metilxantinas de ocorrência natural farmacologicamente ativas: a teofilina, a teobromina e a cafeína. Em geral, a xantina utilizada em medicina clínica é a teofilina (1,3-dimetilxantina), que também pode ser utilizada como teofilina-etileno-diamina, conhecida como aminofilina.

Há mais de cinquenta anos, a aminofilina foi introduzida como terapêutica para as exarcebações da asma (Segal et al., 1949). Durante longo tempo foi utilizada no tratamento agudo do broncoespasmo. Sua importância, entretanto, vem declinando ao longo da última década, apesar do reconhecimento recente de seus efeitos imunomoduladores e antiinflamatórios (Weinberger & Hendeles, 1996.)

1.3.3.1.2. Agonistas beta-adrenérgicos

O músculo liso das vias aéreas não apresenta significativa inervação adrenérgica direta. A broncodilatação adrenérgica e outros efeitos β -

adrenérgicos na asma são mediados via estimulação de β -receptores pelas catecolaminas circulantes.

Os receptores adrenérgicos são membros da superfamília de receptores cujo sinal para o interior da célula ocorre via proteína G. É reconhecido que estes receptores são divididos em dois grupos, denominados α e β . Sendo que os receptores tipo β subdividem-se em três grupos distintos : β_1 , β_2 , β_3 .

Os β -receptores encontrados nos pulmões de humanos são predominantemente do tipo β_2 (70%), sendo encontrados na superfície muscular, epitélio, glândulas serosas e mucosas, pneumócitos e músculo liso vascular, enquanto que os β_1 (30%) nas paredes alveolares. Nos brônquios de pacientes asmáticos os β -receptores são também encontrados nos macrófagos e em uma variedade de células recrutadas durante o processo inflamatório incluindo linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos.

Os β_2 -agonistas são substâncias broncodilatadoras que ativam diretamente os β_2 -receptores das células da musculatura lisa das vias aéreas, acoplados a proteína-G. As interações das proteínas G com as enzima-alvo têm conseqüências complexas, levando à produção de outras moléculas sinalizadoras intracelulares como o 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e o cálcio.

O relaxamento muscular é determinado pelo AMPc através da ativação da enzima proteína-quinase dependente de AMPc (quinase-A). Quando ativada a proteína-quinase A (PKA) resulta na fosforilação de várias proteínas alvo, selecionadas no interior da célula, determinando relaxamento por: redução da concentração do íon cálcio celular. Ocorre a remoção ativa do

ion cálcio para os depósitos intracelulares do retículo endoplasmático e outras organelas. Por consequência ocorre os seguintes eventos: desvio da quinase de cadeia leve da miosina para sua forma menos ativa por inibição direta; inibição da hidrólise do fosfoinositideo; abertura do canal de grande condutância, potássio cálcio-ativado , que repolariza o músculo liso e que também pode estimular o seqüestro de cálcio para os depósitos intracelulares (Bai et al., 1997).

Os broncodilatadores são as substâncias mais importantes no tratamento da asma aguda e na profilaxia da asma induzida por esforço. Embora a broncodilatação seja sua principal ação, há evidências de que os β -agonistas apresentem alguma ação antiinflamatória decorrente da supressão da ativação dos leucotrienos e liberação de histamina dos mastócitos (Hughes et al., 1983). Broncodilatadores como o salbutamol, a terbutalina, o fenoterol e outros menos utilizados como o pirbuterol, reproterol, rimiterol, também β_2 -seletivos, apresentam início de ação em 1 minuto, pico de ação aos 45 minutos aproximadamente, com efeitos que podem persistir por três a quatro horas. Drogas mais modernas como o salmeterol e o formoterol apresentam ação broncodilatadora com duração de ação de 12 horas ou mais (Faulds et al., 1991), protegendo assim contra a broncoconstrição por períodos mais prolongados.

Durante longo tempo, os broncodilatadores ocuparam a principal posição no tratamento da asma, fosse ela precoce ou tardia. Com o melhor entendimento de sua fisiopatologia a qual envolve inflamação crônica, passaram a ser utilizado atualmente apenas para alívio da crise aguda.

Broncodilatadores como o salbutamol, a terbutalina, o fenoterol e outros menos utilizados como o pirbuterol, reproterol, rimiterol, também β_2 -seletivos, apresentam início de ação em 1 minuto, pico de ação aos 45 minutos, com efeitos que persistem por três a quatro horas quando usada por inalação, porém com menor tempo de ação quando de asma severa.

Drogas mais modernas como o salmeterol e o formoterol apresentam ação broncodilatadora com duração de ação de 12 horas ou mais (105), protegendo contra a broncoconstrição por período similar.

Durante longo tempo os broncodilatadores ocuparam a principal posição no tratamento da asma. Com o melhor entendimento de sua fisiopatologia decorrente de inflamação crônica, passaram a um plano secundário, sendo utilizados atualmente somente para alívio da crise aguda.

1.3.3.1.3. Antagonistas dos receptores muscarínicos

O controle neuro-humoral das vias aéreas em condições normais é exercido principalmente pelas vias eferentes constituídas pelos nervos parassimpáticos que liberam acetilcolina a qual vai agir sobre os receptores colinérgicos muscarínicos. Todos os receptores muscarínicos pertencem à família de receptores acoplados à proteína G. Foram detectados cinco tipos distintos de receptores muscarínicos M_1 , M_2 , M_3 , M_4 e M_5 , porém apenas quatro foram bem caracterizados e distinguidos ao nível funcional e farmacológico (Gross et al., 1984). Os receptores M_1 , M_3 e M_5 atuam através da via do fosfato de inositol, enquanto que os receptores M_2 e M_4 exercem ação ao inibir a adenilatociclase, reduzindo o AMPc intracelular.

Estão presentes nas vias aéreas os receptores do tipo M_2 e M_3 . Os receptores M_2 medeiam a inibição pré-sináptica, inibindo a liberação de acetilcolina nos nervos colinérgicos (retroalimentação negativa). Os receptores M_3 produzem principalmente efeitos excitatórios, isto é, estimulam as secreções glandulares (salivares, brônquicas) e a contraem a musculatura lisa, sendo os responsáveis pela broncoconstrição provocada pela estimulação do vago.

Existe uma longa história quanto ao uso de agentes anticolinérgicos no tratamento da asma. Os antagonistas muscarínicos relaxam a musculatura lisa bronquiolar por impedir que a acetilcolina liberada pelo neurônio pós-ganglionar parassimpático se ligue ao receptor muscarínico localizado na musculatura lisa das vias aéreas.

Com o aparecimento de agonistas beta-adrenérgicos administráveis pela via inalatória o uso de agentes anticolinérgicos declinou. No entanto, ocorreu renovado interesse quando da descoberta do fato de que as vias parassimpáticas são particularmente importantes no broncoespasmo em alguns pacientes asmáticos, e também pela disponibilidade do brometo de ipratrópio, um agente anticolinérgico quaternário que tem propriedades farmacológicas e terapêuticas superiores à dos agentes anteriores.

O brometo de ipratrópio é um composto de amônio quaternário com propriedades anticolinérgicas (parassimpaticolíticas). Em estudos pré-clínicos, ficou demonstrado que este medicamento parece atuar na inibição do reflexo vagal, antagonizando a ação da acetilcolina. O efeito broncodilatador obtido após a inalação do brometo de ipratrópio é basicamente local e específico para o pulmão, não tendo portanto, um componente de natureza sistêmica (Rodrigo et al., 1999).

Em estudos controlados durante 90 dias em pacientes com broncoespasmo associado à doença pulmonar obstrutiva crônica foi observada uma significativa melhora na função pulmonar dentro de 15 minutos, alcançando o pico em 1 a 2 horas e persistindo, na maioria dos pacientes, até 6 horas. Nesse mesmo estudo, em pacientes com broncoespasmo associado à asma, foi observada uma significativa melhora na função pulmonar em 40% dos pacientes estudados (Rodrigo et al., 1999). Estudos pré-clínicos e clínicos sugerem ainda que o brometo de ipratrópio não possui efeitos prejudiciais sobre a secreção mucosa das vias aéreas, o *clearance* mucociliar e a troca gasosa (Guleria et al., 2003).

Com relação a farmacocinética, o brometo de ipratrópio apresenta absorção muito rápida após inalação oral. O pico da concentração plasmática é alcançado em poucos minutos após a inalação. Sua biodisponibilidade sistêmica, após a inalação, é de cerca de 7% da dose. Os metabólitos principais encontrados na urina ligam-se fracamente aos receptores muscarínicos. A excreção renal do ipratrópio é de 46% da dose após administração endovenosa e de 8% após inalação de aerosol. Menos de 20% da droga liga-se às proteínas plasmáticas. O íon ipratrópio não atravessa a barreira hemato-encefálica, por apresentar em sua estrutura a amina quaternária (Duist, 1989).

A toxicidade aguda do brometo de ipratrópio foi investigada em várias espécies de roedores e não-roedores, com período de observação de 14 dias. A dose letal mínima administrada por inalação foi de 199mg/kg em ratos, em intervalos de 4 ou 6 horas ao dia. Não foram detectados potencial

mutagênico ou efeitos tumorigênicos ou carcinogênicos em estudos “in vitro” em bactérias e em longo prazo em camundongos e ratos.

A variabilidade na resposta de pessoas asmáticas ao ipratrópio provavelmente reflete diferenças na força do tônus parassimpático e no grau em que uma ativação reflexa das vias colinérgicas participa na indução de sinais e sintomas em um dado paciente. Uma meta análise avaliou a utilidade do brometo de ipratrópio administrado junto a agonistas beta-adrenérgicos no tratamento do ataque agudo de asma, na melhoria da função pulmonar e redução da taxa de hospitalizações. A dose típica de brometo de ipratrópio utilizada nesta avaliação foi de 0,5mg em conjunto com um agonista beta-adrenérgico. Foram administrados imediatamente após o paciente chegar ao serviço de emergência. Os efeitos foram comparados com a administração de placebo em associação com o mesmo agonista adrenérgico. O uso concomitante de brometo de ipratrópio melhorou aproximadamente em 10% a função pulmonar em comparação com o agonista adrenérgico associado a placebo (Rodrigo, 1999).

1.3.3.2. Antiinflamatórios

Como a asma brônquica é considerada uma doença inflamatória crônica, o controle farmacológico da doença teve o seu enfoque direcionado para as drogas inalatórias antiinflamatórias. Os antiinflamatórios mais potentes são os corticóides, únicos capazes de reverter a inflamação das vias aéreas (Adelroth et al., 1990). Mesmo em pacientes com asma leve, os corticóides inalados são superiores aos beta-agonistas em uso regular (Mygind & Clark, 1980).

Para o tratamento tópico da rinite e asma, a primeira droga utilizada em grande escala foi o dipropionato de beclometasona (Brown et al., 1972). Posteriormente outros medicamentos surgiram como o valereato de betametasona, o acetono de triancinolona, a flunisolida, a budesonida, o propionato de fluticasona e o furoato de mometasona.

Na década de 1950, muitos projetos buscavam medicamentos para serem utilizados na asma quer por ação broncodilatadora quer pela atividade antiinflamatória. A primeira substância investigada foi o cromoglicato de sódio que surgiu a partir de estudos da *khellinem* uma substância de origem natural previamente conhecida, obtida de uma planta selvagem chamada *Ammi visnaga* (*Umbelliferae*), encontrada na região mediterrânea com ação diurética e propriedade antiespasmódica muscular, utilizada como droga coronariodilatadora.

Em 1965 foi descrita pela primeira vez sua propriedade protetora contra a obstrução brônquica antígeno-induzida. Nesta ocasião foi lançado no mercado com a indicação principal direcionada para o tratamento de jovens com evidências de asma de causa alérgica. O cromoglicato de sódio (cromolina sódica) foi a primeira medicação a ser introduzida exclusivamente para prevenção dos sintomas da asma, tendo ocorrido a extensão para o tratamento da rinite em 1971. Em 1986 ocorreu o lançamento de outra droga do grupo das cromonas, o nedocromil sódico, com maior potência que o cromoglicato.

A cromolina e o nedocromil diferem estruturalmente, porém acredita-se que compartilhem um mecanismo comum, isto é, uma alteração na função dos canais de cloreto retardados na membrana celular, inibindo a ativação celular (Barnes, 1993). Como decorrência da não desgranulação dos mastócitos ocorre inibição da liberação dos mediadores inflamatórios e

citocinas, bem como inibição da produção de leucotrienos, reduzindo também a ativação e a migração de eosinófilos através da inibição do PAF e LTD4 (Rand et al., 1990). Os mecanismos de ação, entretanto, não estão totalmente elucidados.

1.3.4. Modelos animais de asma

A evolução nos estudos dos mecanismos envolvidos na patogênese da asma surgiu principalmente, a partir de trabalhos realizados experimentalmente com animais. Existe uma grande diversidade de modelos experimentais os quais são utilizados visando mimetizar as alterações observadas durante o desenvolvimento do processo asmático. Na maioria, estes modelos basicamente consistem do procedimento de imunização antigênica associado a vários estímulos (Jancar et al., 1997). Assim, podemos estudar “*in-vitro*” e “*in-vivo*” a resposta do antígeno, ao nível das vias aéreas, em modelos animais onde a sensibilização a um determinado alérgeno leva ao desenvolvimento de processo inflamatório similar ao encontrado em pulmões de asmáticos.

Em 1983, Abraham et al., descreveram um modelo de resposta asmática tardia em ovelhas o qual consistia na sensibilização com *Ascaris suum*, onde se desenvolvia nas vias aéreas uma obstrução precoce seguida de uma obstrução tardia conseqüente ao desafio antigênico pela via inalatória. Neste modelo, a obstrução das vias aéreas foi maior durante a resposta precoce do que na resposta obstrutiva tardia. Este resultado, na realidade, é o oposto do que ocorre com a resposta obstrutiva asmática no homem. A resposta tardia neste modelo estava associada ao desenvolvimento do

aumento da reatividade contrátil das vias aéreas. A desgranulação dos mastócitos pelo composto 48/80 também foi capaz de produzir a resposta precoce e tardia em ovelhas, sugerindo que, nestes animais ambas as respostas eram dependentes da liberação de mediadores derivados dos mastócitos(Rossi et al., 1984).

A resposta asmática tardia foi descrita e estudada em um modelo desenvolvido em coelhos por Shampain et al. (1982). Os coelhos foram inicialmente imunizados através de injeções intraperitoniais de *Alternaria tenius*, em dois momentos, 24 horas após o nascimento, onde ocorre a produção preferencial do anticorpo IgE para este antígeno, e com 7 dias após o nascimento, levando a produção de IgE e IgG. Após o desafio dos dois grupos através da inalação de *Altemaria tenius*, foi observado que mesmo os coelhos que produziram preferencialmente apenas IgE desenvolveram obstrução precoce e tardia das vias aéreas. Os resultados obtidos sugeriram que IgE antígeno-específicas é necessária para iniciar o processo de desenvolvimento da asma tardia induzida pelo antígeno e que a IgG antígeno-especifica não estava associada ao processo asmático tardio (Behrens et al., 1984).

Carvalho et al. (1999) evidenciaram em estudos histopatológicos que a imunização de camundongos através do implante de um pequeno fragmento de ovo de galinha no tecido subcutâneo produzia infiltração de eosinófilos ao nível peribrônquico, perivascular e intraepitelial do tecido pulmonar desses animais. Em estudos realizados por Sasaki et al. (1987) ficou demonstrado que cachorros pré-tratados com metirapone, um inibidor da síntese de cortisol, e sensibilizados com *Ascaris suum* apresentaram tanto a reação de fase aguda como a resposta tardia. Nos cachorros que exibem a

resposta tardia, foi observado aumento dos neutrófilos no lavado bronco-alveolar bem como acúmulo de neutrófilos no interior das paredes bronquiolares.

Macacos sensibilizados por inalação de *Ascaris suum* desenvolviam uma resposta asmática tardia após serem submetidos ao desafio antigênico. A análise do lavado bronco-alveolar, após o desafio, revelou aumento significativo no percentual de neutrófilos e eosinófilos (Wegner et al., 1987).

O modelo imunológico de indução de obstrução das vias aéreas pela administração do alérgeno é freqüentemente utilizado em cobaias. A reação anafilática é severa, podendo até ser letal, em cobaias ativamente sensibilizadas que sofrem desafios com o antígeno específico (Hutson, 1989). Esta reação foi descrita pela primeira vez em 1910 por Auer e Lewis e estava associada a uma severa broncoconstrição. Em 1989, Pretolani et al., e em 1993, Capaz et al., sensibilizaram ativamente cobaias com injeções subcutâneas de solução de ovoalbumina. Após duas semanas era repetido a aplicação do antígeno (reforço), e sete a dez dias após a segunda injeção os animais eram sacrificados para a realização dos experimentos.

Outro modelo animal utilizado na investigação do processo asmático é a sensibilização antigênica mais freqüente com ovoalbumina em ratos Wistar (Bellofiore & Marin, 1988; Watanabe & Mishima, 1990). A provocação das vias aéreas com ovoalbumina, nesta situação, leva claramente ao aparecimento das duas fases aguda e tardia (Lissen et al., 1991; Martin et al., 1993; Viana & Garcia-Leme, 1995).

1.3.5. Supersensibilidade pré e pós juncional

Em 1949, Cannon estabeleceu o termo supersensibilidade para o fenômeno obtido com a desnervação diferenciando-o da hipersensibilidade, que é um fenômeno de origem imunológica. Em 1961, Cânon & Rosenblueth demonstraram que seccionando neurônios motores eferentes, da musculatura estriada se obtém maior irritabilidade na estrutura innervada, quando isolada, sendo mais expressivo este aumento na região da placa motora.

A obtenção e detecção de supersensibilidade pode ser conseguida por métodos cirúrgicos (desnervação e descentralização) e farmacológicos (tratamento com cocaína, reserpina, 6-hidroxiopamina, bloqueadores ganglionares ou bloqueadores de receptores)(Trendelenburg et al., 1962).

