

## Por debaixo do brônquio

**Hisbello S. Campos\***

- Médico do Centro de Referência Prof Hêlio Fraga, Fundação Nacional de Saúde, MS.

Endereço para correspondência: Rua do Catete, 311 / 710

Largo do Machado 22220-001 Rio de Janeiro, RJ.

Tels: 285-7737 285-3230

### Resumo

O autor apresenta revisão sobre o papel de diferentes células (eosinófilo, mastócito, neutrófilo, monócito, plaqueta e linfócito) no processo asmático, enfocando mecanismos envolvidos na inflamação crônica das vias aéreas e na determinação da gravidade da asma. Apresenta também alguns aspectos envolvidos na gênese dos sintomas asmáticos, enfocando a participação dos mecanismos neurais. Comenta particularidades do mecanismo de ação dos principais medicamentos anti-asmáticos neste processo, apresentando alguns aspectos da cronobiologia e da cronoterapia envolvidos na asma.

### Summary

The author presents a review about the action of different cells (eosinophil, mastcell, neutrophil, monocyte, platelet and lymphocyte) on the asthmatic process, focusing on the mechanisms involved in chronic airway inflammation and on determination of asthma severity. He also presents some aspects involved in the mechanisms of asthmatic symptomatology, focusing on the neuronal effector mechanisms, and comments the particularities of actuation of the main anti-asthmatics drugs in this process, presenting some aspects of medical chronobiology and chronotherapeutics involved in asthma.

**Palavras-chave:** Biologia molecular na asma; papel do mastócito, eosinófilo, neutrófilo, monócito, plaqueta e linfócito na asma; inflamação das vias aéreas na asma; determinantes de gravidade na asma; mecanismos de ação dos principais medicamentos anti-asmáticos, cronobiologia e cronoterapia na asma.

**Key-words:** Molecular biology in asthma; mast cell, eosinophil, neutrophil, monocyte, platelet and lymphocyte in asthma; airway inflammation in asthma; determinants of asthma severity; mechanisms of action of the main anti-asthmatics drugs; medical chronobiology and chronotherapeutics involved in asthma.

### Introdução

A asma brônquica, entidade clínica apaixonante e complexa, plena de paradoxos, é semelhante a um quebra-cabeça em que faltam peças. O avanço do conhecimento da biologia molecular vem, pouco a pouco, incorporando novas peças ao jogo, possibilitando melhor compreensão dos finos e intrincados mecanismos nela envolvidos.

Embora, por muito tempo, a hiper-responsividade brônquica (HRB) tenha sido considerada a marca registrada da asma, a inflamação das vias aéreas é a anormalidade básica no asmático. Cada vez mais, as alterações inflamatórias e sua gênese nos brônquios vão sendo melhor compreendidas e o eixo do tratamento vai sendo desviado da broncodilatação pura para a correção e prevenção da inflamação. Até recentemente, o estudo do papel da inflamação na patogênese da asma era limitado a estudos funcionais suplementados com inferências da investigação das células inflamatórias e de seus produtos no sangue periférico, e a estudos *pos-mortem*. Com o advento da broncofibroscopia, que possibilitou analisar o meio celular das vias aéreas em diferentes fases do processo asmático, a contribuição da inflamação na fisiopatologia da asma pôde ser melhor estudada. Com isso, dia-a-dia novos conhecimentos são agregados e o tratamento do asmático possibilita obter resultados cada vez melhores.

Infelizmente, como na maior parte das áreas do conhecimento médico, há um hiato por vezes exagerado entre a descoberta e sua aplicação prática. Apesar de, há pelo menos uma década, dogmas terem sido der-

rubados, conceitos fundamentais terem sido revistos, prioridades terapêuticas terem sido modificadas, parte importante dos asmáticos ainda é tratada como há décadas atrás, sendo-lhes sonhada melhor qualidade de vida que poderia ser oriunda de melhor controle de seus sintomas. No presente artigo, procurou-se apresentar revisão sucinta de parte do conhecimento adquirido nos últimos anos sobre as alterações celulares e estruturais observadas no asmático, enfocando suas repercussões no tratamento do asmático.

### Inflamação das vias aéreas

A história natural da asma pode ser dividida em fases distintas, começando pela associação predisposição genética/exposição ao agente causal, seguida pela sensibilização, desenvolvimento de inflamação crônica das vias aéreas, início dos sintomas asmáticos, persistência desses sintomas, desenvolvimento de asma persistente e, finalmente, remodelagem irreversível das vias aéreas. Há 3 componentes distintos na inflamação das vias aéreas. O primeiro, e mais facilmente reconhecível, consiste na infiltração da parede brônquica e do lumen por células não habitualmente lá encontradas – basicamente eosinófilos e linfócitos  $T_{H2}$ . Esses últimos, ao serem reestimulados por antígenos, produzem interleucinas 3, 4 e 5 (IL-3, IL-4, IL-5) e fator estimulante de colônias – granulócitos/macrófagos (FEC-GM), mas não interferon  $\gamma$  (IF  $\gamma$ )<sup>1</sup>. A ação dessas citocinas, secundárias à exposição alérgica, leva à diferenciação dos linfócitos B e conseqüente produção de IgE. Por isso, acredita-se que o linfócito T tenha o papel de maestro das respostas celulares inflamatórias na asma. O segundo é uma mudança na quantidade ou na capacidade de participar da resposta inflamatória de células normalmente residentes na via aérea. Dessa forma, essas células passam a ter fenotipo mais pró-flogístico. O terceiro é representado pelas alterações nos componentes não-celulares da parede brônquica, observadas por seu "espessamento", que reflete a deposição de fibras tipo III e V sob a membrana basal, dando-lhe a aparência de estar espessada<sup>2</sup>, e a produção de líquido tanto na superfície epitelial como no tecido conectivo que ocupa o espaço entre o epitélio e o músculo liso. A parede brônquica espessada mecanicamente amplifica mudanças na luz brônquica e é parcialmente responsável pela hiper-responsividade brônquica<sup>3,4,5</sup>.