Analisando a supersensibilidade que é obtida para as aminas simpaticomiméticas Trendelenburg (1963) postulou a divisão desse fenômeno em dois tipos. O primeiro pode ser produzido pela cocaína e a sua principal característica é a grande especificidade para a noradrenalina (NA) e outras aminas simpaticomiméticas, estruturalmente relacionadas com a NA. Este tipo de supersensibilidade independe de tempo para sua obtenção e está ligado à mecanismos que aumentam o agonista na fenda pós-sináptica. O segundo tipo de supersensibilidade pode ser obtido por procedimentos como a desnervação, a descentralização e por procedimentos farmacológicos que alteram a eficiência da neurotransmissão como bloqueadores farmacológicos. Este tipo de supersensibilidade é inespecífico, ocorre para vários agonistas, e dependente de tempo para sua instalação.

Em 1966, Trendelenburg introduziu os termos pré-sinápticos, para indicar a supersensibilidade obtida com o emprego da cocaína, e pós-sináptico, para indicar o aumento de sensibilidade após desnervação, descentralização e reserpinação crônica. O termo pré-sináptico impõe que alguma alteração localizada no componente neuronal da junção efetuada é responsável pelo fenômeno de supersensibilidade, enquanto que o termo pós-sináptico, indica que alguma alteração ocorreu no componente efetuator (células musculares lisas, glândulas, tecido cardíaco, etc.) decorrente de modificações anátomo-funcionais dos elementos neuronais. Neste contexto o termo supersensibilidade pós-sináptica indica a chamada verdadeira supersensibilidade, isto é, aquela decorrente de uma alteração da resposta a qualquer estímulo aplicado ao sistema efetuator.

Em 1972, Flemming et al. demonstraram que a diminuição do contato do mediador excitatório com o seu receptor seria o principal fator que desencadearia alterações no tecido onde se localiza este receptor, as quais seriam responsáveis pela resposta mais acentuada que o mesmo apresentava quando estimulado. Este aumento de resposta demonstra a natureza adaptativa tanto da membrana das células como também dos mecanismos de transdução de sinal intracelular à concentração de mediadores excitatórios.

Considerando que as junções neuro-efetadoras periféricas não representam verdadeiras “sinapses”, termo reservado para indicar a continuidade entre neurônios, Flemming et al (1973) sugeriram o uso das denominações pré-juncional e pós-juncional para substituir aqueles propostos por Trendelenburg (1966). Flemming et al.(1973) consideraram que a supersensibilidade pós-juncional é idêntica à supersensibilidade pós-sináptica e corresponde à supersensibilidade por desuso, termo proposto por Sharpless

(1964), para indicar o aumento de sensibilidade quando o fenômeno ocorria ao nível do SNC.

Como prováveis mecanismos da supersensibilidade pós-juncional temos: aumento no número de receptores caracterizado no músculo esquelético e SNC, mas não na musculatura lisa (Thesleff, 1974); alteração de propriedades eletrofisiológicas da membrana, por exemplo, despolarização parcial da membrana (Urquilla & Flemming, 1975); aumento no número de conexões entre as células musculares lisas a desnervação aumentaria o número de nexus (Goto et al., 1976); modificações na disponibilidade de cálcio, aumento na permeabilidade e/ou na retenção da membrana ao cálcio (De Moraes, 1976); alterações ao nível da transdução do sinal farmacológico (dismukes & Daly, 1975).

Mais recentemente várias situações tem sido associadas ao fenômeno de supersensibilidade como desmostraram Ikeno et al. (2000) ao realizarem o pré-tratamento com o composto AF64A, inibidor da captação de colina nas terminações nervosas parassimpáticas, e obter um aumento de resposta contrátil, supersensibilidade no músculo liso da íris de rato. Flemming (1999) obteve SS ao utilizar a ação inibitória de opióides nos neurônios tipo S do plexo mioentérico de cobaias. Ma et al. (1998) observaram que a ovariectomia induz supersensibilidade a histamina e serotonina em aorta isolada de coelha, sendo este processo revertido quando administrado nas coelhas 17beta-estradiol.

A nebulização de medicamentos com a ação broncodilatadora para o tratamento de crises asmáticas é freqüentemente utilizada tanto em ambiente hospitalar como comunitário. A resposta com esta terapia é rápida devido a ação imediata sobre a árvore respiratória. Os broncodilatadores mais

comuns que apresentam forma farmacêutica para serem nebulizados são os agonistas β_2 adrenérgicos (fenoterol) e antagonistas muscarínicos (brometo de ipratrópio).

O emprego de drogas anticolinérgicas, por nebulização promove o alívio imediato das crises asmáticas. O uso crônico destas drogas, no entanto, segundo o exposto acima, poderia eventualmente desencadear uma resposta adaptativa ao nível das vias respiratórias, principalmente após o tratamento crônico. Esta adaptação poderia ser detectada quando da interrupção abrupta do tratamento. Em função dessas evidências e com a intenção de testar esta hipótese, estudamos no presente trabalho a responsividade das vias aéreas, mais especificamente, a resposta contráctil da traquéia isolada, um modelo clássico para este estudo (Sekizawa et al., 1993), após o tratamento crônico e a retirada abrupta de brometo de ipratrópio, um dos senão, o antagonista colinérgico mais utilizado no tratamento da asma.

Em função da curta meia vida desta droga, a administração deve ser feita com intervalos de 4/4 horas, o que dificulta sobremaneira o desenvolvimento de um modelo para o estudo em questão. Assim com esta finalidade construímos também, paralelamente, um sistema para administração de drogas pela via inalatória, com controle de tempo computadorizado. Este sistema permitiu que a administração do brometo de ipratrópio fosse feita precisamente de 4 em 4 horas e sem necessitar da presença do experimentador.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

- ◆ Detectar as alterações da retirada abrupta de brometo de ipratrópio, após tratamento crônico, na contratilidade de traquéias isoladas de ratos.

Objetivos específicos

- ◆ .Analisar, ao longo do tempo, os efeitos da retirada abrupta de brometo de ipratrópio após tratamento crônico, na resposta contráctil de traquéias isoladas de ratos ao carbacol, serotonina, potássio e estímulo elétrico.
- ◆ Evidenciar, se as alterações de contratilidade traqueal detectadas, também se manifestam em animais sensibilizados e desafiados a ovoalbumina.
- ◆ Verificar a participação dos canais de cálcio nas alterações de contratilidade detectadas em traquéias isoladas de ratos submetidos à retirada abrupta após tratamento crônico com brometo de ipratrópio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Animais

Em todos os experimentos realizados, foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar) machos com peso entre 200 e 250 g no início dos experimentos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará localizado no Campus do Pici e dos Biotérios Setoriais do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram alojados, divididos em grupos de cinco por gaiola, e assim mantidos durante uma semana para ambientação. O manuseio dos animais consistiu em limpeza diária das gaiolas e fornecimento “ad libitum” de água e ração em pellets.

3.1.2. Soluções e drogas utilizadas

- Brometo de ipratrópio (Atrovent®, Boehringer Ingelheim do Brasil)
- Carbacol (Sigma Chemical Co.)
- Cloreto de Cálcio (Quimibrás Ind. Químicas S.A.)
- Cloreto de potássio (Merck S.A. Ind. Químicas)
- Hidróxido de Alumínio (Sanofi Winthrop Farmacêutica Ltda.), Rio de Janeiro, RJ
- Ovoalbumina (Sigma Chemical Co.)

- Serotonina (Sigma Chemical Co.)
- Solução Fisiológica 0,9% (NaCl 9g/1l)
- Solução de Krebs-Henseleit (mMol/l): NaCl 113,0; KCl 4,7; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; KH_2PO_4 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; NaHCO_3 25,0; Glicose 11,0
- Solução de Krebs-Henseleit sem cálcio (mMol/l): NaCl 113,0; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; NaHCO_3 25,0; Glicose 11,0.

3.1.3. Equipamentos utilizados

- Balança para pesagem de animais, modelo ID-1500 (Filizola)
- Balança Analítica (A&D Company, Modelo 50004)
- Bomba de aquecimento com temperatura controlada (Haake)
- Cronômetro (Cassio)
- Estimulador elétrico (Grass, modelo S48K)
- Nebulizador ultrassônico (US-1000, ICEL, São Paulo, Brasil)
- Programa MicroCal Origin v.2.94
- Sistema de aquisição de dados acoplado a um microcomputador com programa gráfico (ambos desenvolvidos no laboratório).
- Transdutor isométrico (Narco Biosystems Co., modelo F60)
- Temporizador automático RoDetla (T-1600)

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Tratamento crônico com Brometo de ipratrópio (BI)

3.2.1.1. Sistema de inalação

Foi elaborado e utilizado um sistema de inalação desenvolvido no Laboratório de Farmacologia do Aparelho Respiratório (LAFAR). Este sistema consistia em uma caixa de acrílico medindo 40 x 40 x 15 cm (câmara de inalação). Esta caixa possuía uma tampa removível que permite a introdução e remoção dos animais. Nos cantos da porção superior (tampa) existiam dois grandes orifícios aos quais foram acoplados dois ventiladores (“coolers” de computador) visando manter a aeração. Os dois ventiladores foram colocados de tal maneira que um jogava para dentro, e o outro retirava o ar da câmara, funcionando, portanto, este último como exaustor. Nas porções laterais da caixa existiam dois orifícios: um através do qual era oferecida água aos animais através de um bebedouro, e outro para o acoplamento do nebulizador (Figura 1).

O nebulizador e os ventiladores foram ligados à rede elétrica através de um temporizador permitindo que fossem feitas nebulizações com duração e em períodos determinados ao longo do dia, sem a presença do experimentador. O temporizador automático, no momento da inalação, provocava a desativação da ventilação artificial e acionava o nebulizador, mantendo-o ligado pelo intervalo de tempo pré-estabelecido, e ao fim do processo reativava a ventilação até o momento do início do próximo ciclo (Figura 2).

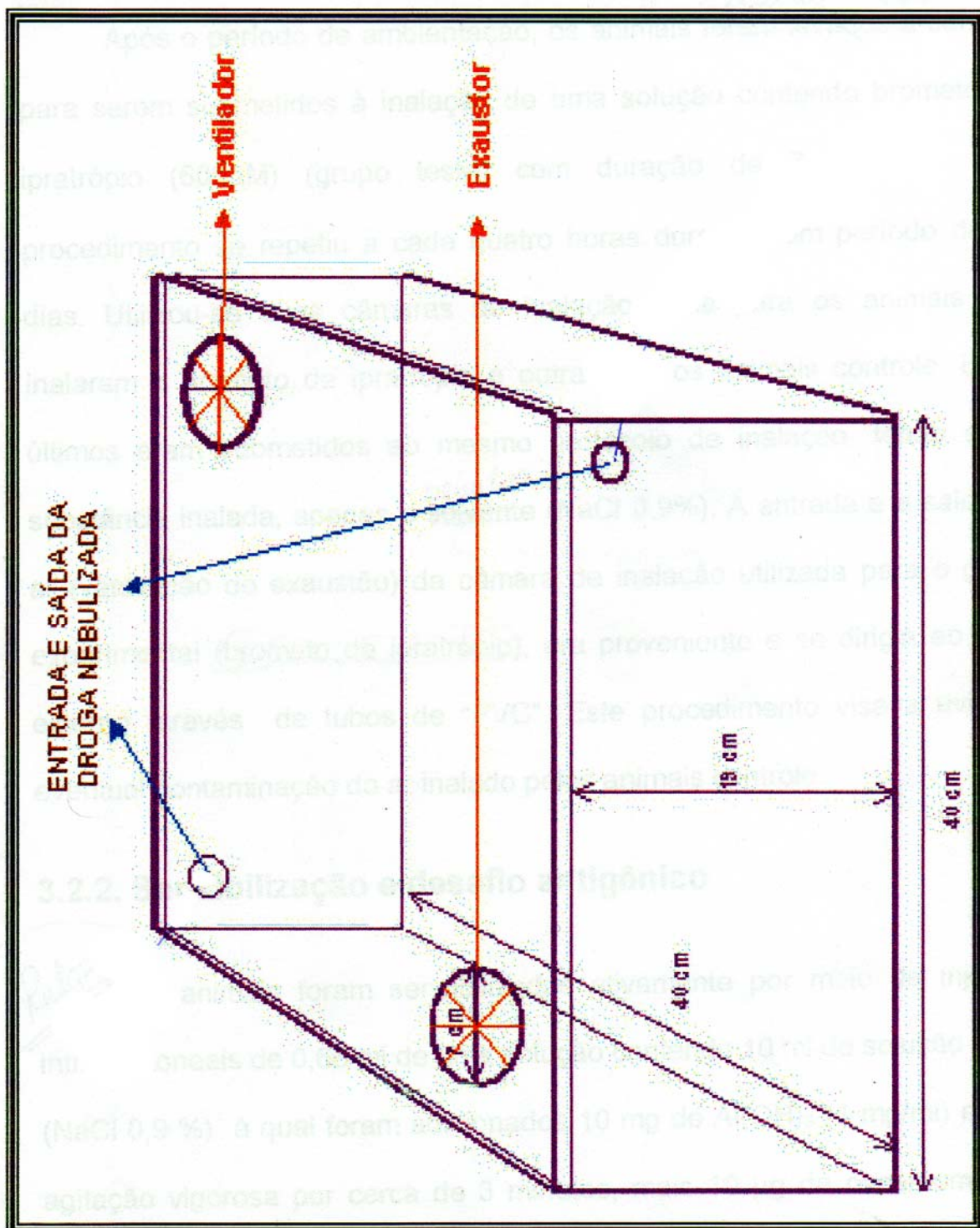


Figura 1: Câmara de inalação

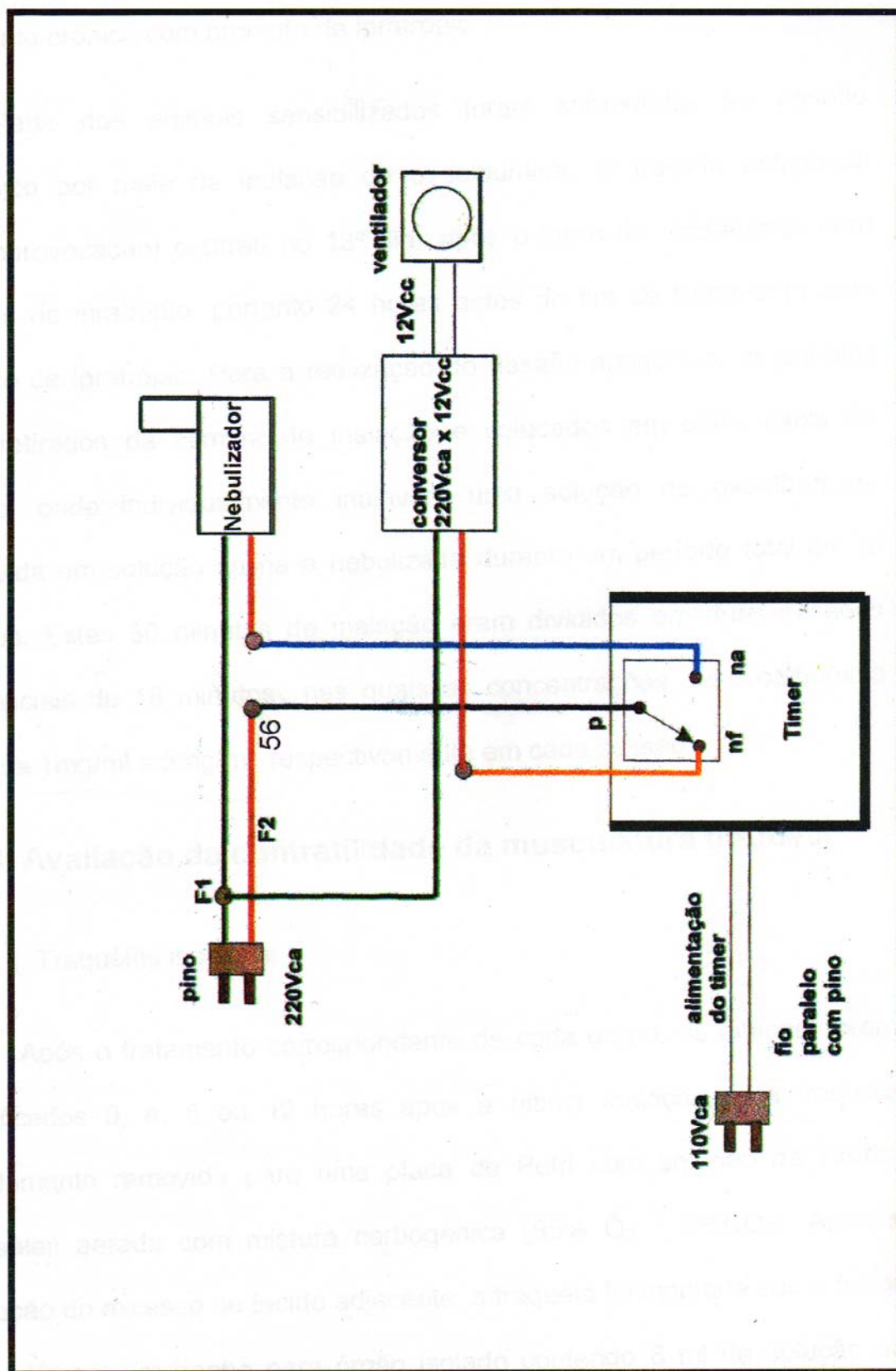


Figura 2: Esquema do circuito elétrico utilizado para controlar temporalmente o sistema de inalação.

3.2.1.2. Administração crônica do BI.

Após o período de ambientação, os animais ficaram na câmara para serem submetidos à inalação de uma solução contendo brometo de ipratrópio (600 μ M) (grupo teste) com duração de 7 minutos. Este procedimento se repetiu a cada quatro horas durante um período de 14 dias. Utilizaram-se duas câmaras de inalação, uma para os animais que inalaram o brometo de ipratrópio e outra para os animais controle, os quais eram submetidos ao mesmo protocolo de inalação, tendo como substância inalada apenas o veículo (NaCl 0,9%). A entrada e a saída de ar (ventilação de exaustão) da câmara de inalação utilizada para o grupo experimental era proveniente e se dirigia ao meio externo através de tubos de "PVC". Este procedimento visava evitar a eventual contaminação do ar inalado pelos animais controle.