Com a maior parte do conhecimento sobre a anatomopatologia das vias aéreas do asmático provém de

achados de autópsia, não se sabe ao certo em que extensão as alterações *pós-mortem* refletem a variada apresentação clínica da asma. Após a introdução da lavagem broncoalveolar (LBA), o estudo das alterações inflamatórias nas vias aéreas asmáticas trouxe enorme quantidade de novos conhecimentos que vêm ajudando na compreensão dos mecanismos patogênicos da doença. A análise de células e de mediadores no líquido do lavado broncoalveolar, em conjunto com material de biópsia da mucosa brônquica, confirmou que o eosinófilo e o mastócito são as principais células efetoras da resposta inflamatória, mesmo na ausência de evidências de atopia<sup>6,7</sup>. As alterações anatomo-patológicas rotineiramente encontradas, embora possam variar em intensidade, podem ser atribuídas ao processo inflamatório e são encontradas em toda a árvore brônquica. Elas incluem: oclusão da luz brônquica com mistura de muco, proteínas séricas e fragmentos celulares; descamação epitelial; aparente espessamento da membrana basal epitelial; edema e infiltração leucocitária (principalmente eosinófilos e linfócitos) na submucosa e hipertrofia das glândulas mucosas e da musculatura lisa peribrônquica<sup>8,9</sup>. Exceto, talvez, a infiltração eosinofílica, nenhuma das alterações acima é patognomônica de asma, mas, juntas, constituem sua apresentação anatomo-patológica típica.

**Muco espesso** – Produção aumentada de muco viscoso que impacta na luz da via aérea é um achado comum em autópsias de pessoas que morreram por asma. Os fatores que governam a secreção de muco e sua composição são complexos e envolvem tanto fatores humorais como o sistema nervoso autônomo. Não apenas a estimulação vagal e dos nervos simpáticos aumenta a secreção de muco nas vias aéreas<sup>10,11</sup> como, pelo menos em algumas espécies, resposta secretória à estimulação do sistema nervoso não-adrenérgico e não-colinérgico pode ser demonstrada, provavelmente envolvendo a liberação de um polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP)<sup>12</sup>. Os neuropeptídeos vêm crescendo de importância na asma, já que estão demonstrados seus efeitos sobre o calibre das vias aéreas, sobre os vasos sanguíneos e sobre as secreções brônquicas. O *peptídeo vasoativo intestinal* (VIP) e o *peptídeo histidina metionina* (HMP) são potentes broncodilatadores e podem ser neurotransmissores do sistema nervoso não-adrenérgico broncodilatador. Outros, como a substância P e a neurocinina A têm efeitos inflamatórios<sup>13</sup>. Entretanto, ainda não está definitivamente estabelecida, em humanos, a contribuição da substância P<sup>14</sup> e das neu-

rocininas A e B<sup>15</sup>, reconhecidas estimuladoras da secreção de muco. É possível que os leucotrienos C<sub>1</sub> e D<sub>1</sub><sup>16</sup>, a prostaglandina F<sub>2α</sub><sup>17</sup> e o ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico (15-HETE)<sup>18</sup> também participem da maior produção de muco pelo asmático. Além do excesso de muco, o transporte de água através do epitélio da via aérea é influenciado pela inalação de alérgenos e por diversos mediadores inflamatórios, tornando o muco espesso<sup>19, 20, 21</sup>. Redução da depuração mucociliar também é um aspecto comum na via aérea do asmático, mesmo quando a doença está em remissão<sup>22, 23</sup>. Ela pode ser atribuída ao dano estrutural e funcional do sistema ciliar do brônquio. Embora apenas a redução no número de células ciliadas não seja suficiente para explicar o distúrbio no *clearance*<sup>24</sup>, estudos com microscopia eletrônica em brônquios de asmáticos demonstram a destruição dos cílios<sup>25</sup> e sua regeneração após tratamento com corticosteróides<sup>26</sup>.

**Edema** – O edema da parede do brônquio e a presença de quantidades elevadas de proteínas plasmáticas<sup>27, 28</sup> nas vias aéreas do asmático indicam extravasamento microvascular. Normalmente, a vasculatura brônquica tem função homeostática, aquecendo e umidificando o ar inspirado. Entretanto, quando as vias aéreas estão inflamadas, a permeabilidade endotelial aumenta e o leito vascular serve como fonte de leucócitos e de mediadores com ação local. O vazamento de plasma pode ocorrer independentemente da diapedese celular. A passagem de proteínas plasmáticas para o espaço extravascular adiciona mediadores inflamatórios derivados dos sistemas do complemento, da coagulação, da fibrinólise e das cininas ao local, amplificando e perpetuando a resposta inflamatória<sup>8</sup>. Especula-se que os mecanismos responsáveis pelo extravasamento microvascular observado na asma envolvam a contração de células endoteliais nas vênulas pós-capilares induzida por neuropeptídeos<sup>29</sup> e mediadores broncoconstritores<sup>30</sup>. Estudos com microscopia eletrônica<sup>31</sup> sugeriram relação causal entre a intensidade do edema e o número de células inflamatórias presentes no corte tecidual à perda de células ciliadas, indicando que a inflamação e conseqüente edema podem contribuir para a descamação epitelial. Esta, por sua vez, contribui para a perpetuação do processo inflamatório. Os mecanismos pelos quais a descamação epitelial pode contribuir para HRB são:

- 1) facilitação do acesso de fatores irritantes às terminações nervosas;
- 2) acentuação da penetração de partículas aler-

gênicas na submucosa, onde se ligariam a células secretoras de mediadores;

- 3) diminuição da produção de substâncias broncodilatadoras derivadas do epitélio e de endopeptídeos neurais<sup>32, 33, 34</sup>. O epitélio brônquico não é apenas uma barreira protetora já que ele gera mediadores e desempenha papel ativo na regulação do tono broncomotor. Quando estimulados, tanto o epitélio brônquico como o traqueal liberam uma série de produtos oxidativos derivados do ácido araquidônico, sendo que os mais importantes na homeostase das vias aéreas são: prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)<sup>35</sup>, 15-HETE e o ácido 8,15-hidroxi-eicosatetraenóico (8,15-HETE)<sup>36</sup>.

**Espesamento da membrana basal** – Embora, por muito tempo, o espesamento da membrana basal tenha sido considerado patognomônico da asma, estudos de autópsia e de ressecções cirúrgicas documentaram sua presença em outras doenças pulmonares, como na bronquite crônica, na bronquiectasia, na tuberculose e no câncer<sup>8</sup>. Entretanto, estudos morfológicos recentes demonstraram que a membrana basal mantém espessura normal na asma<sup>37, 38, 39</sup>. Na verdade, depósitos densos de fibrilas colágenas (fibras tipo III e V)<sup>2</sup> sob a "verdadeira" membrana basal eram a anormalidade que, equivocadamente, interpretava-se como espesamento da membrana à microscopia convencional<sup>38</sup>. O mecanismo pelo qual a inflamação contribui para a deposição de colágeno ainda não está esclarecido, e também se o tratamento anti-inflamatório é capaz de influenciar esta ação. Da mesma forma, ainda não está claro se o espesamento colágeno contribui para a aceleração da velocidade de queda da função pulmonar com a idade que acontece nos asmáticos.

**Infiltração celular** – Infiltração abundante de células inflamatórias nas paredes das vias aéreas é um achado rotineiro de autópsia em asmáticos. Segundo a maior parte dos relatos, os eosinófilos predominam, mas também neutrófilos, linfócitos e células plasmáticas são rotineiramente descritos<sup>40, 41</sup>. Existem evidências de que diferentes células participam do processo inflamatório no brônquio asmático: linócitos, eosinófilos, mastócitos, neutrófilos, células epiteliais, células musculares lisas interagem de forma ainda não totalmente esclarecida promovendo, amplificando e perpetuando a resposta inflamatória. As células endoteliais formam a barreira entre o sangue e os tecidos e são reguladores importantes da reação inflamatória. O recrutamento de células inflamatórias a partir do sangue inicia-se pela aderência dos leucócitos às células endoteliais, com sub-

seqüente migração das células aderentes através do endotélio para o tecido<sup>12</sup>. A adesividade do endotélio vascular pode ser marcadamente aumentada por citocinas inflamatórias, tais como: fator de necrose tumoral  $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ), IF $\gamma$  e IL-4. Após a adesão ao endotélio vascular, os leucócitos rompem a barreira endotelial e movem-se pelo intestício com movimentos amebóides, estimulados por fatores quimiotáticos<sup>13</sup>. Na asma, por ação das moléculas de adesão específicas (ICAM-1, VCAM-1, selectina-E e selectin-P), reguladas por diferentes citocinas (IL-1, IL-4, FNT- $\alpha$  e IF $\gamma$ ) há recrutamento seletivo de células inflamatórias<sup>14</sup>.

**Mastócito** – Mastócitos têm papel chave na asma. Imediatamente após a inalação de antígenos, os mastócitos presentes na via aérea são ativados pela ligação do antígeno aos receptores da IgE em sua superfície. Poucos minutos após ativado, uma única célula libera cerca de 1.000 grânulos contendo mediadores pré-formados (histamina e triptase, p. ex.) e citocinas (IL-4, IL-5, IL-6 e FNT- $\alpha$ )<sup>11</sup>. Mediadores lipídicos também são produzidos após a degranulação da célula através do metabolismo do ácido araquidônico (LTC<sub>4</sub> e PGD<sub>2</sub>, p. ex.). Histamina, LTC<sub>4</sub> e PGD<sub>2</sub> são potentes broncoconstritores, aumentam a permeabilidade vascular e a produção de muco. Em alguns animais, a triptase é capaz de digerir a membrana basal de vasos sanguíneos e aumentar a HRB<sup>14</sup>. As IL-4, 5 e 6 e o FNT- $\alpha$  recrutam e ativam outras células inflamatórias. Em síntese, iniciam a reação imediata e contribuem para a resposta tardia pós-inalação de antígeno. Por outro lado, há indícios de que ele module a resposta alérgica através da liberação de substâncias anti-inflamatórias, como a heparina<sup>15</sup>, que inibe o trânsito e a ativação do linfócito.

**Eosinófilo** – A participação do eosinófilo no processo inflamatório brônquico da asma é tão íntima que, na ausência de outras doenças associadas à eosinofilia, infiltração intensa de eosinófilos nas vias aéreas é considerado diagnóstico de asma<sup>16</sup>. Deriva daí a denominação de *bronquite eosinofílica crônica* como um rótulo para a asma, do ponto de vista anátomo-patológico<sup>17</sup>. O eosinófilo ocupa papel central na geração da inflamação da via aérea, já estando demonstrado que a quantidade total de eosinófilos circulantes ou no lavado brônquico e em material de biópsia brônquica<sup>18</sup>, aumenta proporcionalmente com a gravidade da obstrução ao fluxo aéreo. Inúmeros fatores implicam o eosinófilo na patogenia da asma. Por exemplo, essa célula aparece nas vias aéreas horas depois da inala-

ção de antígeno e persiste por mais de 48 horas<sup>11</sup>; há evidências de que ela seletivamente bloqueie os receptores colinérgicos M2, contribuindo para o incremento da sensibilidade colinérgica<sup>14</sup>. Quando ativado, o eosinófilo libera o conteúdo de seus grânulos e outros mediadores. As proteínas contidas em seus grânulos – proteína básica principal (PBP), proteína catiônica eosinofílica (PCE) e neurotoxina derivada do eosinófilo (NDE) e a peroxidase eosinofílica (PE) têm potente ação sobre a via aérea e sobre a função celular<sup>19</sup>. A PBP não apenas é citotóxica e capaz de lesar diretamente o epitélio brônquico, como promove a HRB, provoca contração do músculo liso e estimula mastócitos e basófilos a liberarem histamina. Dentre os mediadores liberados pelo eosinófilo ativado, destacam-se o LTC<sub>4</sub> (broncoconstrictor) e o fator ativador de plaquetas (PAF), que não só provoca a contração do músculo liso como incrementa a HRB e causa agregação e ativação de neutrófilos e macrófagos. Além disso, o eosinófilo também produz IL-3 e 5 e FEC-GM, os quais por sua vez promovem diferenciação, quimiotaxia e ativação de mais eosinófilos, amplificando o processo inflamatório<sup>11</sup>.