3.2.2. Sensibilização e desafio antigênico

Os animais foram sensibilizados ativamente por meio de injeções intraperitoneais de 0,66 ml de uma solução contendo 10 ml de solução salina (NaCl 0,9 %) à qual foram adicionados 10 mg de Al(OH)₃ e após agitação vigorosa por cerca de 3 minutos, mais 100 μ l de ovoalbumina (1 μ g/ml). A injeção foi administrada no início dos experimentos (dia zero) e 14 dias após os animais foram colocados na câmara de inalação para serem submetidos ao tratamento crônico com brometo de ipratrópio.

Os animais sensibilizados foram submetidos ao desafio antigênico por meio da inalação de ovoalbumina. O desafio antigênico (broncoprovocação) ocorreu no 13º dia após o início do tratamento com brometo de ipratrópio, ou seja, (27 dias após a sensibilização), portanto 24

horas antes do fim do tratamento com brometo de ipratrópio. Para a realização do desafio antigênico os animais eram retirados da câmara de inalação e colocados em outra caixa de acrílico, onde individualmente inalavam ovoalbumina dissolvida em solução nebulizada durante um período total de 30 minutos. Este tempo de inalação era dividido em duas sessões sequenciais de 15 minutos nas concentrações de ovoalbumina de 1mg/ml e 5mg/ml, respectivamente.

3.2.3. Avaliação da contratilidade da musculatura traqueal

3.2.3.1. Traquéias isoladas

Após o tratamento correspondente de cada grupo os animais foram sacrificados 0, 4, 8 ou 12 horas após a última inalação, e a traquéia rapidamente removida para uma placa de Petri com solução de Krebs-Henseleit aerada com mistura carbogênica (95% O₂ – 5%CO₂). Após a remoção do excesso de tecido adjacente, a traquéia foi montada sob a forma de anéis em um banho para órgão isolado contendo 8ml de solução de Krebs-Henseleit.

O líquido de incubação foi borbulhado continuamente com mistura carbogênica, e a temperatura foi mantida em $36,5 \pm 0,5$ ° C, com o auxílio de uma bomba de perfusão com dispositivo de controle de temperatura.

A tensão aplicada à traquéia foi ajustada em 1g e mantida neste nível por um período de equilíbrio de 1 hora sem troca do líquido de incubação com o objetivo de evitar a retirada do brometo de ipratrópio do órgão.

Contrações isométricas foram detectadas por intermédio de um sistema de registro que consistia em um transdutor de força, acoplado a uma placa de aquisição de dados analógico/digital (A/D). Os dados provenientes do

transdutor e filtrados pela placa eram adquiridos e expressos em um computador compatível IBM-PC o que permite a obtenção em gramas da contração muscular desenvolvida pela preparação (Figura 3). A análise e “display” dos dados foi realizada através de um programa específico para registro de contrações musculares lisas e cardíacas, inteiramente desenvolvido em nosso laboratório.

Os experimentos, sempre que possível, foram realizados de forma “pareada”, ou seja, a cada sessão experimental foram montadas uma traquéia dissecada do grupo experimental e outra do grupo controle, e os dois sistemas de registro (cuba, transdutor, canal do computador utilizado etc), eram alternados. Assim se em uma sessão o sistema “A” registrava o grupo experimental e o “B” o controle, na sessão seguinte ocorria inversão registrando o “B” o controle e o “A” o experimental. O “pareamento” permitia que as condições experimentais (líquido de incubação, temperatura, solução do agonista utilizada etc) fossem as mesmas para os dois grupos. E a alternância de sistemas prevenia, apesar de a calibração mostrar perfeita equivalência, uma eventual sistematização de erro causada por diferença de calibração entres os dois sistemas de registro utilizados.

Após o período de equilíbrio foram então confeccionadas as curvas concentração-efeito ao carbacol, serotonina, potássio, cálcio e ao estímulo elétrico.

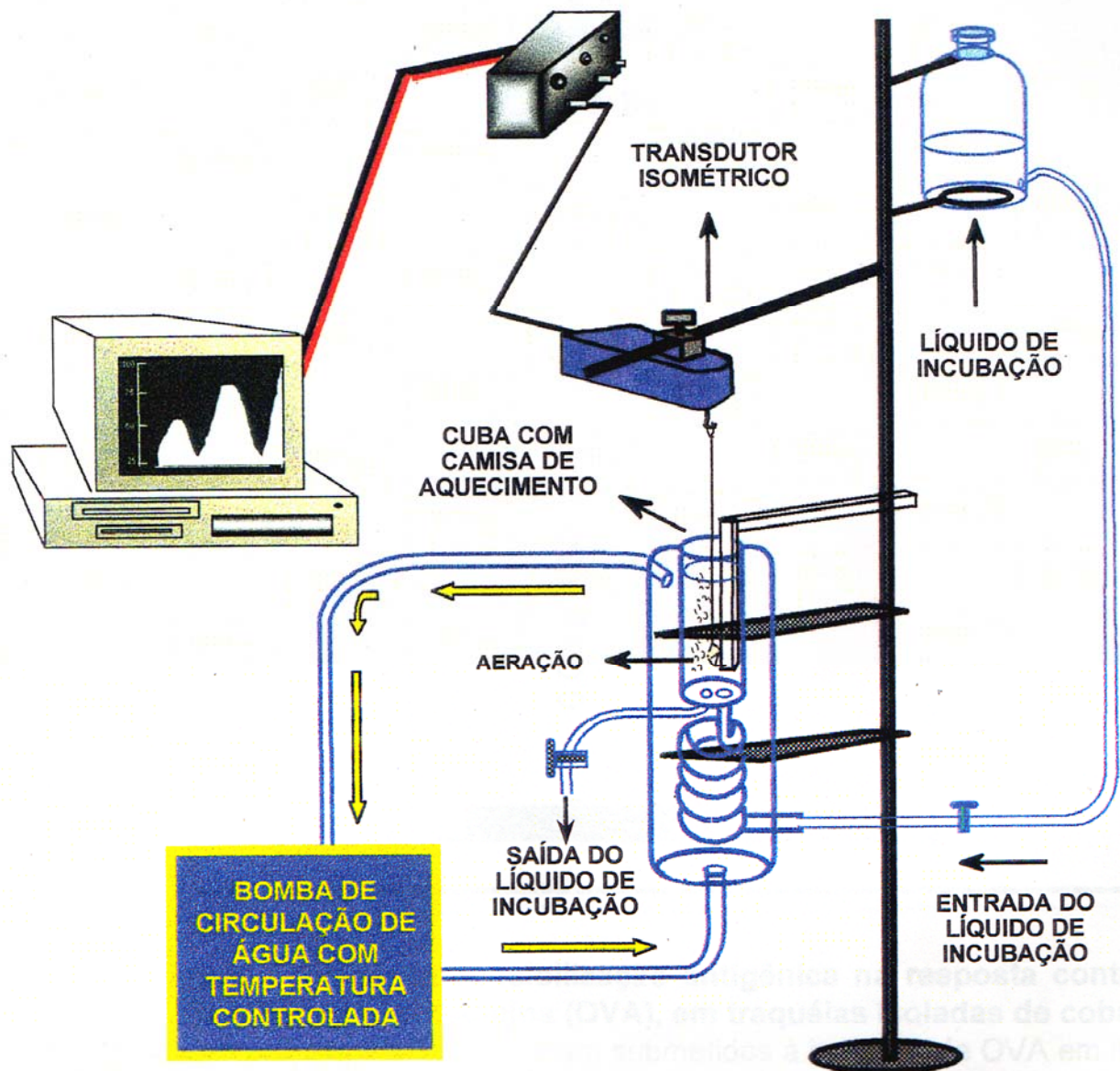


Figura 3: Aparato utilizado para o registro de contrações de órgãos isolados.

3.2.3.2. Curvas concentração-efeito para o carbacol, serotonina e potássio

As curvas concentração-efeito (CCE) foram obtidas utilizando-se o método cumulativo (Van Rossum & Van den Bring, 1963). As concentrações eram adicionadas sucessivamente, acrescidas de um fator igual a 3 (meia unidade log.). O período de tempo limite para que se considerasse total ausência de resposta (resposta igual a zero) foi de 90 segundos.

3.2.3.3. Curvas concentração-efeito ao cálcio

Após a remoção, conforme protocolo acima, e após o período de estabilização, o líquido de incubação foi trocado por solução de Krebs-Henseleit sem cálcio e com EDTA (10^{-5} M), 10 minutos após foi obtida a resposta contrátil induzida pelo KCl (10^{-1} M) ou pelo carbacol (10^{-6} M) e após o relaxamento da resposta obtida, na presença do agente contrátil (KCl ou Cch) foram confeccionadas as CCE ao cálcio. Nas CCE ao cálcio obtidas após a contração com carbacol foi acrescentada nifedipina (10^{-6} M) com a finalidade de bloquear a participação dos canais de cálcio voltagem dependente.

3.2.3.4. Curvas concentração-efeito para o estímulo elétrico

As curvas ao estímulo elétrico foram realizadas utilizando com um estimulador que permitia a aplicação de choques na forma de ondas quadradas na voltagem de 120 V (voltagem supramáxima), com duração de 1 ms. A curva

concentração-efeito era obtida com o incremento gradual da frequência de um fator 2 (0,125, 0,25, 0,5, 1,2, 4, 8, 16, 32, 64 Hz).

3.2.4. Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software Microcal Origin v. 2.94. Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. Para comparação entre os grupos, foi utilizado teste *t* de Student. A análise ao nível da CE50 foi realizada comparando-se a média geométrica dos experimentos individuais para um intervalo de confiança de 95% (I.C.). Probabilidades iguais ou menores que 0,05 foram aceitas como indicativas de significância estatística.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. RESPOSTA CONTRÁTIL AO CARBACOL, APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS SUBMETIDOS A UMA ÚNICA INALAÇÃO DE BROMETO DE IPRATRÓPIO.

As curvas concentração-efeito (CCE), médias obtidas para o carbacol, com traquéias isoladas de ratos submetidos a uma única inalação de brometo de ipratrópio e de ratos controle são apresentadas na figura 4. A tabela 1 apresenta os valores das CE50 e Respostas Máximas obtidas na figura 4. Podemos observar que as CCE obtidas de traquéias isoladas de animais submetidos a uma única inalação de brometo de ipratrópio apresentaram-se desviadas para a direita, em relação às CCE obtidas com traquéias do grupo controle, ocorrendo aumento significativo do valor da CE50 ($p < 0,01$).

4.2. RESPOSTA CONTRÁTIL AO CARBACOL, APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS IMEDIATAMENTE APÓS O TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO.

As curvas concentração-efeito (CCE), médias obtidas para o carbacol, com traquéias isoladas de ratos imediatamente após o fim do tratamento crônico com brometo de ipratrópio e isoladas do grupo controle são apresentadas na figura 5. Os valores das CE50 e Respostas Máximas obtidas nestes experimentos são apresentados na tabela 2. Note-se que o tratamento crônico com brometo de ipratrópio induziu evidente diminuição de sensibilidade “ponto a ponto” ao carbacol com desvio a direita na CCE, caracterizada por significativo aumento do valor das CE50 ($p < 0,01$).

4.3. RESPOSTA CONTRÁTIL AO CARBACOL, APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS 4 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO.

As curvas concentração-efeito (CCE), médias obtidas para o carbacol, com traquéias isoladas de ratos 4 horas após o fim do tratamento crônico com brometo de ipratrópio e de ratos controle são apresentadas na figura 6. A tabela 3 apresenta os valores das CE50 e Respostas Máximas obtidas. Podemos observar que as CCE obtidas de traquéias isoladas de animais submetidos à retirada abrupta 4 horas após o tratamento crônico com brometo de ipratrópio apresentaram ainda valores de CE50 significativamente aumentados ($p < 0,05$) ocorrendo aqui, no entanto um aumento significativo da Resposta Máxima no grupo experimental (30,7%) em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

4.4. RESPOSTA CONTRÁTIL AO CARBACOL, APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS 8 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO.

As curvas concentração-efeito (CCE), médias obtidas para o carbacol, com traquéias isoladas de ratos 8 horas após o fim do tratamento crônico com brometo de ipratrópio e de ratos controle são apresentadas na figura 7. Os valores das CE50 e Respostas Máximas obtidas são apresentados na tabela 4. Podemos observar aumento de 32% na média das Respostas Máximas obtidas de traquéias isoladas de animais submetidos ao tratamento e retirada do brometo de ipratrópio em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Não foi observada, no entanto, alteração significativa das CE50 obtidas.

4.5. RESPOSTA CONTRÁTIL AO CARBACOL, APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS 12 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO.

As curvas concentração-efeito (CCE), médias obtidas para o carbacol, com traquéias isoladas de ratos 12 horas após o fim do tratamento crônico com brometo de ipratrópio e de ratos controle são apresentadas na figura 8. Os valores das Respostas Máximas e CE50 obtidas estão especificadas na tabela 5. Podemos observar que ocorreu um aumento significativo ($p < 0,01$), de 56,2% na média das Respostas Máximas obtidas de traquéias isoladas de animais tratados quando comparados ao grupo controle. Ocorreu ainda um aumento significativo “ponto a ponto” ao longo de boa parte da CCE.

4.6. RESPOSTA CONTRÁTIL A SEROTONINA, APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS 12 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO.

As curvas concentração-efeito (CCE), médias obtidas para serotonina (5HT), com traquéias isoladas de ratos 12 horas após o fim do tratamento crônico com brometo de ipratrópio e de ratos controle são apresentadas na figura 9. A tabela 6 apresenta os valores das CE50 e Respostas Máximas obtidas. Da mesma forma que o obtido para o carbacol, as CCE obtidas para a serotonina com traquéias do grupo experimental, apresentaram um aumento significativo ($p < 0,01$) de 79,6% na média das Respostas Máximas obtidas quando comparadas com grupo controle, sem

significativa alteração da CE50. Ao longo de praticamente quase toda a curva obtida ocorreu ainda um aumento significativo “ponto a ponto”.

4.7. RESPOSTA CONTRÁTIL AO POTÁSSIO, APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS 12 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO.

As curvas concentração-efeito (CCE), médias obtidas para o potássio, com traquéias isoladas 12 horas após o fim do tratamento crônico com brometo de ipratrópio e de ratos controle são apresentadas na figura 10. A tabela 7 apresenta os valores das CE50 e Respostas Máximas obtidas. Também aqui nas CCE obtidas para o potássio, pode-se notar que ocorreu aumento significativo ($p < 0,01$) de 81,4% na média das Respostas Máximas obtidas de traquéias isoladas de animais submetidos ao tratamento e retirada por 12 horas do brometo de ipratrópio em relação ao grupo controle. Não ocorreu alteração significativa ao nível da CE50.

4.8. RESPOSTA CONTRÁTIL AO ESTÍMULO ELÉTRICA, APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS 12 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO.

As curvas frequência-resposta, médias obtidas com traquéias isoladas de ratos 12 horas após o fim do tratamento crônico com brometo de ipratrópio e de ratos controle são apresentadas na figura 11. As Respostas Máximas e as CE50 obtidas estão arroladas na tabela 8. Ocorreu evidente e significativo ($p < 0,01$) aumento de 31,2% na média das Respostas Máximas

sem aumento significativo da FE50. Podemos observar ainda que o aumento de contratilidade se manifestou ao longo de toda a parte alta da CCE (figura 11).

4.9. RESPOSTA CONTRÁTIL AO CÁLCIO, SUBSEQUENTE A CONTRAÇÃO INDUZIDA PELO CARBACOL, EM TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS, 12 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO.

As curvas concentração-efeito (CCE) médias obtidas para o cálcio, após contração induzida pelo carbacol, em traquéias isoladas de ratos 12 horas após o fim do tratamento crônico com brometo de ipratrópio e de ratos controle são apresentadas na figura 12. A tabela 9 apresenta os valores das CE50 e Respostas Máximas obtidas. Podemos observar que ocorreu aumento significativo ($p < 0,01$) de 30,7% na média das Respostas Máximas obtidas de traquéias isoladas 12 horas após o fim do tratamento crônico com brometo de ipratrópio em relação ao grupo controle. Este incremento na resposta contrátil induzida pelo cálcio entrando pelos canais abertos pelo carbacol (canais ROC) apresentou-se ao longo de toda a parte alta da curva.

4.10. RESPOSTA CONTRÁTIL AO CÁLCIO, SUBSEQUENTE A CONTRAÇÃO INDUZIDA PELO POTÁSSIO, EM TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS, 12 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO.

As curvas concentração-efeito (CCE) médias obtidas ao cálcio, após contração induzida pelo potássio, em traquéias isoladas de ratos 12 horas após o fim do tratamento crônico com brometo de ipratrópio e de ratos controle

são apresentadas na figura 13. A tabela 10 apresenta os valores das CE50 e Respostas Máximas obtidas. Manifestou-se aumento significativo ($p<0,01$) de 54% na média das Respostas Máximas obtidas quando comparado o grupo experimental ao grupo controle. Da mesma forma que o ocorrido para o carbacol à resposta contrátil induzida pelo cálcio via canais abertos pelo potássio (canais VOC) apresentou-se aumentada ao longo de toda a parte alta da curva.

4.11. RESPOSTA CONTRÁTIL AO CARBACOL, APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS SENSIBILIZADOS E DESAFIADOS A OVOALBUMINA IMEDIATAMENTE APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO.

As curvas concentração-efeito (CCE), médias obtidas para o carbacol, com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados à ovoalbumina, imediatamente após o fim do tratamento crônico com brometo de ipratrópio e de ratos controle são apresentadas na figura 14. A tabela 11 apresenta os valores das CE50 e Respostas Máximas referentes a estes experimentos. Também em animais sensibilizados e desafiados à ovoalbumina ocorreu evidente e significativo ($p<0,01$) aumento da CE50 com conseqüente desvio para a direita da CCE obtidas.