**Linfócito T** – A cronicidade da doença e a duração por vezes prolongada do processo inflamatório das vias aéreas contrapõem-se à vida curta das células discutidas acima. Como linfócitos têm períodos maiores de vida, têm memória imune, podem ser ativados por antígenos, sendo encontrados em maior número (T<sub>H</sub> CD4+) no lavado bronquioalveolar e nas biópsias brônquicas de asmáticos, seu papel na asma passou a ser enfocado como um dos maestros que regem o processo inflamatório brônquico. Durante a apresentação do antígeno, tanto o linfócito T como a célula apresentadora (linfócito B ou macrófago) tornam-se ativados. Quando o macrófago é a célula apresentadora, a ativação resulta na secreção de IL-1 e FNT- $\alpha$ , ambos com efeitos pró-inflamatórios. Os T<sub>H</sub> CD4+ dividem-se em 2 subpopulações: T<sub>H1</sub> e T<sub>H2</sub>. A ativação dos primeiros pode ser importante nas defesas contra organismos intracelulares, vírus e antígenos neoplásicos. Há evidências de que a ativação do T<sub>H2</sub> pode estar envolvida na patogênese da inflamação alérgica<sup>11</sup> e que aumenta a expressão de IL-4, que é utilizada na síntese de IgE.

**Outras células** – Apesar de seu grande potencial inflamatório, através da liberação de enzimas lisossômicas, metabólitos do oxigênio, LTB4 e fator liberador de histamina (FLH), o papel do neutrófilo na asma ainda não está esclarecido. Da mesma forma, o

papel das plaquetas, capazes de gerar mediadores inflamatórios importantes (PAF e FLH, p. ex.), ainda não foi definido com exatidão, já que diversas outras células (macrófagos alveolares, eosinófilos e neutrófilos) também produzem os mesmos mediadores. O macrófago ativado secreta substâncias quimiotáticas potentes (LTB<sub>4</sub>, PAF e diversos peptídeos)<sup>50, 51</sup>, podendo funcionar como promotor do recrutamento linfocitário durante a fase tardia da reação asmática, incrementando a HRB.

Caracteristicamente, a asma tem variado espectro clínico, podendo ser vista como uma transição de doença leve, intermitente, associada a exposição a alérgenos, passando por uma fase onde há inflamação crônica das vias aéreas, até obstrução fixa ao fluxo aéreo. Numa ponta do espectro, nas formas mais leves da doença, citocinas liberadas pelos mastócitos (FNT- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, 5 e 6, e IF  $\gamma$ ) aumentam a expressão de moléculas endoteliais de adesão, a infiltração de leucócitos e a ativação de eosinófilos. Na fase intermediária, além dos produtos acima, proteases neutras (triptase e quimase) derivadas dos mastócitos, em conjunto com produtos derivados dos linfócitos T, conjugam-se na determinação do processo inflamatório crônico, resultante, principalmente, da ativação dos eosinófilos. Os fatores determinantes da outra ponta do espectro – asma grave, corticosteróide dependente – estão intimamente ligados ao linfócito T. Finalmente, a produção de citocinas pelas células epiteliais do brônquio (IL-8, FECGM, FGFb, FCT- $\beta$  e FCPD) e miofibroblastos subepiteliais, não só mantêm a resposta inflamatória na asma grave, como também participam do remodelamento das vias aéreas, típico das formas graves<sup>52</sup>.

### Sintomas asmáticos

O estudo dos mecanismos responsáveis pelos sintomas da asma nos remete aos mastócitos e às células nervosas do trato respiratório. O papel efetor dos mastócitos está sobejamente demonstrado<sup>52, 53, 54</sup>, não sendo objeto desse artigo revê-lo com profundidade. Entretanto, a participação dos mecanismos neurais na sintomatologia da asma vem sendo melhor compreendida e será sucintamente abordada.

Os mecanismos envolvendo mastócitos presentes no epitélio brônquico provavelmente são responsáveis pela expressão clínica da asma leve a moderada, incluindo o broncoespasmo e sibilos conseqüentes a inalação de alérgenos, ao exercício e a outros "provocadores" de

mastócitos. A resposta asmática imediata que se segue à inalação de antígenos por pessoas sensibilizadas resulta na ativação do mastócito por um mecanismo dependente de IgE, com subsequente liberação de mediadores. O broncoespasmo resultante da ativação dos mastócitos e liberação de mediadores inflamatórios expressa-se pela dispnéia e sibilos que o asmático apresenta ao ter contato com seus fatores desencadeantes de sintomas ("gatilhos") rotineiros.