4.12. RESPOSTA CONTRÁTIL AO CARBACOL, APRESENTADA POR TRAQUÉIAS ISOLADAS DE ANIMAIS SENSIBILIZADOS E DESAFIADOS A OVOALBUMINA 12 HORAS APÓS SUPRESSÃO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM BROMETO DE IPRATRÓPIO.

Ao compararmos as CCE obtidas para o carbacol, obtidas com traquéias isoladas de animais não desafiados e tratados apenas com solução salina (controle do grupo submetido a supressão por 12 horas, Fig. 8 e tabela 5) com o grupo desafiado e tratados com solução salina (grupo controle, figura 15 e tabela 12) observamos a presença evidente de hiperreatividade induzida pelo desafio antigênico caracterizada pelo aumento significativo da Resposta Máxima (RM-12: CONT. =1,69(0,04); BI. =2,48(0,19) gF $p<0,01$).

A figura 15 apresenta as curvas concentração-efeito (CCE), médias obtidas para o carbacol, com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados à ovoalbumina. Em um grupo de animais os experimentos foram realizados 12 horas após o fim do tratamento crônico com brometo de ipratrópio e em outro após a inalação de solução salina (controle). A tabela 12 apresenta os valores das CE50 e Respostas Máximas obtidas. Podemos observar também aqui em animais sensibilizados e desafiados, aumento significativo ($p<0,01$) de 40,3% na média das Respostas Máximas obtidas com o grupo experimental em relação ao grupo controle sem alteração estatisticamente significante ao nível da CE50.

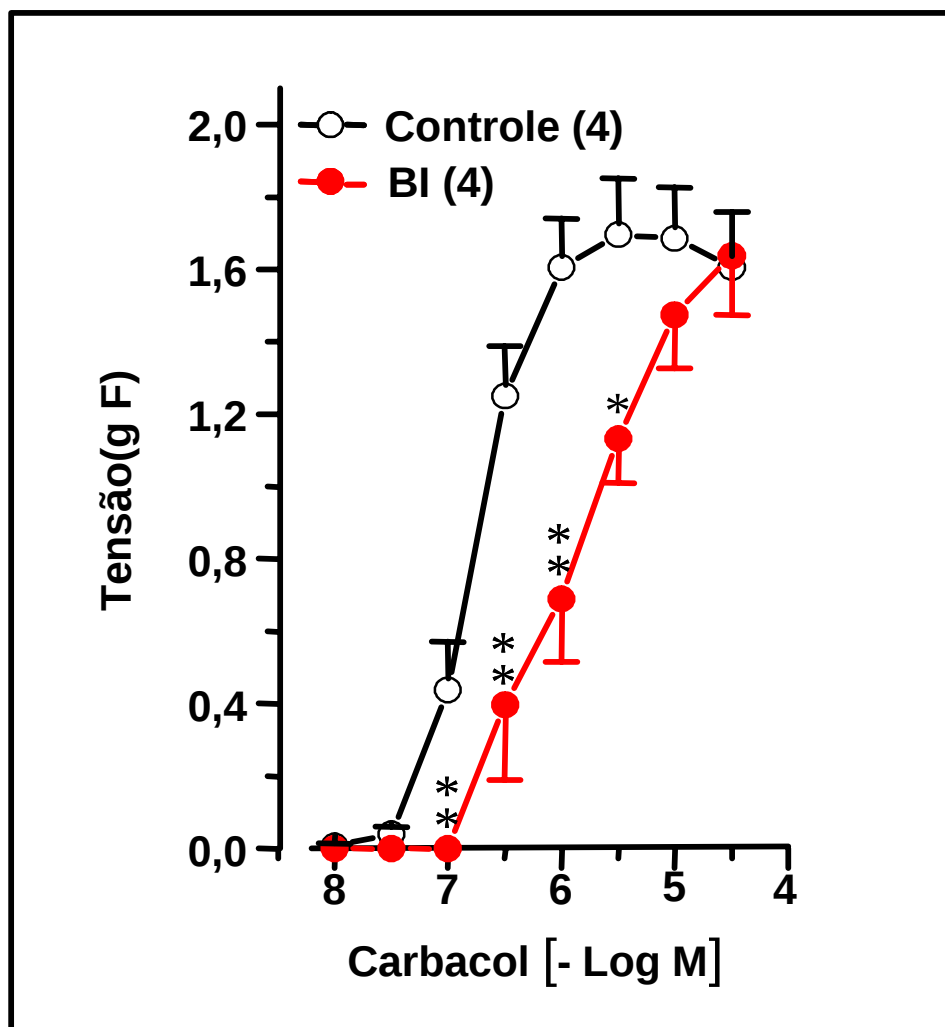


Figura 4. Curvas concentração-efeito ao carbacol em traquéias isoladas de ratos submetidos a uma única inalação de brometo de ipratrópio (BI).

Os animais do grupo BI inalaram solução de brometo de ipratrópio (600 μ M) durante 7 minutos e o grupo controle inalou apenas solução salina (NaCl 0,9%). O número de experimentos de cada grupo está apresentado entre parênteses. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (teste “ t ” de Student). As barras verticais representam os E.P.M.

Tabela 1. CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao carbacol (Cch), realizadas com traquéias isoladas de ratos submetidos a uma única inalação de brometo de ipratrópio (BI).

GRUPO	CE50 x 10 ⁻⁷ M (I.C.) ^φ	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) [♠]	N [♦]
Controle [♣]	1,78 (1,32 – 2,32)	1,72 (0,14)	4
BI [♥]	14,6 [*] (2,05 – 58,1)	1,63 (0,16)	4

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

[♠] Média aritmética ± Erro Padrão da Média das Respostas Máximas em gF de tensão desenvolvida.

[♥] Animais submetidos a uma única inalação de brometo de ipratrópio (600μM) durante 7 minutos.

[♣] Animais submetidos a inalação de solução salina (NaCl 0,9%).

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

[♦] Número de experimentos.

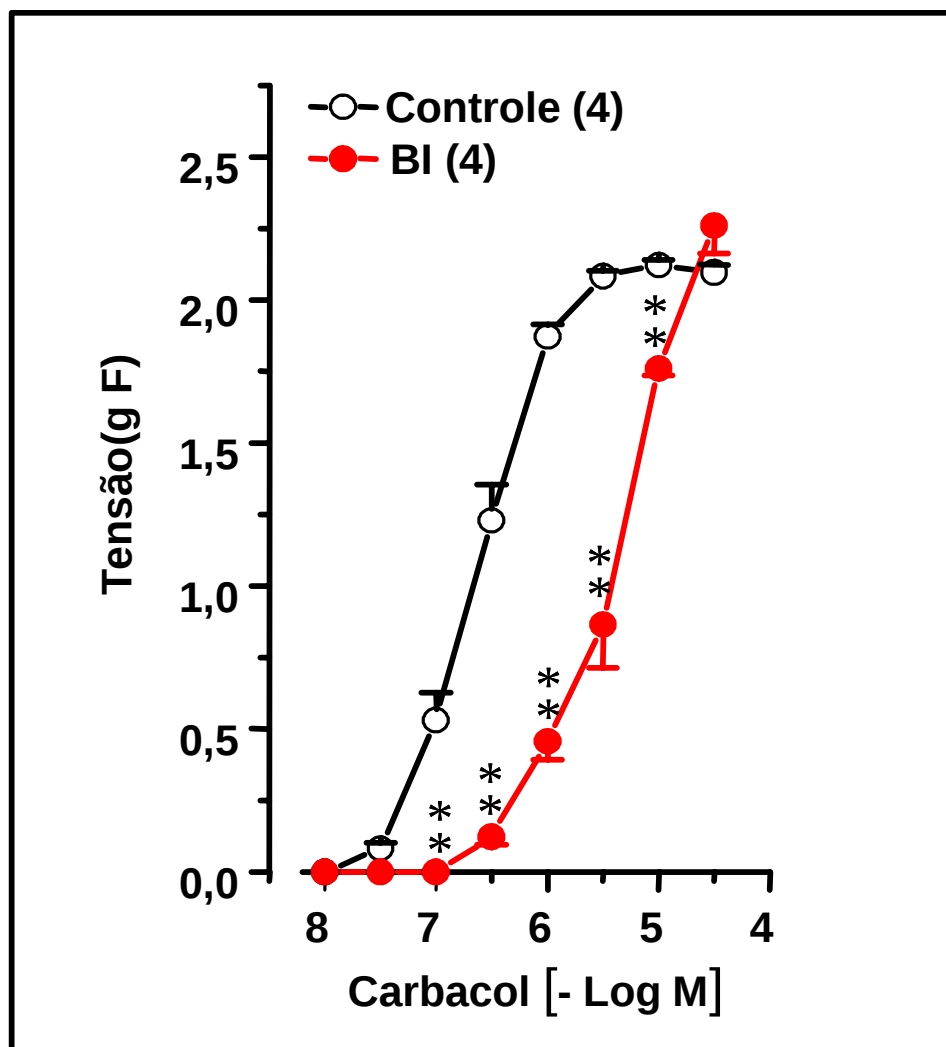


Figura 5. Curvas concentração-efeito ao carbacol em traquéias isoladas de ratos imediatamente após o tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

Os animais do grupo BI foram submetidos à supressão imediata do tratamento crônico por inalação de brometo de ipratrópio (600 μ M) durante 7 minutos de 4 em 4 horas durante 14 dias. O grupo controle inalou apenas solução salina (NaCl 0,9%). O número de experimentos de cada grupo está apresentado entre parênteses. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (teste "t" de Student). As barras verticais representam os E.P.M.

Tabela 2. CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao carbacol (Cch), realizadas com traquéias isoladas de ratos imediatamente após o tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

GRUPO	CE50 x 10 ⁻⁷ M (I.C.) ^φ	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) [♠]	N [♦]
Controle [♣]	2,33 (1,25 – 4,32)	2,40 (0,15)	4
BI [♥]	42,5 * * (21,1 – 85,8)	2,26 (0,09)	4

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

[♠] Média aritmética ± Erro Padrão da Média das Respostas Máximas em gF de tensão desenvolvida.

[♥] Animais submetidos à inalações periódicas de brometo de ipratrópio (600μM) com duração de 7 minutos a cada 4 horas durante 14 dias

[♣] Animais submetidos a inalação de solução salina (NaCl 0,9%).

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

[♦] Número de experimentos.

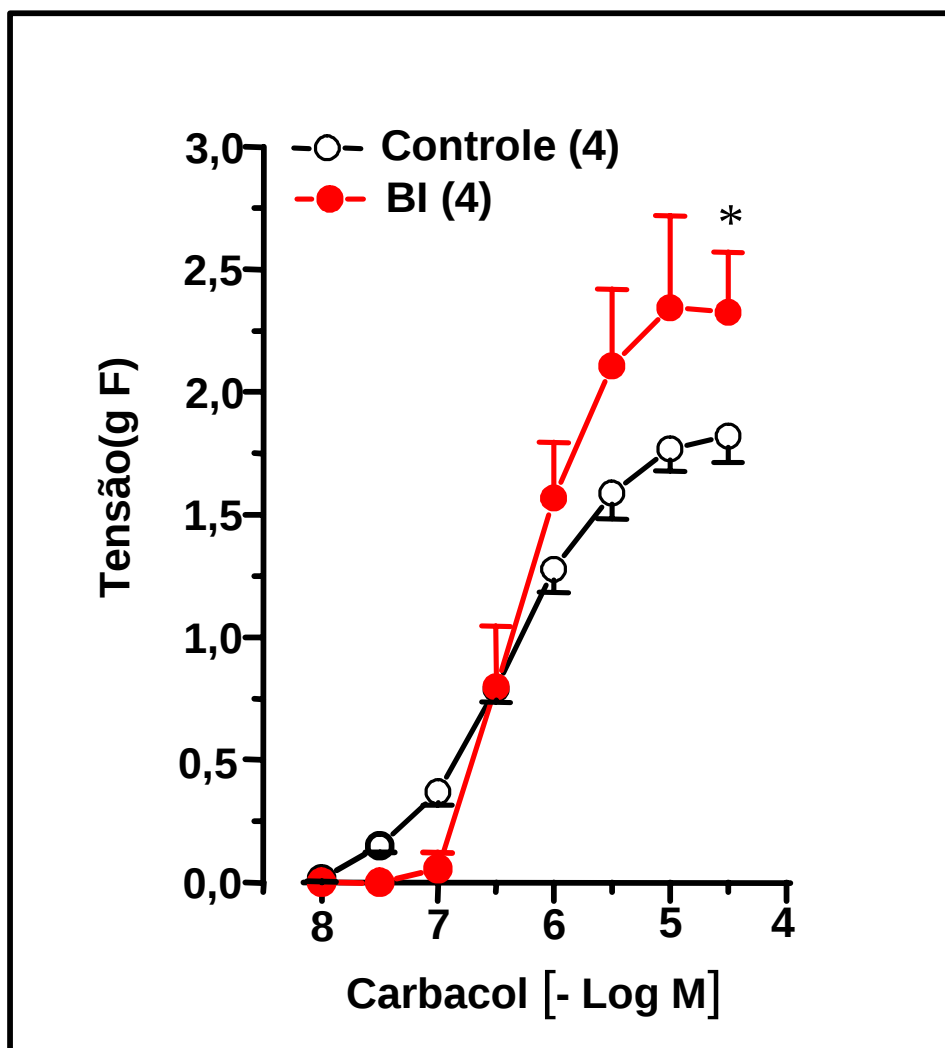


Figura 6. Curvas concentração-efeito ao carbacol em traquéias isoladas de ratos 4 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

Os animais do grupo BI foram submetidos à supressão de 4 horas do tratamento crônico por inalação de brometo de ipratrópio ($600\mu\text{M}$) durante 7 minutos de 4 em 4 horas durante 14 dias. O grupo controle inalou apenas solução salina (NaCl 0,9%). O número de experimentos de cada grupo está apresentado entre parênteses. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (teste “t” de Student). As barras verticais representam os E.P.M.

Tabela 3. CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao carbacol (Cch), realizadas com traquéias isoladas de ratos 4 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

GRUPO	CE50 x 10 ⁻⁷ M (I.C.) ^φ	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) [♠]	N [♦]
Controle [♣]	4,03 (2,92 – 5,57)	1,82 (0,10)	4
BI [♥]	7,16 * * (3,11 – 16,4)	2,38 * (0,32)	4

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

[♠] Média aritmética ± Erro Padrão da Média das Respostas Máximas em gF de tensão desenvolvida.

[♥] Animais submetidos à inalações periódicas de brometo de ipratrópio (600μM) com duração de 7 minutos a cada 4 horas durante 14 dias + 4 horas de supressão do tratamento.

[♣] Animais submetidos a inalação de solução salina (NaCl 0,9%).

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

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

[♦] Número de experimentos.

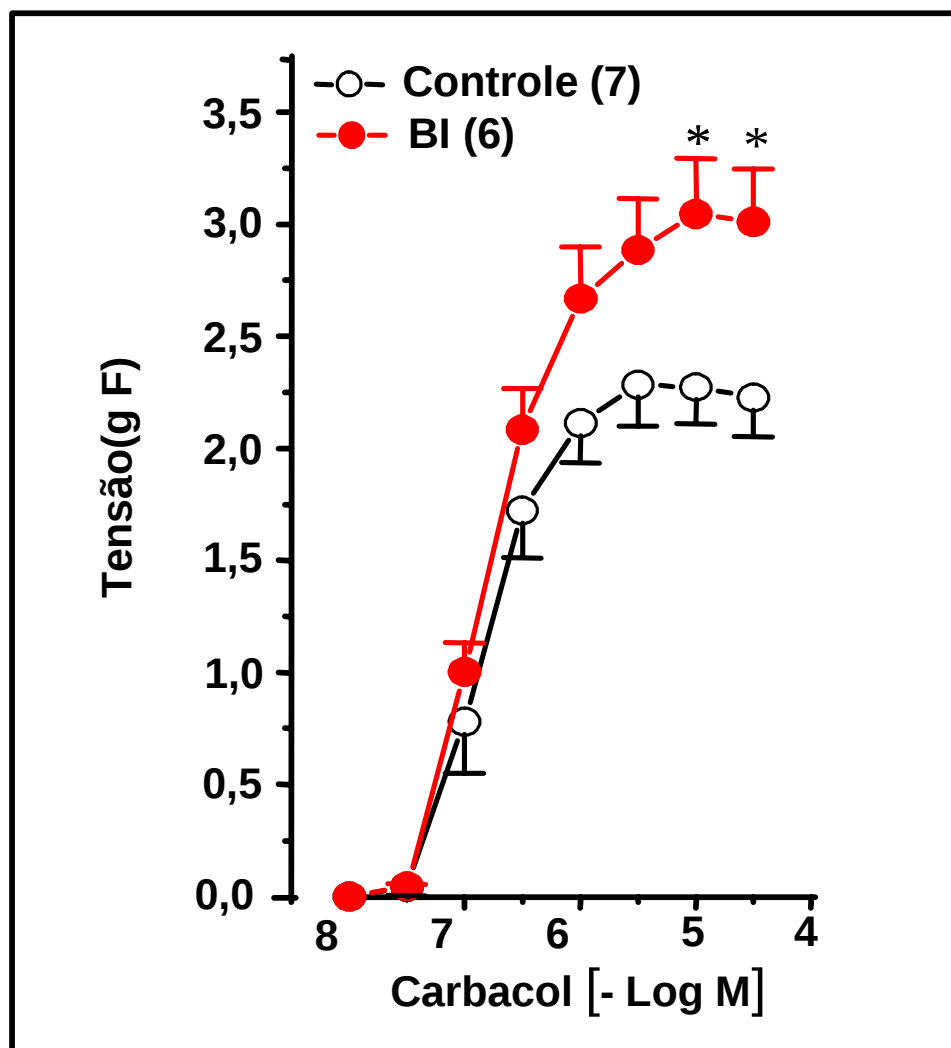


Figura 7. Curvas concentração-efeito ao carbacol em traquéias isoladas de ratos 8 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

Os animais do grupo BI foram submetidos à supressão de 8 horas do tratamento crônico por inalação de brometo de ipratrópio (600 μ M) durante 7 minutos de 4 em 4 horas durante 14 dias. O grupo controle inalou apenas solução salina (NaCl 0,9%). O número de experimentos de cada grupo está apresentado entre parênteses. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (teste “ t ” de Student). As barras verticais representam os E.P.M.