Os nervos autonômicos regulam diversos aspectos das vias aéreas, incluindo o tono da musculatura lisa, a produção de secreções, o fluxo sanguíneo, a permeabilidade microvascular e a migração e ativação de células inflamatórias<sup>55, 56</sup>. Os conjuntos nervosos atuantes nas vias aéreas compreendem os sistemas colinérgico (COL), adrenérgico (ADRE) e não-adrenérgico não-colinérgico (NANC). Os efeitos desse último são mediados pela liberação de co-transmissores (neuropeptídeos e óxido nítrico, p. ex.) dos sistemas autonômicos clássicos<sup>57</sup>. Pelo menos 3 tipos de fibras nervosas aferentes foram identificadas no trato respiratório inferior: *receptores de adaptação lenta* (RAL), que agem como receptores de estiramento da musculatura lisa; *receptores irritantes de adaptação rápida* (RAR) e *fibras C não-mielinizadas* (FC)<sup>58</sup>. As duas últimas situam-se superficialmente e podem ser ativadas por estímulos inflamatórios e irritantes oriundos da luz da via aérea. É possível também que os nervos eferentes estejam envolvidos na ativação de reflexos colinérgicos e na liberação de mediadores inflamatórios, contribuindo para a sintomatologia asmática. As FC contêm diversos neuropeptídeos, SP e neuroquinina A (NA) que podem ser liberadas dos nervos sensoriais via reflexo axônico local<sup>59</sup>. As substâncias liberadas pelas FC são capazes de induzir broncoconstrição (NA), extravazamento microvascular e secreção de muco (SP)<sup>60</sup> e suas ações podem ser inibidas pela endopeptidase neutra (EN) localizada no epitélio brônquico. Dessa forma a perda do epitélio ou a inibição da EN, que pode ocorrer nas infecções virais ou na exposição a determinados oxidantes e citocinas, amplificaria os efeitos daquelas. A ação das citocinas também favorece a perpetuação do processo inflamatório estimulando/incrementando a síntese dos neuropeptídeos. Estes, por sua vez, aumentam a sensibilidade dos nervos sensoriais, o que pode resultar num estado de hiperexcitabilidade.

A tosse, um dos sintomas cardinais da asma, é produto da excitação dos nervos sensoriais presentes

no epitélio da laringe, traquéia e grandes brônquios<sup>61</sup> (RAR e FC). Há indícios de que as fibras RAR sejam as principais responsáveis e que as FC tenham ação indireta estimulando ou potencializando os efeitos das fibras RAR<sup>62</sup>.

Globalmente, os sintomas são produtos de vários mecanismos combinados e gerados pela inflamação crônica das vias aéreas. Sintomas agudos, rápidos, são causados pela ativação de células inflamatórias e/ou por reflexos neurais. Sintomatologia prolongada é resultante do agravamento do processo inflamatório (Quadro 1).

### Quadro 1

#### Mecanismos envolvidos nos sintomas asmáticos

Sinto	Mecanismos
Tosse	Estimulação dos receptores da tosse
Sibilo	Limitação ao fluxo aéreo
Aperto no peito	Limitação ao fluxo aéreo / estimulação dos nervos sensoriais
Dispnéia	Limitação ao fluxo aéreo / estimulação dos nervos sensoriais

Reproduzido de Pauwels RA. Asthama: from pathogenesis to symptoms

#### Tratamento anti-inflamatório

As disfunções funcionais respiratórias e conseqüentes sintomas observados na asma são produtos da inflamação das vias aéreas. A contração da musculatura lisa que envolve o brônquio, o edema da parede brônquica e maior secreção de muco lançada na luz do brônquio – expressão clínica da HRB e tríade responsável pela resistência aumentada ao fluxo aéreo tem sua gênese na inflamação do brônquio. A compreensão de que a inflamação das vias aéreas é o fator causal básico das alterações da asma mudou o eixo do tratamento; em vez da reversão do broncoespasmo, ponto final da seqüência de alterações celulares endobrônquicas, passou-se a privilegiar o tratamento anti-inflamatório, anormalidade detectada é reservado para o período em que o broncoespasmo é clinicamente detectável, enquanto a terapia anti-inflamatória é usada não apenas na fase aguda como no tratamento de manuten-

ção e de prevenção.

O arsenal terapêutico anti-inflamatório usado no tratamento da asma é composto pelos glicocorticosteróides (CS), pelo cromoglicato dissódico (CGS) e pelo nedocromil sódico (NS). Os dois últimos são substâncias seguras, até onde se sabe desprovidas de efeitos indesejáveis importantes, que previnem e reduzem a inflamação brônquica; inibem as respostas imediata e tardia da asma e, com uso continuado, diminuem a HRB<sup>63, 64, 65</sup>. O real mecanismo de ação do cromoglicato ainda não está claro, mas possivelmente advém da estabilização de mastócitos e da redução do influxo e/ou ativação das células inflamatórias, ou mesmo afetando diretamente as terminações nervosas locais<sup>66, 67, 68</sup>. O CGS inibe parcialmente a liberação de mediadores mediada pela IgE a partir dos mastócitos de modo dose/dependente<sup>69</sup> e tem ação supressiva seletiva sobre o efeito de alguns mediadores em outras células inflamatórias<sup>70</sup>. Embora o conhecimento atual sobre o mecanismo de ação do CGS seja insuficiente para prever que classe de asmático mais provavelmente se beneficiará com seu uso, a experiência demonstra que ele atinge melhores resultados nos asmáticos leves a moderados alérgicos. Recomenda-se teste terapêutico por 4-6 semanas para determinar sua efetividade.

O papel do NS como agente anti-inflamatório efetivo está bem demonstrado<sup>52</sup>. O amplo espectro de ação do NS sugere que seu mecanismo de ação se dê através da interferência num ponto comum da ativação de diferentes células (mastócitos, eosinófilos, células epiteliais e nervos sensoriais)<sup>52</sup>. As evidências apontam para o bloqueio dos canais de cloro como esse ponto. Há indícios de que os canais de cloro estejam envolvidos na regulação do volume celular (o efluxo/influxo do íon na célula seria osmoticamente acompanhado pela água). Este mecanismo já foi identificado em algumas células (células endoteliais e epiteliais, fibroblastos e células de Jurkai). Nos nervos sensoriais, potenciais de ação são gerados pela despolarização resultante do efluxo de cloro. Nos mastócitos, estes canais têm papel funcional na liberação de mediadores, já que é o influxo dos íons de cloro que dá à membrana celular a hiperpolarização necessária para determinar o influxo de cálcio. A entrada de cálcio no citoplasma é o fator desencadeante da liberação de mediadores e subsequente produção/liberação de outros mediadores e citocinas. Tal como o CGS, ele é recomendado para asmáticos leves a moderados, sendo particularmente efetivo no

controle da tosse asmática. Globalmente, os mecanismos dependentes da abertura dos canais de cloro envolvidos na inflamação e nos sintomas asmáticos parecem ser o local de ação do NS<sup>45</sup>.

A moderna abordagem terapêutica da asma fez dos CS, excelentes anti-inflamatórios, personagens principais na obtenção dos resultados esperados: função pulmonar normal ou próxima do normal, sintomas asmáticos mínimos ou ausentes, rotina de vida sem interferência da doença. Obviamente, estes objetivos devem ser, idealmente atingidos sem problemas advindos da terapia. É justamente nesse ponto que os CS tornam-se foco de discussão e o CGS e o NS ocupam espaço no arsenal terapêutico: é inegável o papel benéfico dos CS na asma, como também é indiscutível que seu uso prolongado promove disfunções por vezes graves. Entretanto, deve ser sempre lembrado que os riscos potenciais da asma incorretamente tratada são, quase sempre, maiores que aqueles advindos da corticoterapia bem indicada ao asmático por temor de seus efeitos indesejáveis, na sua maioria evitáveis ou minimizados com a seleção e dosagem adequadas do CS.

Os glicocorticosteróides são hormônios pleiotrópicos que, em doses farmacológicas, previnem ou suprimem inflamação e outros processos mediados imunologicamente. Com o desenvolvimento do estudo da genética e da biologia molecular, muito se avançou no conhecimento do mecanismo de ação dos CS. A nível molecular, eles formam complexos com receptores específicos que migram para o núcleo da célula, lá interagindo com áreas regulatórias seletivas do DNA. Isso resulta em modulação positiva ou negativa de diversos genes envolvidos nas respostas inflamatória e imune. A nível celular, os CS inibem o acesso de leucócitos ao local da inflamação e interferem com sua função; suprimem a produção e os efeitos dos fatores humorais envolvidos na resposta inflamatória<sup>71</sup>. Há somente um receptor de CS (RG), que modula tanto os efeitos terapêuticos quanto os adversos, e que é definido por um gen que está parcialmente mapeado<sup>72</sup>. A maioria das células tem poucos milhares destes receptores de alta afinidade, mas o número varia de acordo com o tipo e o ciclo da célula. No pulmão há muitos RG nas células endoteliais e alveolares, mas poucos nas epiteliais e do músculo liso<sup>73</sup>. Os CS agem sobre praticamente todas as células e tecidos do corpo humano. Seus efeitos sobre as principais células sabidamente envolvidas no processo asmático são:

n **linfócito T** – uma dose única de CS produz linfocitopenia marcante porém transitória, afetando todas as subpopulações de linfócitos. CS afetam negativamente a iniciação e a progressão do ciclo da célula T, que leva à proliferação e geração das funções efetoras, supressoras e citotóxicas, através da inibição da produção de IL-2<sup>74</sup>.

n **macrófago** – CS antagonizam a diferenciação do macrófago e inibem a expressão dos complexos antigênicos de histocompatibilidade principal da classe II induzida pelo IF  $\gamma$ , bloqueiam a liberação de numerosas citocinas (IL-1 e 6, FNT- $\alpha$ ); deprimem a produção e liberação de prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT) pró-inflamatórios e a atividade tumoricida e microbicida dos macrófagos ativados<sup>75</sup>.

n **neutrófilo** – em doses farmacológicas, os CS inibem a adesão dos neutrófilos às células endoteliais sem interferir significativamente na função dos primeiros<sup>76</sup>.

n **eosinófilo, basófilo e mastócito** – os CS deprimem a acumulação destas células no local da reação alérgica; inibem a liberação de histamina e LTC<sub>4</sub> pelos basófilos e a degranulação dos mastócitos<sup>76</sup>.

n **células endoteliais** – os CS afetam a ativação e a função dessas células, inibindo a secreção das proteínas C3 do complemento e o fator B, inibindo também a formação da IL-1 e metabólitos do ácido araquidônico<sup>76</sup>.

Desde quando começaram a ser usados, na década de 50, os CS mostraram seu valor no tratamento da asma<sup>77,78</sup>. Atualmente, constituem a medicação anti-inflamatória mais efetiva para o tratamento da asma. São eficazes na melhora da função pulmonar, no decréscimo da HRB, dos sintomas, da frequência e gravidade das exacerbações; melhoram a qualidade de vida<sup>79,80,81</sup>. O maior obstáculo ao seu uso a longo prazo são os efeitos indesejáveis que incluem osteoporose, hipertensão, atrofia de pele, catarata, retardo no crescimento, baixa defesa contra infecções, entre outros. Por vezes, os CS são imprescindíveis no controle da asma, até mesmo por períodos longo e, nessa situação, todos os recursos devem ser usados para reduzir os efeitos indesejáveis do fármaco. Esses cuidados incluem utilizar uma via de administração em que a absorção sistêmica seja menor (inalatória); escolher horários de tomada que menos interfiram com a secreção adrenal dos CS; escolher, dentre os CS, aquele que produz melhor o efeito desejado com menor potencial de efeito indesejado. Por exemplo, tratamento oral com CS em dias

alternados, que por vezes funciona no controle da asma, não tem influência na secreção adrenal de cortisol durante o dia sem CS, mas a secreção adrenal de androgênios diminui significativamente nesse dia<sup>82</sup>.