Tabela 4. CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao carbacol (Cch), realizadas com traquéias isoladas de ratos 8 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

GRUPO	CE50 x 10 ⁻⁷ M (I.C.) ^φ	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) [♠]	N [♦]
Controle [♣]	2,70 (1,20 – 6,05))	2,31 (0,17)	7
BI [♥]	2,19 (1,04 – 4,63)	3,05 * (0,24)	6

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

[♠] Média aritmética ± Erro Padrão da Média das Respostas Máximas em gF de tensão desenvolvida.

[♥] Animais submetidos à inalações periódicas de brometo de ipratrópio (600μM) com duração de 7 minutos a cada 4 horas durante 14 dias + 8 horas de supressão do tratamento.

[♣] Animais submetidos a inalação de solução salina (NaCl 0,9%).

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

[♦] Número de experimentos.

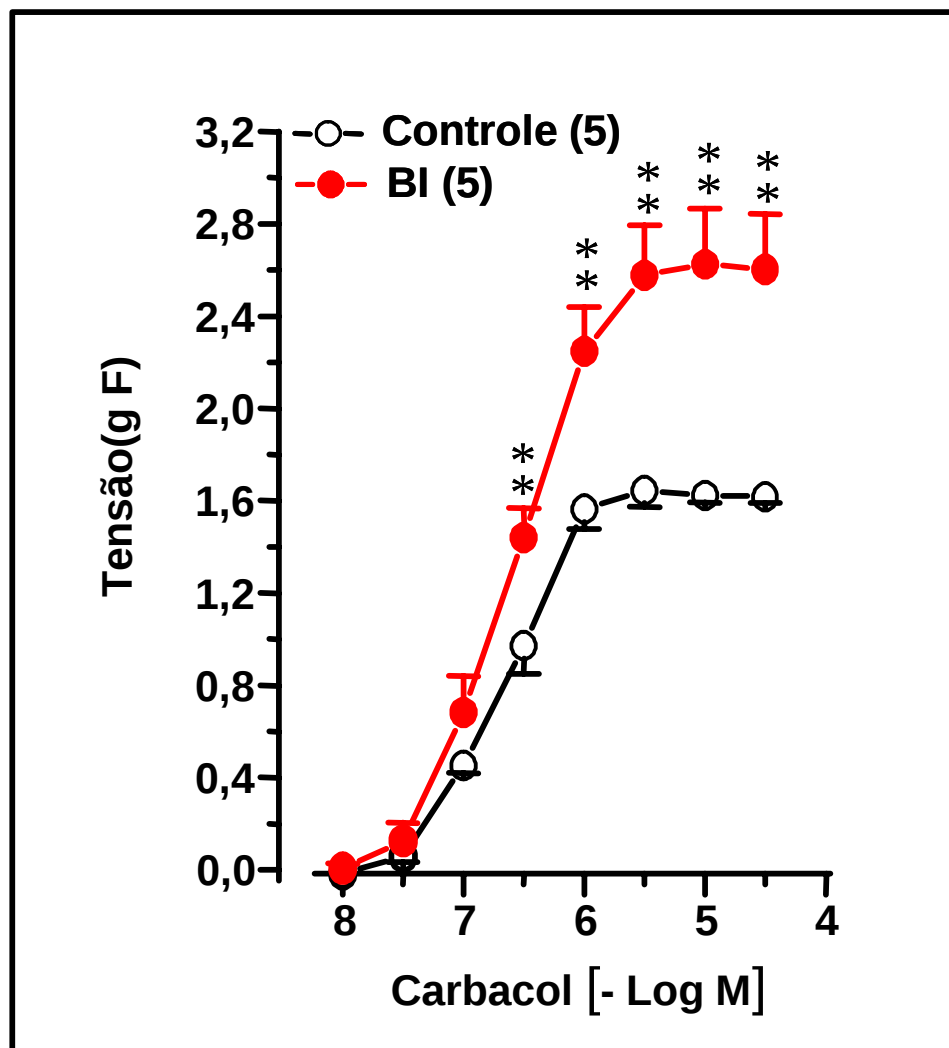


Figura 8. Curvas concentração-efeito ao carbacol em traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

Os animais do grupo BI foram submetidos à supressão de 12 horas do tratamento crônico por inalação de brometo de ipratrópio (600 μ M) durante 7 minutos de 4 em 4 horas durante 14 dias. O grupo controle inalou apenas solução salina (NaCl 0,9%). O número de experimentos de cada grupo está apresentado entre parênteses. * * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (teste “ t ” de Student). As barras verticais representam os E.P.M.

Tabela 5. CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao carbacol (Cch), realizadas com traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

GRUPO	CE50 x 10 ⁻⁷ M (I.C.) ^φ	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) [♠]	N [♦]
Controle [♣]	2,27 (1,39 – 3,72)	1,69 (0,04)	5
BI [♥]	2,46 (1,81 – 3,36)	2,64 ^{**} (0,23)	5

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

[♠] Média aritmética ± Erro Padrão da Média das Respostas Máximas em gF de tensão desenvolvida.

[♥] Animais submetidos à inalações periódicas de brometo de ipratrópio (600µM) com duração de 7 minutos a cada 4 horas durante 14 dias + 12 horas de supressão do tratamento.

[♣] Animais submetidos a inalação de solução salina (NaCl 0,9%).

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

[♦] Número de experimentos.

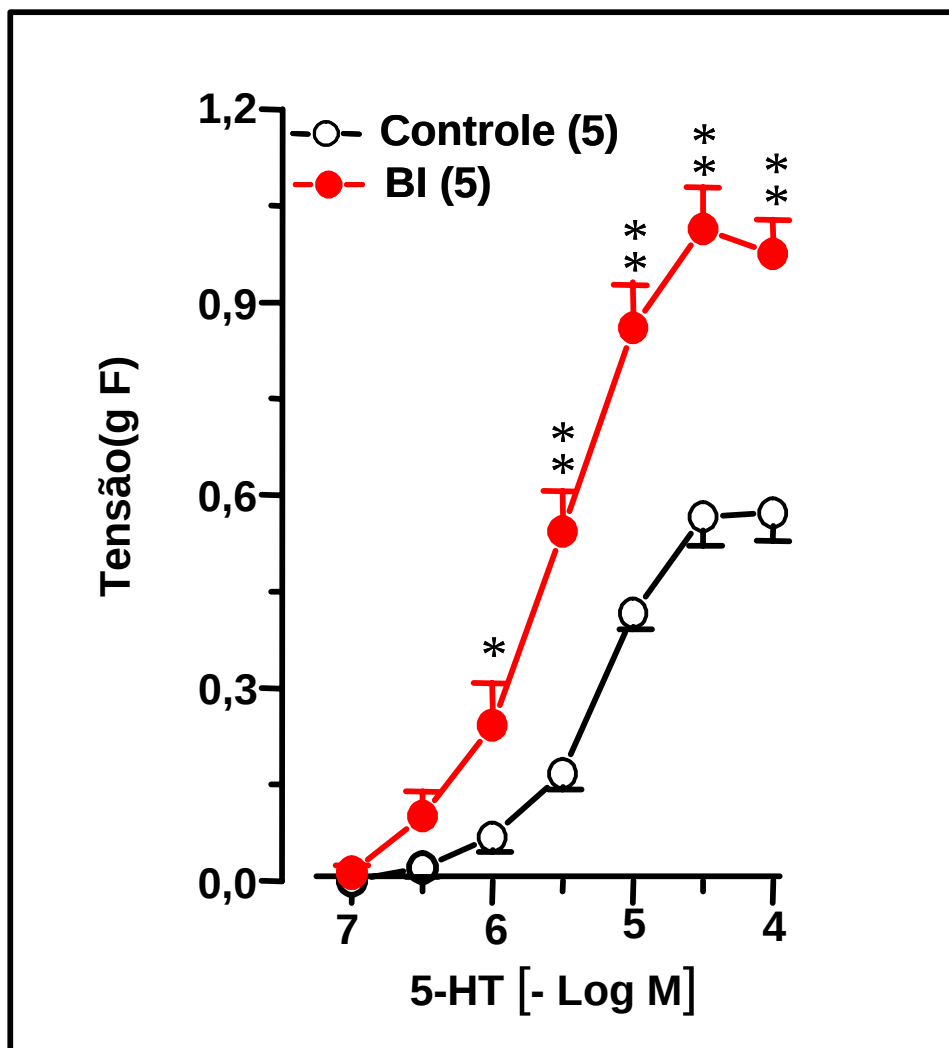


Figura 9. Curvas concentração-efeito à serotonina (5-HT) em traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

Os animais do grupo BI foram submetidos à supressão de 12 horas do tratamento crônico por inalação de brometo de ipratrópio (600 μ M) durante 7 minutos de 4 em 4 horas durante 14 dias. O grupo controle inalou apenas solução salina (NaCl 0,9%). O número de experimentos de cada grupo está apresentado entre parênteses. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (teste “t” de Student). As barras verticais representam os E.P.M.

Tabela 6. CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito à serotonina (5HT), realizadas com traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

GRUPO	CE50 x 10 ⁻⁶ M (I.C.) ^φ	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) [♠]	N [♦]
Controle [♣]	5,14 (3,36 – 7,86)	0,59 (0,04)	5
BI [♥]	2,60 (1,50 – 4,52)	1,06 * * (0,10)	5

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

[♠] Média aritmética ± Erro Padrão da Média das Respostas Máximas em gF de tensão desenvolvida.

[♥] Animais submetidos à inalações periódicas de brometo de ipratrópio (600μM) com duração de 7 minutos a cada 4 horas durante 14 dias + 12 horas de supressão do tratamento.

[♣] Animais submetidos a inalação de solução salina (NaCl 0,9%).

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

[♦] Número de experimentos.

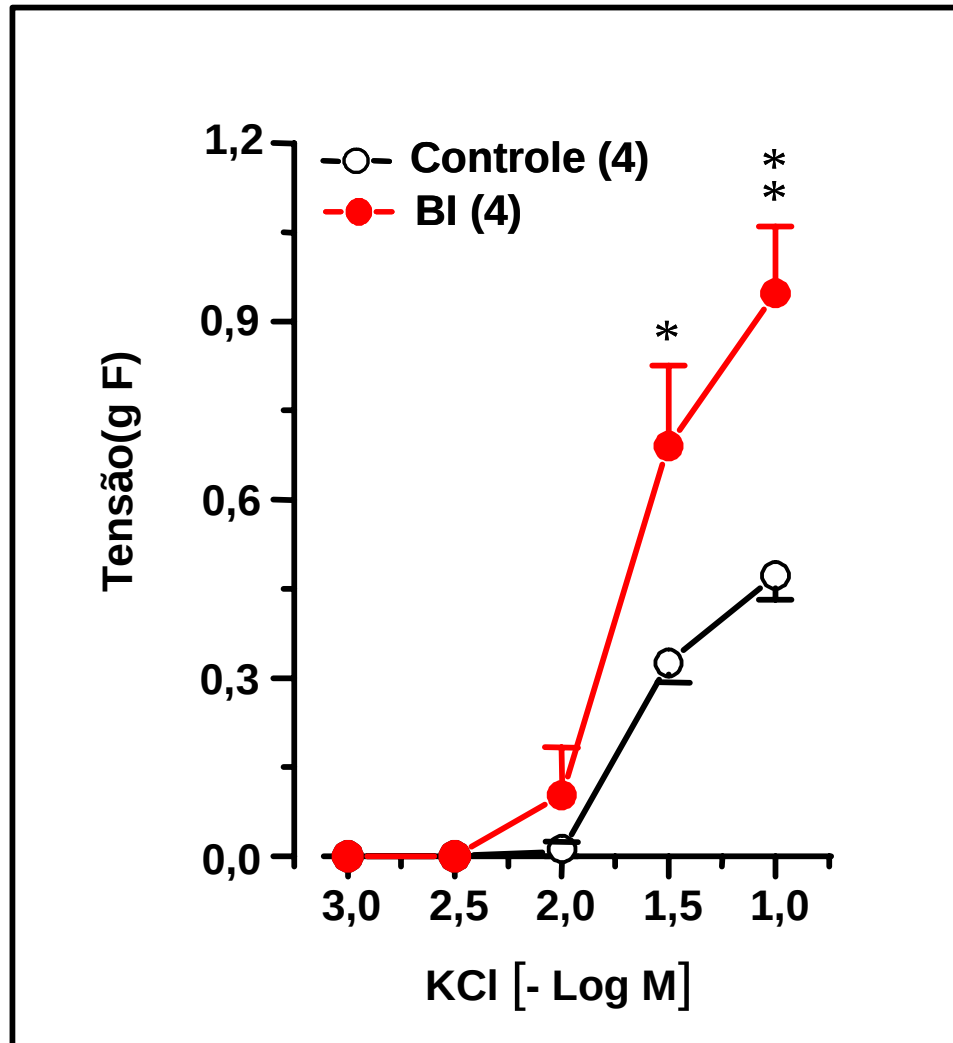


Figura 10. Curvas concentração-efeito ao potássio (KCl) em traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

Os animais do grupo BI foram submetidos à supressão de 12 horas do tratamento crônico por inalação de brometo de ipratrópio (600 μ M) durante 7 minutos de 4 em 4 horas durante 14 dias. O grupo controle inalou apenas solução salina (NaCl 0,9%). O número de experimentos de cada grupo está apresentado entre parênteses. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (teste "t" de Student). As barras verticais representam os E.P.M.

Tabela 7. CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao cloreto de potássio (KCl), realizadas com traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

GRUPO	CE50 x 10 ⁻⁶ M (I.C.) ^φ	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) [♠]	N [♦]
Controle [♣]	3,84 (2,12 – 6,95)	0,70 (0,05)	4
BI [♥]	2,86 (1,56 – 5,25)	1,27 * * (0,17)	4

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

[♠] Média aritmética ± Erro Padrão da Média das Respostas Máximas em gF de tensão desenvolvida.

[♥] Animais submetidos à inalações periódicas de brometo de ipratrópio (600μM) com duração de 7 minutos a cada 4 horas durante 14 dias + 12 horas de supressão do tratamento.

[♣] Animais submetidos a inalação de solução salina (NaCl 0,9%).

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

[♦] Número de experimentos.

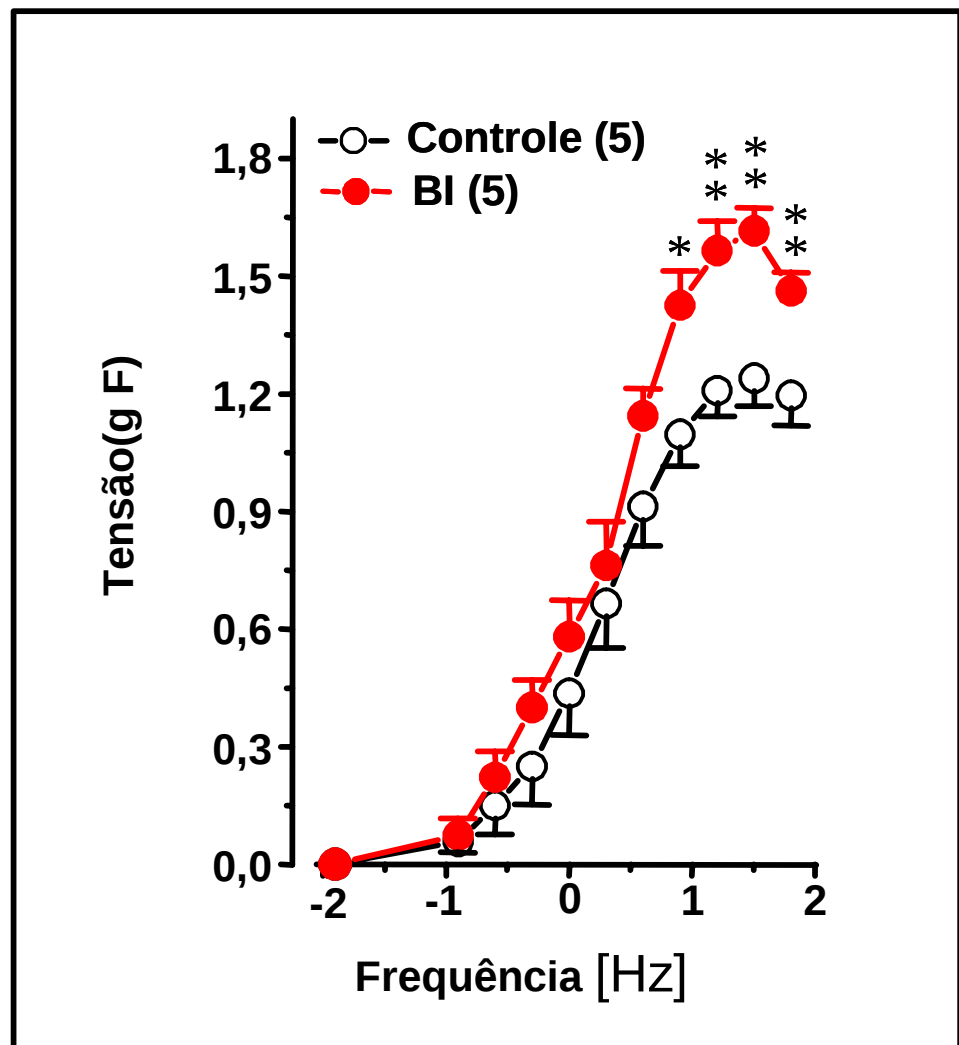


Figura 11. Curvas frequência-resposta à estimulação elétrica em traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

Os animais do grupo BI foram submetidos à supressão de 12 horas do tratamento crônico por inalação de brometo de ipratrópio (600 μ M) durante 7 minutos de 4 em 4 horas durante 14 dias. O grupo controle inalou apenas solução salina (NaCl 0,9%). Parâmetros de estimulação elétrica: 1ms, 120V. O número de experimentos de cada grupo está apresentado entre parênteses. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (teste “t” de Student). As barras verticais representam os E.P.M.