O mecanismo de ação dos CS na asma ainda é terreno obscuro. Inegavelmente, não são broncodilatadores, porém potencializam o efeito desses e seu papel, na asma, parece ser relacionado à redução da resposta inflamatória das vias aéreas. Como requerem um prazo mínimo de 6 a 12 horas para começarem a apresentar efeitos benéficos na mecânica respiratória dos pacientes sintomáticos<sup>83, 84, 85</sup>, acredita-se que a ação dos CS derive da elaboração de proteínas específicas via indução genética<sup>78</sup>. Este fato contribui para a dificuldade em determinar-se uma curva dose/resposta para o emprego de CS na crise de asma. A dose de CS, na asma, é questão ainda sob debate. Virtualmente, todos os CS já foram usados sistematicamente no tratamento da asma, não havendo diferenças importantes entre seus efeitos terapêuticos, quando usadas doses equivalentes<sup>86, 87, 88</sup>. Entretanto, entre os efeitos indesejáveis advindos do uso repetido e/ou prolongado, e entre o custo dos CS, há diferenças significativas.

Uma maneira de reduzir os efeitos indesejáveis dos CS na asma, sem perda significativa de seus efeitos benéficos, é administrá-los pela via inalatória. Mesmo por essa via, seu uso continuado está ligado a efeitos locais adversos: candidíase de orofaringe, disfonia, tosse ocasional por irritação das vias aéreas superiores. Para evitá-los/reduzi-los, o uso de espaçadores ou a simples lavagem da boca após cada inalação são efetivas. O risco de efeitos sistêmicos indesejáveis é dependente da potência do CS, de sua biodisponibilidade, de sua absorção sistêmica, de seu metabolismo durante a primeira passagem pelo fígado e de sua meia-vida. Embora já esteja demonstrado que doses superiores a 1 mg de dipropionato de beclometasona ou budesonida, ou seus equivalentes, podem estar associadas a lesões de pele, supressão de adrenal e à redução no metabolismo ósseo, a relevância clínica desses efeitos, a longo prazo, ainda não está determinada.

Parcela menor dos asmáticos é classificada como portadores de asma crônica resistente aos CS. Estes asmáticos, apesar de terem obstrução reversível das vias aéreas documentada espirometricamente, não apresentam resposta clínica à terapia sistêmica com CS por períodos de 2 semanas<sup>89</sup>. Quando comparados aos asmáticos que respondem ao tratamento com CS, eles não apresentam diferenças fisiológicas nem entre os

linfócitos T ou entre os RG dos monócitos<sup>90</sup>. Entretanto, os asmáticos não-respondentes aos CS apresentam maior proporção de linfócitos T que expressam moléculas de ativação IL-2 e HLA-DR quando comparados aos sensíveis. Estudos realizados nesse grupo de asmáticos apontam para o papel da ciclosporina A que, na dose de 500 ng/ml, inibe a elaboração das linfocinas responsáveis pela ausência de resposta aos CS<sup>91</sup>.

Outro grupo de fármacos muito usados no tratamento da asma é o dos beta 2 agonistas, ou beta 2 adrenérgicos ( $\beta_2$ ). São potentes broncodilatadores e parecem agir através do aumento da produção de AMPc e conseqüente ativação da proteínaquinase-A. Esta, altera a resposta ao estímulo broncoconstrictor 1) inibindo a hidrólise do fosfolípido inositol<sup>92</sup>; 2) aumentando a extrusão ou o seqüestro de cálcio<sup>93</sup>; 3) inibindo a entrada e a liberação do cálcio<sup>94</sup>; 4) regulando a ativação dos canais de potássio ativados pelo cálcio<sup>95</sup>; 5) inibindo a quinase da miosina de cadeia leve<sup>96</sup> e 6) hiperpolarizando a membrana da fibra muscular lisa<sup>97</sup>. Se um desses mecanismos é o mais importante, ou se os efeitos dos  $\beta_2$  são resultantes também de outros mecanismos ainda é incerto. Os  $\beta_2$  de curta duração (salbutamol, fenoterol e terbutalina, principalmente) têm efeito inibitório sobre mastócitos<sup>98</sup>, linfócitos e neutrófilos<sup>99</sup>; deprimem a resposta rápida à inalação de antígenos e, em altas doses, atenuam a resposta tardia<sup>100</sup>. Já os  $\beta_2$  de longa duração (salmeterol e formoterol) parecem ter ação sobre eosinófilos e macrófagos alveolares<sup>101</sup>. Quando comparados aos CS, os  $\beta_2$  de longa duração, parecem ter efeitos inibitórios sobre a inflamação aguda, mas não têm efeito equivalente aos CS sobre a inflamação crônica das vias aéreas<sup>102</sup>.

Há pouco tempo, com base em observação limitada, passou-se a divulgar que o uso regular de  $\beta_2$  inalável, em doses acima dos usuais, poderia levar à morte<sup>103</sup>. No entanto, a meta-análise dos estudos de caso-controle<sup>104</sup> não confirma esse fato, sugerindo que a associação morte/uso regular de  $\beta_2$  está confinada ao uso dos últimos em excesso, refletindo a gravidade da asma mais do que a toxicidade do fármaco<sup>105</sup>. De qualquer forma, revisão recente sobre o assunto<sup>106</sup>, nos campos da epidemiologia, função pulmonar e responsividade das vias aéreas são consistentes com a opinião de que o uso regular de  $\beta_2$  inalável complica o controle da asma e apontam para a terapia anti-inflamatória como a mais apropriada.

Um asmático dormindo ainda é um asmático. Quando ele vai ser medicado, isso deve ser considera-



do. Caracteristicamente, o asmático piora à noite, durante o sono. Esse fato é comprovado pelas avaliações espirométricas realizadas repetidamente durante períodos de 24 horas. A medida repetida do pico de fluxo (PF), habitualmente, demonstra que os maiores valores são obtidos por volta do meio-dia e à tarde, enquanto os mais baixos são obtidos ao final da noite ou ao acordar<sup>107</sup>. Em pacientes com asma moderada, a variação circadiana do PF pode chegar a 25% e, em asmáticos graves, pode atingir diferenças de até 60%<sup>108</sup>. Segundo os preceitos da cronobiologia, a vulnerabilidade das vias aéreas aos diversos estímulos roncoconstrictores, ou, em outras palavras, a HRD, e a própria reversibilidade do broncoespasmo<sup>109</sup> sofrem variações durante as 24 horas do dia. De acordo com estudos<sup>110, 111</sup>, os brônquios são menos vulneráveis entre 12:00 e 17:00 h, e mais responsáveis entre as 23:00 e 6:00 h da manhã. Do mesmo modo, a resposta ao broncodilatador é mais forte inalado pela manhã ou à noite<sup>109</sup>.