Tabela 8. FE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas frequência-resposta à estimulação elétrica[¥], realizadas com traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

GRUPO	FE50 (I.C.) ^φ	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) [♠]	N [♦]
Controle [♣]	1,53 (0,56 - 4,20)	1,25 (0,07)	5
BI [♥]	2,02 (1,08 - 3,80)	1,64 ^{**} (0,06)	5

[¥] Estímulo elétrico: 1ms, 120 V (supra máxima), 0,062 - 64 hertz (fator de acréscimo 2).

^φ Os valores representam a média geométrica das frequências dos estímulos elétricos que produziram respostas iguais a 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com intervalo de confiança de 95%.

[♠] Média aritmética ± Erro Padrão da Média das Respostas Máximas em gF de tensão desenvolvida.

[♥] Animais submetidos à inalações periódicas de brometo de ipratrópio (600µM) com duração de 7 minutos a cada 4 horas durante 14 dias + 12 horas de supressão do tratamento.

[♣] Animais submetidos a inalação de solução salina (NaCl 0,9%).

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

[♦] Número de experimentos.

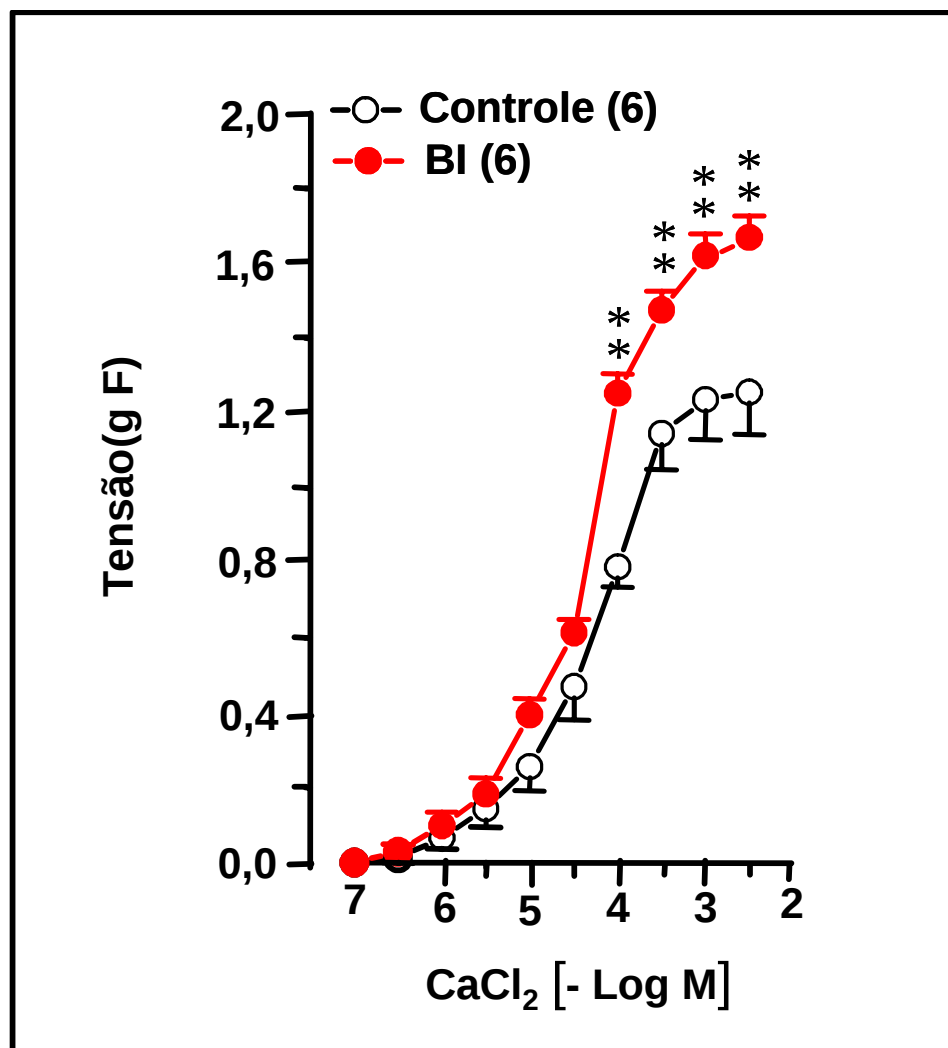


Figura 12. Curvas concentração-efeito ao cálcio (CaCl₂) subsequentes à contração induzida pelo carbacol (10⁻⁶ M) em traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

Os animais do grupo BI foram submetidos à supressão de 12 horas do tratamento crônico por inalação de brometo de ipratrópio (600µM) durante 7 minutos de 4 em 4 horas durante 14 dias. O grupo controle inalou apenas solução salina (NaCl 0,9%). Os experimentos foram realizados em líquido de incubação sem Ca²⁺ e na presença de nifedipina (10⁻⁶ M). O número de experimentos de cada grupo está apresentado entre parênteses. ** p<0,01 em relação ao grupo controle (teste “t” de Student). As barras verticais representam os E.P.M.

Tabela 9. CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao cálcio (CaCl_2)[#] subsequentes à contração induzida pelo carbacol[∇] em traquéias isoladas de ratos, 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI)

GRUPO	CE50 x 10 ⁻⁵ M (I.C.) ^φ	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) [♠]	N [♦]
Controle [♣]	4,42 (1,73 – 11,2)	1,27 (0,10)	6
BI [♥]	4,37 (3,55 – 5,38)	1,66 * * (0,05)	6

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

[♠] Média aritmética ± Erro Padrão da Média das Respostas Máximas em gF de tensão desenvolvida.

[♥] Animais submetidos à inalações periódicas de brometo de ipratrópio (600μM) com duração de 7 minutos a cada 4 horas durante 14 dias + 12 horas de supressão do tratamento.

[♣] Animais submetidos a inalação de solução salina (NaCl 0,9%).

[∇] Carbacol 10⁻⁶ M, experimentos realizados

[#] Os experimentos foram realizados em líquido de incubação sem Ca^{2+} e na presença de nifedipina 10⁻⁶ M

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

[♦] Número de experimentos.

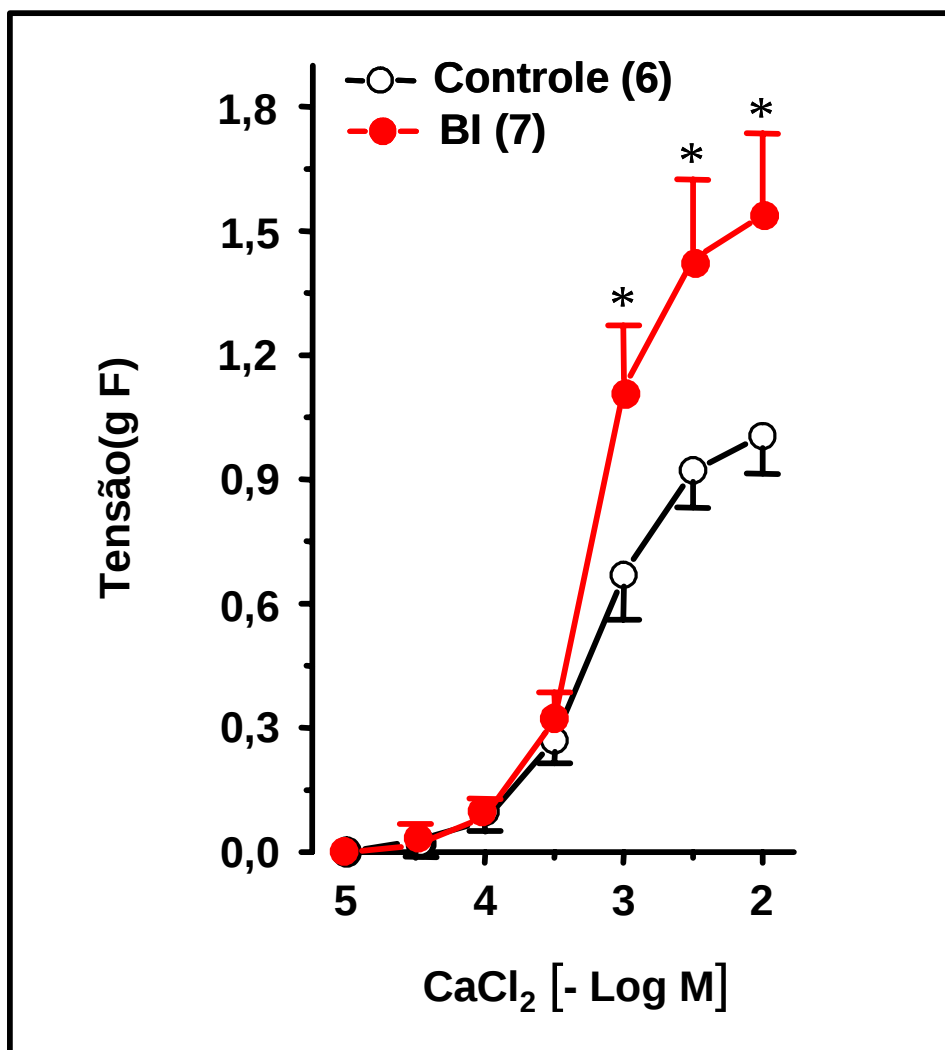


Figura 13. Curvas concentração-efeito ao cálcio (CaCl₂) subsequentes à contração induzida pelo cloreto de potássio (10⁻¹ M) em traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

Os animais do grupo BI foram submetidos à supressão de 12 horas do tratamento crônico por inalação de brometo de ipratrópio (600µM) durante 7 minutos de 4 em 4 horas durante 14 dias. O grupo controle inalou apenas solução salina (NaCl 0,9%). Os experimentos foram realizados em líquido de incubação sem Ca²⁺. O número de experimentos de cada grupo está apresentado entre parênteses. * p<0,05 em relação ao grupo controle (teste “t” de Student). As barras verticais representam os E.P.M.

Tabela 10. CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao cálcio (CaCl_2)[#] subsequentes à contração induzida pelo cloreto de potássio^Δ realizadas com traquéias isoladas de ratos 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

GRUPO	CE50 x 10^{-4} M (I.C.) ^φ	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) [♠]	N [♦]
Controle [♣]	5,96 (3,65 – 9,73)	1,00 (0,09)	6
BI [♥]	5,74 (1,83 – 6,83)	1,54 ^{**} (0,19)	7

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

[♠] Média aritmética ± Erro Padrão da Média das Respostas Máximas em gF de tensão desenvolvida.

[♥] Animais submetidos à inalações periódicas de brometo de ipratrópio (600 μ M) com duração de 7 minutos a cada 4 horas durante 14 dias + 12 horas de supressão do tratamento.

[♣] Animais submetidos a inalação de solução salina (NaCl 0,9%).

^Δ cloreto de potássio 10^{-1} M

[#] Os experimentos foram realizados em líquido de incubação sem Ca^{2+}

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

[♦] Número de experimentos.

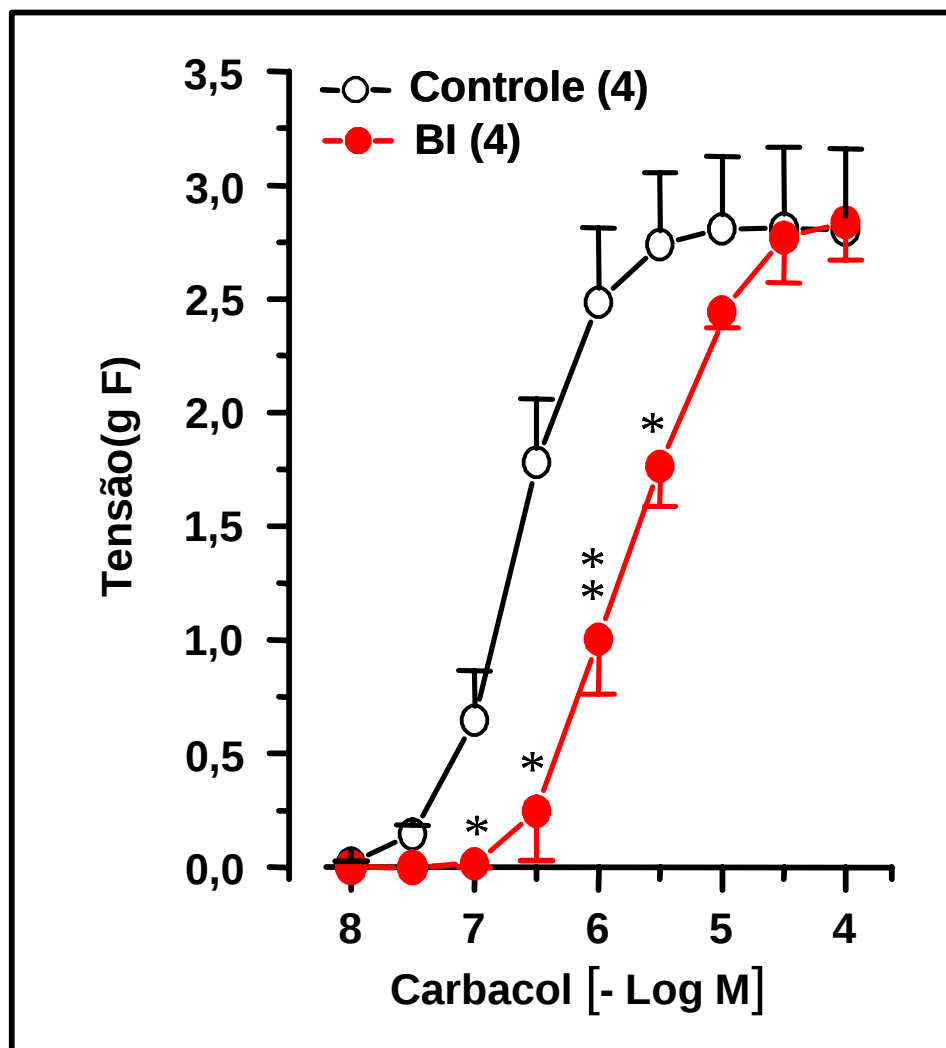


Figura 14. Curvas concentração-efeito ao carbacol em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados a ovoalbumina (OVA). Experimento realizado imediatamente após o tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

Todos os animais foram sensibilizados e desafiados 24 horas antes dos experimentos com inalações de OVA (1mg/ml/15 min, 5mg/ml/15 min) durante 30 minutos. Os animais do grupo BI foram submetidos ao tratamento crônico por inalação de brometo de ipratrópio (600 μ M) durante 7 minutos de 4 em 4 horas durante 14 dias. O grupo controle inalou apenas solução salina (NaCl 0,9%). O número de experimentos de cada grupo está apresentado entre parênteses. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (teste “t” de Student). As barras verticais representam os E.P.M.

Tabela 11. CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao carbacol (Cch) realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados a ovoalbumina (OVA)♦ imediatamente após o tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

GRUPO♦	CE50 x 10 ⁻⁷ M (I.C.) ϕ	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) ♠	N ♦
Controle ♣	2,10 (1,28 – 3,44)	2,83 (0,34)	4
BI ♥	17,13 * * (4,37 – 67,05)	2,86 (0,17)	4

♦ Todos os animais foram sensibilizados e desafiados 24 horas antes do experimentos com inalações de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml, durante 30 minutos.

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

♠ Média aritmética ± Erro Padrão da Média das Respostas Máximas em gF de tensão desenvolvida.

♥ Animais submetidos à inalações periódicas de brometo de ipratrópio (600µM) com duração de 7 minutos a cada 4 horas durante 14 dias.

♣ Animais submetidos a inalação de solução salina (NaCl 0,9%).

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

♦ Número de experimentos.

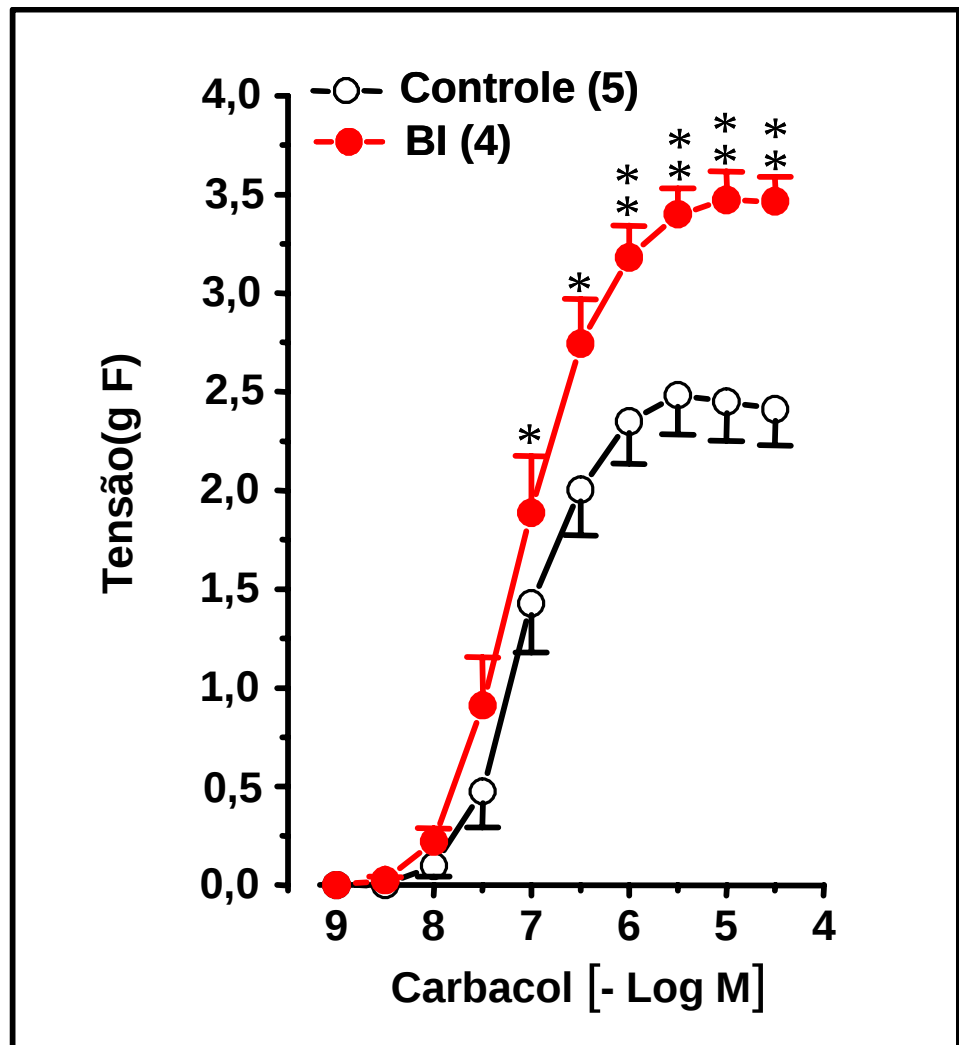


Figura 15. Curvas concentração-efeito ao carbacol em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados a ovoalbumina. Os experimentos foram realizados 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

Todos os animais foram sensibilizados e desafiados 24 horas antes dos experimentos com inalações de OVA (1mg/ml/15 min, 5mg/ml/15 min) durante 30 minutos. Os animais do grupo BI foram submetidos ao tratamento crônico por inalação de brometo de ipratrópio (600 μ M) durante 7 minutos, 4/4 h, durante 14 dias + 12 horas de supressão do tratamento. O grupo controle inalou apenas solução salina (NaCl 0,9%). O número de experimentos de cada grupo está apresentado entre parênteses. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (teste "t" de Student). As barras verticais representam os E.P.M.

Tabela 12. CE50 e Resposta Máxima obtidas de curvas concentração-efeito ao carbacol (Cch) realizadas com traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados a ovoalbumina (OVA) 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio (BI).

GRUPO [◇]	CE50 x 10 ⁻⁷ M (I.C.) ^Φ	RESPOSTA MÁXIMA (E.P.M.) [♠]	N [◆]
Controle [♣]	4,77 (2,73 – 8,34)	2,48 (0,19)	5
BI [♥]	9,98 (2,45 – 40,50)	3,48 ^{**} (0,13)	4

◇ Todos os animais foram sensibilizados e desafiados 24 horas antes do experimentos com inalações de OVA nas concentrações de 1mg/ml e 5mg/ml, durante 30 minutos.

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

♠ Média aritmética ± Erro Padrão da Média das Respostas Máximas em gF de tensão desenvolvida.

♥ Animais submetidos à inalações periódicas de brometo de ipratrópio (600μM) com duração de 7 minutos a cada 4 horas durante 14 dias + 12 horas de supressão do tratamento.

♣ Animais submetidos a inalação de solução salina (NaCl 0,9%).

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

◆ Número de experimentos.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O bloqueio prolongado do contato entre uma célula e o seu neurotransmissor determina um aumento da reatividade da mesma a estímulos de qualquer natureza. Cannon (1939), formulou a Lei da Desnervação: “A destruição de uma série de neurônios eferentes impõe uma maior irritabilidade aos agentes químicos na estrutura isolada, sendo os efeitos máximos na parte diretamente desnervada”. Esta maior irritabilidade observada após a desnervação foi denominada supersensibilidade (Cannon & Rosenblueth, 1949). A Lei da Desnervação foi ampliada por Emmelin (1961), para a supersensibilidade observada após o uso crônico de drogas que impedem a neurotransmissão. Este autor sugeriu o termo “desnervação farmacológica”. Fleming et al., (1973) definiram ainda supersensibilidade (SS) como um “fenômeno no qual a quantidade de um agente necessária para produzir uma resposta biológica é menor que a normal”.

Qualquer que seja a resposta biológica considerada, a magnitude da supersensibilidade deve ser avaliada através da obtenção de curvas dose-resposta (CDR). Trendelenburg (1963), ressalta que as medidas quantitativas da supersensibilidade devem ser baseadas na determinação dos afastamentos horizontais entre as CDR dos grupos controle e experimental. No entanto Kalsner (1974), estabeleceu, que a avaliação da sensibilidade às drogas poderia e deveria ser feita também pela determinação do afastamento vertical entre as CDR.

Assim, ficou caracterizado a presença de supersensibilidade não só quando há desvio paralelo da CDR, mas, também quando ocorre aumento

da resposta ponto a ponto e principalmente quando o mesmo ocorre ao nível da Resposta Máxima.

Os resultados aqui apresentados demonstraram que a interrupção do processo de inalação realizado durante 14 dias com o antagonista colinérgico muscarínico, brometo de ipratrópio (BI) (600 μ M, 7 min, 4/4 horas, 14 dias), induziu em traquéias isoladas de ratos, um evidente aumento tempo dependente da resposta contráctil provocada pelo carbacol. Este aumento da resposta contráctil do carbacol se manifestou inicialmente, quando os experimentos eram realizados 4 horas após a interrupção do tratamento e atingiu um valor máximo (dentro da faixa de tempo aqui analisada) 12 horas após a supressão abrupta do tratamento.

As CCE para o carbacol, em traquéias isoladas de ratos, obtidas imediatamente após a inalação única de brometo de ipratrópio (BI) ou imediatamente após o fim do tratamento crônico apresentaram desvio da CCE à direita, e aumento da CE50 em relação ao grupo controle, demonstrando, como esperado, estar o brometo de ipratrópio, agindo como antagonista competitivo por equilíbrio. Nestes experimentos, onde não ocorreu retirada abrupta do brometo de ipratrópio, não foi possível detectar qualquer alteração significativa ao nível da magnitude da Resposta Máxima. Este conjunto de fatos é favorável à idéia de que o aumento das respostas contrácteis desencadeadas pelo carbacol, em traquéias isoladas de rato, estaria relacionado com a interrupção abrupta e com o tempo decorrido após o fim do tratamento crônico com brometo de ipratrópio.

Aparentemente fez-se necessário um certo período de tempo de tratamento, (14 dias), para que ocorressem alterações ao nível da musculatura lisa da traquéia, e também um certo período de tempo de interrupção do

tratamento, para que a ação bloqueadora do brometo de ipratrópio deixasse de se manifestar, desmascarando assim a supersensibilidade que teria se desenvolvido durante o período de tratamento crônico com BI.

Alguns pesquisadores demonstraram a presença de supersensibilidade após o tratamento crônico com antagonistas de receptores. Assim Bernardi et al., (1979) verificaram que a supressão gradativa do tratamento com haloperidol restaura as funções comportamentais de ratos tratados cronicamente. Neste mesmo tratamento, quando os animais são submetidos à retirada abrupta apresentam supersensibilidade a agentes neurolépticos. Friedman et al., (1969) apresentaram evidências de supersensibilidade à resposta hipotérmica a agonistas colinérgicos, medida centralmente. Camundongos receberam escopolamina na água de bebida, por um período de quatro meses, seguido por uma retirada abrupta da droga. A retirada abrupta resultava em hipotermia espontânea e supersensibilidade central aos efeitos hipotérmicos da pilocarpina.

Nos experimentos clássicos com membrana nictante de gatos a supersensibilidade resultante quer do pré-tratamento com reserpina ou por descentralização demonstraram aumento da resposta obtida para a noradrenalina (Fleming & Trendelenburg, 1961). Em seguida, este fenômeno foi classificado como inespecífico porque ficou comprovado que nestas condições também ocorria aumento de resposta para acetilcolina (Trendelenburg & Weiner, 1962), potássio (Fleming, 1973). Westfall (1970), demonstrou que a descentralização e o tratamento com reserpina também produziam em canal deferente de cobaia um quadro de supersensibilidade inespecífica, visto ter demonstrado aumento da responsividade para noradrenalina, metilfurmetide, histamina e potássio.

Nossos resultados demonstraram que a supersensibilidade obtida para a resposta contrátil induzida pelo carbacol em traquéias isoladas de ratos após a interrupção por 12 h do tratamento crônico com brometo de ipratrópio, também se manifestou para outros agonistas e estímulos contráteis. Assim obtivemos supersensibilidade para a serotonina (5HT), cloreto de potássio (KCl) e ao estímulo elétrico.

Sabidamente a serotonina provoca contração da musculatura lisa da árvore respiratória, e mais especificamente da musculatura lisa da traquéia ativando receptores do tipo 5HT₁. O KCl ativa a maquinaria contrátil através da despolarização da membrana e conseqüente entrada de cálcio e a contração do músculo traqueal em resposta ao estímulo elétrico (nos parâmetros utilizados neste trabalho) induz a liberação de mediadores contráteis e relaxantes como Substância P, Neurocinina A, VIP, NO além da própria acetilcolina apresentando como resultado final uma resposta contrátil.

Poder-se-ia tentar explicar a supersensibilidade obtida ao carbacol, que se manifestou após a interrupção do tratamento crônico com brometo de ipratrópio, como sendo uma possível alteração ao nível da estrutura molecular do receptor colinérgico muscarínico, ou mesmo em termos de alteração no número destes receptores. No entanto, nossos resultados demonstraram claramente, que as eventuais alterações que ocorreram durante o tratamento crônico com brometo de ipratrópio, e que se manifestaram, após a interrupção do tratamento, não são específicas para agonistas colinérgicos, são independentes do agonista utilizado, sugerindo assim, a existência de uma alteração que também independe do receptor e que, portanto, deve estar situada na efetuação do sinal transduzido pelo receptor, localizando-se, desta

forma, após o mesmo, ou seja, na intimidade da célula muscular lisa, caracterizando a chamada supersensibilidade pós-juncional ou inespecífica.

Assim os resultados aqui apresentados demonstraram, como já citado, que o tratamento crônico com BI induz, em traquéias isoladas de ratos, um aumento inespecífico da resposta contrátil aos diversos agonistas utilizados, ou seja, uma supersensibilidade que se caracterizou pelo desvio vertical e pelo aumento da Resposta Máxima. Uma justificativa para esta inespecificidade poderia ser a ocorrência de alterações pós-juncionais que estariam presentes e se manifestariam, não importando o método ou agonista iniciador do processo contrátil. Uma situação que é comum a todos os procedimentos, aqui utilizado, e que é condição “sine qua non” para a contratilidade da musculatura lisa é o aumento na concentração intracelular de cálcio.

Ao nível do Sistema Nervoso Central Lau & Gregy (1982) sugeriram que o aumento da atividade da calmodulina e da fosforilação dependente de cálcio teria grande importância na supersensibilidade de receptores dopaminérgicos em corpos estriados de ratos. Ishii & Shimo (1985) ao estudarem a supersensibilidade induzida pela diminuição de temperatura em traquéias e brônquios isolados de ratos, concluíram que o aumento de resposta do músculo liso para acetilcolina poderia ser devido à rápida liberação de cálcio dos estoques intracelulares, inibição da expulsão do cálcio de dentro da célula bem como pela inibição da recaptação do cálcio para os estoques intracelulares.

Gullapalli et al., (2002) sugeriram uma importante participação dos canais de cálcio na regulação da supersensibilidade à resposta analgésica induzida pela morfina após tratamento com naloxona. Na supersensibilidade

por desnervação obtida para a noradrenalina com o canal deferente isolado de rato, a atividade da proteína quinase, e a mobilidade do cálcio são importantes fatores determinantes deste fenômeno (Abraham et al., 2003).

De fato o controle dos níveis intracelulares de cálcio é de fundamental importância para a contração. No músculo liso os níveis intracelulares de cálcio estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de tensão e a contração é regulada, em resposta a estímulos, pelo nível de cálcio citosólico e pela sensibilidade dos elementos contráteis ao cálcio (Karaki et al., 1997).

O mecanismo de influxo de cálcio, que leva a aumento do cálcio intracelular, pode ocorrer por canais de cálcio voltagem dependentes tipo L (conhecidos como VOC), canais não seletivos de cátions (ou canais operados por receptores, ROC), ou pela reversão do mecanismo de troca de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (Karaki et al., 1997). O cálcio liberado do retículo sarcoplasmático (RS) também está envolvido no aumento do cálcio intracelular. A diminuição do nível de cálcio é mediada pelo seqüestro de cálcio para o RS, e a saída de cálcio pela membrana por meio do transporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ (Karaki et al., 1997).

Nos resultados aqui apresentados foi possível demonstrar, em traquéias isoladas de ratos, a participação dos canais de cálcio, na supersensibilidade detectada após a supressão abrupta, do tratamento crônico com brometo de ipratrópio. As CCE obtidas pela adição de CaCl_2 ao líquido de incubação (isento de cálcio), após ter sido obtida resposta contractil ao KCl ou carbacol, as quais avaliaram, respectiva e indiretamente a entrada de cálcio via canais VOC e ROC, demonstraram que após o tratamento crônico e retirada de 12 horas, a entrada de cálcio está facilitada em ambos os tipos de canal de cálcio aqui estudados. Neste tipo de experimento, a entrada de cálcio se faz

pelos canais que foram abertos pelo agonista utilizado. Quando se adiciona carbacol ao líquido de incubação, sem cálcio, a resposta de abertura dos canais de cálcio ROC ocorre, mas, a resposta contráctil não é desencadeada na sua plenitude, pois, não há cálcio do lado de fora da célula que possa entrar para aumentar o cálcio interno.

Estes experimentos foram realizados na presença de EDTA (que quela o cálcio de membrana) e nifedipina (que bloqueia os canais de cálcio VOC). Assim quando o cálcio é adicionado ao meio, nestas condições, a resposta contráctil obtida se faz pelo aumento da concentração interna de cálcio pela entrada via canais do tipo ROC (Cuthbert et al., 1994). Neste mesmo tipo de experimento, quando o agonista previamente adicionado foi o KCl o cálcio estaria entrando principalmente via canais de cálcio do tipo VOC (Cuthbert et al., 1994).

Assim acreditamos poder postular, de acordo com os resultados aqui apresentados, que a supersensibilidade detectada, na retirada abrupta por 12 horas após o tratamento crônico com brometo de ipratrópio, teria um componente relacionado com a facilitação da entrada de cálcio, na célula muscular lisa traqueal, tanto por canais voltagem dependentes (VOC) como por canais operados por receptores (ROC).

O objetivo de estudarmos os efeitos do tratamento crônico e/ou supressão de inalações com BI em animais sensibilizados e desafiados 24 horas após à ovoalbumina foi verificar a validade do nosso modelo de administração e retirada de BI, em uma situação de mimetização do processo asmático (modelo animal), tendo em vista que o BI tem como principal aplicação terapêutica o tratamento da asma.

O modelo animal de asma, caracterizado pela sensibilização e desafio antigênico com a ovoalbumina, induz o aparecimento de hiperreatividade inespecífica, ou seja, o aumento da resposta contrátil obtida para vários agonistas de ação direta (como substância P, neurocinina A e metacolina), bem como a presença de infiltrado inflamatório (Viana et al, 1995) fenômeno este, ainda não totalmente esclarecido, mas que não está relacionado com o fenômeno clássico de supersensibilidade o qual não tem componentes de natureza imunológica/inflamatória como a hiperreatividade (Capaz et al., 1993).

Nos experimentos realizados foi possível demonstrar que imediatamente após o fim do tratamento crônico com brometo de ipratrópio, a presença deste antagonista muscarínico, (não houve aqui tempo para a dissipação do efeito bloqueador) foi capaz de diminuir a contratilidade da traquéia de animais sensibilizados e desafiados a ovoalbumina, deslocando a CCE para a direita. Estes resultados demonstram, o já esperado, efeito terapêutico desta droga.

Verificamos também que ocorreu um incremento adicional na resposta máxima obtida para o carbachol, quando comparamos traquéias isoladas de animais submetidos à retirada abrupta após tratamento crônico com brometo de ipratrópio, com traquéias oriundas de animais que adicionalmente foram submetidos à sensibilização e desafio antigênico à ovoalbumina (24 horas após o desafio). Sugerindo assim, que mesmo em animais onde se desenvolve a hiperreatividade induzida pelo desafio antigênico (modelo animal de asma), a retirada abrupta do brometo de ipratrópio, após tratamento crônico, se manifesta provocando um aumento adicional na Resposta Máxima.

Estes resultados abrem a consideração de que provavelmente a interrupção do tratamento crônico com brometo de ipratrópio em pacientes asmáticos deve ser feita gradual e cuidadosamente, no sentido de evitar a supersensibilidade (“efeito rebote”) que poderia aparecer na retirada abrupta após tratamento prolongado.

Em suma, os resultados aqui apresentados, demonstraram que a supressão abrupta de inalações crônicas, com brometo de ipratrópio desenvolve um quadro de supersensibilidade inespecífica em traquéias isoladas de ratos. Esta supersensibilidade é caracterizada por aumento da responsividade apresentada para diversos agonistas, bem como para o estímulo elétrico. Este fenômeno está presente, mesmo em situações nas quais os animais foram submetidos à sensibilização e desafio antigênico à ovoalbumina.

Este aumento de contratilidade parece estar relacionado com a facilidade da entrada de cálcio na célula por canais voltagem dependentes, (VOC) e operados por receptor (ROC), o que levaria a um aumento na concentração do cálcio intracelular e que, por sua vez, levaria a um aumento da contratilidade da musculatura lisa traqueal. Assim esta hipótese, não descartando outras prováveis possibilidades de alterações intracelulares, poderia ser levada em consideração como justificativa para a presença de supersensibilidade neste modelo.

Desta forma, os resultados aqui apresentados, ainda que colocados de forma preliminar e incipiente, sugerem o cuidado e a retirada gradual do brometo de ipratrópio em pacientes submetidos ao tratamento crônico e prolongado com esta substância.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÕES

- ❖ A interrupção do processo de inalação crônica do brometo de ipratrópio induziu em traquéias isoladas de ratos, um evidente aumento da resposta contrátil provocada pelo carbacol, atingindo o maior valor 12 horas após a supressão abrupta do tratamento crônico.
- ❖ O aumento da resposta contrátil, supersensibilidade, apresentada por traquéias isoladas de ratos, 12 horas após a supressão do tratamento crônico com brometo de ipratrópio, se manifestou para vários outros agonistas bem como para o estímulo elétrico.
- ❖ A supersensibilidade foi detectada também, na resposta contrátil colinérgica obtida em traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados a ovoalbumina, 12 horas após a interrupção abrupta do tratamento crônico com brometo de ipratrópio.
- ❖ O aumento de resposta contrátil observada na musculatura lisa traqueal de ratos 12 horas após o fim do tratamento crônico com brometo de ipratrópio pode ter um componente relacionado com a facilitação da entrada de cálcio, por canais voltagem dependentes e/ou por canais operados por receptores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S.T.; ROBINSON, M.; RICE, P.J. A role protein kinase C in the supersensitivity of the rat vas deferens following chronic surgical denervation.

Pharmacology, 67(1): 32-40, 2003.

ABRAHAM, W.M.; DELEHUNT, J.C.; YERGER L.; MARCHETTE, B. Characterization of a late phase pulmonary response after antigen challenge in allergic sheep. **Am. Rev. Respir. Dis.** 128 (5); 839-44, 1983.

ADELROTH, E.; ROSENTHAL, L.; JOHANSSON, S.; LINDEN, M.; VENGE, P. Inflammatory cells and eosinophilic activity in asthmatics investigated by bronchoalveolar lavage. The effects of antiasthmatic treatment with budesonide or terbutaline. **Am. Rev. Respir. Dis.** P. 142:91; 1990.

ADOCK, I.M.; STEVENS, D.A.; BARNES, P.J. Interactions of glucocorticoids and β_2 -agonists. **Eur. Respir. J.** p. 9:160, 1996.

ALTOUNYAN, R.E.C - Changes in histamine and atropine responsiveness as a guide to diagnosis and evaluation of therapy in obstructive airway disease. In: PEPYS, J. B., FRANKLAND, A. W. Ed. **Disodium cromoglycate in allergic airway disease**. London: Butterworth p. 47-53; 1970.

BAI, T.R. – Role of β_2 -adrenegic receptors. In: PETER J. BARNES, MICHAEL M. GRUNSTEIN, ALAN R. LEFF, ANN J. WOOLCOCK. Ed. **Asthma**. Philadelphia; Lippincott-Raven; p. 985-995; 1997.

BAI, T.R.; MAK, J.C.; BARNES, P.J.; A comparison of beta-adrenergic receptors and in vitro relaxant responses to isoproterenol in asthmatic airway smooth muscle. **Am J. Respir. Cell. Mol. Biol.** p. 6:647;1992.

BARNES, P.J. Airway neuropeptides and asthma. In: VANE, J.R.; HIGGS, G.A.; MARISCO, S.A.; NISTICO, G. Asthma: Basic mechanisms and therapeutic perspectives **Ed. Asthma**. Roma: Pythagora, Cap. 7, p. 127-139; 1989.

BARNES, P.J. Cholinergic control of airway smooth muscle. **Am. Rev. Resp. Dis.** V. 136, p. S42-S45; 1987.

BARNES, P.J. Effect of nedocromil sodium on airway sensory nerves. **J. Allergy Clin. Immunol.** p. 92:182; 1993.

BARNES, P.J. Neural control of human airways in health and disease. **Am. Rev. Resp. Dis.** v. 134, n.6, p.1289-1314; 1986a.

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

BARNES, P.J. Neuropeptides and asthma. **Am. Rev. Resp. Dis.** V.143, p.528-532; 1991.

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

BARNES, P.J. CHUCG, K.F.; PAGE, C.P. Inflammatory mediators and asthma. **Pharmacol. Ver.** V.40, n.1, p.49-84; 1988.

BARNES, P.J.; RADGER, I.W.; THOMSON, N.C.; Asthma – Basic mechanisms and clinical management . **London Academic Press**. 3ed., 1988.

BEASLEY, R.; ROCHE, W.R.; ROBERTS, J.A.; HOLGATE, S.T. Cellular of the late asthmatic response by antigen-specific immunoglobulin G in animal model. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 130, p. 1134-1139, 1984.

BELLOFIORE, S.; MARIN, J.G. Antigen challenge of sensitized rats increases airways responsiveness to methacoline. **J. Appl. Physiol.** v.65, n.4, p.1624-1646, 1988.

BERNARDI, M.M.; PALERMO NETO, J. (1979) Effects in abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open-field behavior of rats. **Phychopharmacology.**, 1979.

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

BRITISH THORACIC SOCIETY, Guidelines for management of asthma. **Br Med. J.**; 300:776; 1993.

BROWN, H.M.; TOREY, G.; GEORGE, W.H.S. Beclomethaseone dipropionate Anew steroid aerosol for the treatment of allergic asthma. **Br. Med. J.**; 1:585; 1972.

CANON, W.B.(1939). A law of denervation. **Amer. J. Med. Sci.**, 198:737 apud STAVRAKI, G.W. University of Toronto Press Canada, 1961.

CANON, E. B.; ROSENBLUETH, A. **The supersensitivity of denervated structures.** New York. The MacMilan Company. 1949.

CAPAZ, F.R.; RUFFIÉ,C.; LEFORT, J.; MANZINI, S.; VARGAFTIG, B.B; PRETOLANI, M. Effect of active sensibilization on the bronchopulmonary to tachykinins in teh guinea pig. Modulation by peptidase inhibitors. **J. Pharmac. Exp. Ther.**, v. 266, n.2, p. 812-819; 1993.

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

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

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

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

COLLIER, H.O.J.; JAMES, G.W.L. Humoral factors affecting pulmonary inflammation during acute anaphilaxis in the guinea pig in vivo. **Br J. Pharmacol. Chemoter.**, v.30, p. 283-301, 1967.

CUTHBERT, N.J.; GARDINER, P.J.; NASH, K.; POLL, C.T. Roles of Ca^{2+} unflux and intracellular Ca^{2+} release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. **Am J. Physiol.**, v.266, p. L620-L627, 1994.

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

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

Dicionário de Especialidades Farmacêuticas. 32^a Ed., Jornal Brasileiro de Medicina, 2003/04.

DUNNILL, M.S. The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial mucosa. **J. Clin. Pathol.**, v. 13, p. 27-33, 1960.

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

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

FAHY, J.V.; BOUSHEY, H.A. Controversies involving inhaled β -agonist and inhaled corticosteroids in treatment of asthma. **Clin. Chest Med.** 16:715, 1995.

FAULDS, D.; HOLLINGSHEAD, L.M.; GOA, K.L. Formoterol. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in reversible obstructive airway disease. **Drugs** 42:115, 1991.

FLEMMING, W.W.; Mc PHILLIPS, J.J.; WESTFALL, D.P. Post junctional supersensitivity and subsensitivity of excitable tissue to drugs. **Ergebn. Physiol.**, 68:55-119, 1973.

FLEMMING, W.W.; TRENDLENBURG, U. Development of supersensitivity to norepinephrine after pretreatment with reserpine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** , 133:41-51, 1961.

FLEMMING, W.W.; URQUILLA, P.R.; TAYLOR, D.A.; WESTFALL, D.P. Electrophysiological correlations with postjunctional supersensitivity. **Fed. Proc.** 34(10): 1981-1984, 1975.

FLEMMING, W.W.; WESTFALL, D.P.; DE LA LAND, I.S.; JELLETT, L.B. Log normal distribution of equieffective dose of norepinephrine and acetylcholine in several tissue. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** V.181, p. 339-345, 1972.

FRIEDMAN, J.M.; JAFFE, J.H.; SHARPLESS, S.K. Central nervous systems supersensitivity to pilocarpine after withdrawal of chronically administered scopolamine. **Advanc. Drug. Res.**, 3: 21-55, 1969.

GALANT, S.P.; DURISSETI, L.; UNDERWOOD, S.; Beta-adrenergic receptors of polymorphonuclear particulates in bronchial asthma. **J. Clin. Invest.** 65:577, 1980.

GALANT, S.P.; DURISSETI, L.; UNDERWOOD, S.; Decreased beta-adrenergic receptors on polymorphonuclear leukocytes after adrenergic therapy. **N. Engl. J. Med.** 299:933, 1978.

GOODMAN, L.S.; GILMAN A.; Fármacos usados no tratamento da asma. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 9ª edição Mc. Graw Hill, 1997.

GEORGE, D.L. Chronic obstructive pulmonary disease treatment options. **J. Manag. Care Pharm.** 10 Review, Jul, 2004.

GROSS, N.J.; SKORODINI, M.S. Anticholinergic, antimuscarinic bronchodilators. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v.129, p. 856-870, 1984.

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

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

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

HOLGATE, S.T.; HARDY, C.C.; ROBINSON, C.; AGIUS, R.M.; HOWARTH, P.H. The mast cell as a primary effector cell in the pathogenesis of asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 77, p. 274-282, 1986.

HOWARTH, P.H.; DURHAM, S.R.; LEE, T.H.; CHUCH, M.K.; HOLGATE, S.T. Influence of albuterol, cromolyn sodium and ipratropium bromide on the airway circulating mediator response to allergen bronchial provocation in asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.132, p. 986-992, 1985.

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

HUGHES, J.M.; SEALE, J.P.; TEMPLE, D.M. Effect of fenoterol on immunological release of leukotrienes and histamine from human lung in vitro: selective antagonism by β -adrenoreceptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.** 95:239, 1983.

HUTSOM, P.A.; **Investigations into the mechanisms of late phase response in guinea pig airways.** 1989.282f. Thesis (Doctor of Philosophy) – Faculty of medicine University of Southampton, 1989.

IKENO, N.; FURUTA, M.. YAMAHARA, N.S.; OHYA, S.; IMAIZUMI, Y.; WATANABE, M. Molecular análisis of non-specific supersensitivity induced by AF64A in rat irir smooth muscle. **J. Smooth Muscle Res.** 36(2):47-56, 2000.

ISHII, T.; SHIMO, Y.; Cooling-induced supersensitivity to acetylcholine in the isolated airways smooth muscle of the rat. Naunyn Schmied. **Arch. Pharmacol.**, 329(2): 167-75, 1985.

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

JEFFIES, E.; PARÉ, P.D.; HOGG, J.C.; Measurements of airways edema in allergic bronchoconsction in guinea pig. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v.123, p.387-388, 1981.

JOOS, G.F.; GERMONPRE, P.R.; PAUWELS, R. A.; Neural mechanisms in asthma. **Clin. Exp. Allergy**, v. 30, n.1, p. 60-65, 2000.

JOOS, G.F.; PAUWELS, R.A.; Mechanisms involved in neurokinin-induced bronchoconstriction. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v.330, p.132-146, 1990.

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

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

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

KALSNER, S.; A new approach to the measurement and classification of forms of supersensitivity of autonomic effector responses **Brit. J. Pharmacol.** 51: 427-34, 1974.

KARAKI, H.; SATO, K.; NAKAZAWA, H. ; Calcium movements, distribution and functions in smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 49, n.2, 1997.

LAITINEN, L.A.; HEINO, M.; LAITINER, A.; KAVA, T.; HAAHTELA, T.; DUNNILL, M.S. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 131, p. 599-606, 1985.

LAITINEN, L.A.; LAITINEN, A. Innervation of airways smooth muscle. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 136, p. W38-S42, 1987.

LAY, Y.S.; GNEGY, M.E. Chronic haloperidol treatment increased calcium-dependent phosphorylation in rat striatum. **Life Sci.**, 4; 302(1): 21-8, 1982.

LEFF, A.R.; HAMANN, K.J.; WEGNER, C.D. Inflammation and cell-cell interactions in airway hiperresponsiveness. **Am J. Physiol.**, v. 260, p. L189-206, 1991.

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

LUNDBERG, J. M.; BRODIN, E.; HUA, X.; SARIA, A. Vascular permeability changes and smooth muscle contraction in relation to capsaicin-sensitive substance P neurons with special reference to the trachea and lungs. **Acta. Physiol. Scand.**, v. 119, p. 243-252, 1983.

LUNDBERG, J.M.; BRODIN, E.; HUA, X.; SARIA, A. Vascular permeability changes and smooth muscle contraction in relation to capsaicin-sensitive substance P afferents in the guinea-pig. **Acta. Physiol. Scand.**, v. 120, p. 217-227, 1984.

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

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

MYGIND, N.; CLARK, T.J.H. Topical steroid treatment for asthma & rhinitis. London, **Ballière Tindall**, 1980.

OATES, J.A.; WOOD, A.J.J. Drug therapy a new approach to the treatment of asthma. **N. Engl. J. Med.**, v. 321, n. 22, p.1517-1527, 1989.

PALMER, J.B.; BARNES, P.J. Neuropeptides and airways smooth muscle function. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 136, p. S50-S54, 1987.

PEPYS, J. Clinical and therapeutic significance of patterns of allergic reactions in the lungs to extrinsic agents. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 116, p. 573-588, 1977.

PEPYS, J. Immunopathology of allergic lung disease. **Clin. Allergy**, v.3, p. 1-22, 1973.

PEPYS, J.; HUTCHCROFT, B.J. Bronchial provocation test in etiologic and analysis of asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 112, p. 829-859, 1975.

PRETOLANI, M.; LEFORT, J.; DUMAREY, C.; VARGAFTIG, B.B. Role of lipoxygenase metabolites for the hyperresponsiveness to platelet-activating factor of lungs from actively sensitized guinea pigs. **J.Pharmacol. Exp. Ther.** 248(1): 353-359, 1989.

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

RAND, T.H. CRUIKSHANK, W.W.; CENTER, D.M.; WELLER, P.F. Human eosinophils share with other CD4 + leukocytes responsiveness to lymphocyte chemoattractant factor. **FASEB J.**, v.4, p. A1699, 1990, Abs28.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Sistema respiratório. ____.
Farmacologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. Cap. 17, p.
280-291.

RICHARDSON, J.B. Nerve supply to the lungs. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 119,
n.5, p. 785-802, 1979.

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

RODRIGO, G.; RODRIGO, C.; BURSCHTIN, O. A meta-analysis of the effects
of ipratropium bromide in adults with acute asthma. **Am. J. Med.**, 1999.

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

ROSS, H.M.; REITH, E.J.; ROMRELL, L.J. Sistema respiratório. ____.
Histológica: texto e Atlas. 2Ed. São Paulo: Panamericana, 1993. Cap. 18, p.
501-525.

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

SEALES, J.P.; Whither beta-adrenoreceptor agonists in treatment of asthma?
Proc. Clin. Biol. Res. 263:367, 1988.

SEGAL, M.S.; LEVINSON, L.; BRESNIK, E. Evaluation of therapeutic substance employed for the relief of bronchospasm. VI. Aminophiline. **J. Clin. Invest.** 28:1190, 1949.

SEKIZAWA, K.; FUKUSHIMA, T.; IKARASHI, Y.; MARUYAMA, Y.; SASAKI, H. The role of nitric oxide in cholinergic neurotransmission in rat trachea. *Br. J. Pharmacol.* 110(2): 816-820, 1993.

SHAMPAIN, M.P.; BEHRENS, B.L.; LARSEN, G.L.; HENSON, P.M. An animal model of late pulmonary response to *Alternaria* challenge. **Am Rev. Respir. Dis.**, v.126, n.3, p. 493-498, 1982.

SHARPLESS, S.K.; JAFFE, J.H. The electrical excitability of isolated cortex during barbiturate withdrawal. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 151(2): 321-329, 1966.

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

THESLEFF, S. Trophic functions of the neuron II Denervation and regulation of muscle. Physiological effects of denervation of muscle. **Am N Y Acad. Sci.** 228(U): 89-104, 1974.

TRENDELENBURG, U. Supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines. **Pharmacol. Rev.**; 15: 225-76, 1963.

TRENDELENBURG, U. Transmission of preganglionic impulses through the muscarinic receptors of the superior cervical ganglion of the cat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 154(3):426-440, 1966.

TRENDELENBURG, U.; WEINER, N. Sensitivity of the nictitating membrane after various procedures and agents. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 136: 152-61, 1962.

VAN DER VELDEN, V.H.; HULSMANN, A.R. Autonomic innervation of human airways: struture, function and pathophysiology in asthma. **Neuroimmunomodulation**, v. 6, n.3, p. 145-159, 1999.

VAN NEIUWSTADT, R.A.; HAJER, R.; BREUKING, H.J. Autonomic innervation of the airways. **Vet. Q.**, v.16, n.2, p. 110-114, 1994.

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

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

WATANABE, A.; MISHIMA, H. Allergen-induced biphasic bronchoconstriction in rats. **Int. Arch. Appl. Immunol.**, v. 93, p. 26-34, 1990.

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

WEINBERGER, M.; HENDELES, L; Theophyline in asthma. **N. Engl. J. Med.**; 334:1380, 1996.

WESTFALL, D.P. The effect of reserpine treatment and decentralization on the ion distribution in the vas deferens of guinea pig Brit. **J. Pharmacol.**, 39: 121-7, 1970.

WESTBY, M.; BENSON, M.; GIBSON, P. Anticholinergic agents for chronic asthma in adults. **Cochrane Database Syst. Rev.** 2004;(3).

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

ZAAGSMA, J.; VAN AMSTERDAM, R.G.; BROUWER, F.; VAN DER HEIJDEN, P.J.; VAN DER SCHARR, M. W.; VERWEY, W.M.; VEENSTRA, V. Adrenergic control of airway function. **Am. Rev. Respir. Dis.** , v.136, p. S45-50, 1987.