Cronobiologia é o estudo dos ritmos biológicos e da estrutura do tempo biológico. Ela refuta o conceito de homeostasia, no qual o corpo humano é mantido num estado inalterado no tempo, presumindo que os processos biológicos e as funções exibem variabilidade previsível no tempo, com ritmos biológicos em todos os níveis<sup>112</sup>. O conceito da homeostasia leva a imaginar que o risco ou a intensidade de determinada doença ou sintoma é igual em qualquer hora do dia ou da noite, ou que a hora de administração de determinado medicamento não interfere com sua farmacocinética e efeito. Entretanto, o conceito de ritmo circadiano, embora muito comentado na asma (piora à noite, durante o sono)<sup>113</sup>, é pouco lembrado e está presente em diversas outras situações clínicas como por exemplo: na *rinite alérgica* os sintomas são maiores ao acordar<sup>114</sup>; *angina do peito* é mais comum nas 4-6 primeiras horas de atividade diária<sup>115</sup>; *infarto do miocárdio* é mais comum durante as primeiras horas de atividade diária<sup>116</sup>; *hemorragia cerebral* tem maior incidência à noite, cerca de 3 horas antes de deitar para dormir<sup>117</sup>; na *hipertensão arterial renal*, o pico de pressão ocorre à noite, durante o sono<sup>118</sup>, na *hipertensão essencial*, os maiores valores pressóricos acontecem na parte final da atividade diária<sup>119</sup>; os sintomas da *artrite* são piores ao acordar<sup>120</sup>.

A cronofarmacologia estuda a associação da medicação aos ritmos biológicos. Seu estudo compreende a cronocinética (hora da administração do remé-

dio), a cronoestesia (relação entre os efeitos da medicação e a hora da administração), a cronotoxicidade (previsibilidade da variação, no tempo, dos efeitos indesejáveis), a cronotolerância (mudanças ritmo-dependentes da tolerância à medicação, por parte das células, dos tecidos e dos órgãos)<sup>107</sup>. Cronoterapia é a administração de determinado medicamento considerando a cronofarmacologia, objetivando otimizar os efeitos desejados e minimizar os adversos. Assim, ela leva em consideração também as variações previsíveis no tempo da doença e de seus sintomas e as variações individuais dos pacientes.

Os conceitos expostos acima tornam clara a importância do horário da medicação no controle da asma. Os principais medicamentos utilizados na asma – CS e  $\beta_2$  – conjugam benefícios importantes a efeitos adversos significativos. Em geral, são usados por períodos prolongados, aumentando o risco dos efeitos indesejáveis. A consideração desses fatos vem trazendo novas propostas na condução do tratamento medicamentoso da asma, que deve ser objeto de atenção por parte dos especialistas.

**Agradecimento** - Meu agradecimento à Maria Beatriz Campos pela correção gramatical deste texto.

#### Referências Bibliográficas

- 1 - Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tzicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. **Predominant TH2-like bronchoalveolar T<sub>H</sub>-lymphocyte population in atopic asthma.** *N Engl J Med* 1992; **326**: 298-304.
- 2 - Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. **Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics.** *Lancet* 1989; **1**: 520-4.
- 3 - Lambert RK, Wiggs BR, Kuwano K, Hogg JC, Paré PD. **Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD.** *J Appl Physiol* 1993; **74**: 2771-81.
- 4 - Yager D, Shore S, Drazen JM. **Airway luminal liquid. Sources and role as an amplifier of bronchoconstriction.** *Am Rev Respir Dis* 1991; **143**: S52-4.
- 5 - Yager D, Butler JP, Bastacky J, Israel E, Smith G, Drazen JM. **Amplification of airway constriction due to liquid filling of airway interstices.** *J Appl Physiol* 1989; **66**: 2873-84.
- 6 - Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, et cols. **Eosinophilic inflammation in asthma.** *N Engl J Med* 1990; **323**: 1033-9.
- 7 - Djukanovic R, Wilson JW, Britten KM, Wilson SJ, Walls AF, Roche WR, Howarth PH, Holgate ST. **Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry.** *Am Rev Respir Dis* 1990; **142**: 863-71.
- 8 - Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CRW, Twentyman OP, Howarth PH, Holgate ST. **Mucosal inflamma-**

tion in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; **142**: 434-57.

9 - Dunnill MS. **The pathology of asthma with special reference to changes in the bronchial mucosa.** *J Clin Pathol* 1960; **13**: 27-33.

10 - Ueki I, German VE, Nadel JA. **Micropipette measurement of airway submucosal gland secretion. Autonomic effects.** *Am Rev Respir Dis* 1980; **121**: 351-7.

11 - Shelhamer JH, Marom Z, Kaliner M. **Immunologic and neuropharmacologic stimulation of mucous glycoprotein release from human airways in vitro.** *J Clin Invest* 1980; **66**: 1400-8.

12 - Peatfield AC, Barnes PJ, Bratcher C, Nadel JA, Davis B. **Vasoactive intestinal peptide stimulates tracheal submucosal gland secretion in ferrets.** *Am Rev Respir Dis* 1983; **128**: 89-93.

13 - Barnes PJ. **Neuropeptides and asthma.** *Am Rev Respir Dis* 1991; **143**: S28-S32.

14 - Baker AP, Hillegass LM, Holden DA, Smith WJ. **Effect of kallidin, substance P, and other basic polypeptides on the production of respiratory macromolecules.** *Am Rev Respir Dis* 1977; **115**: 811-7.

15 - Borson DB, Charlin M, Gold BD, Nadel JA. **Neural regulation of <sup>35</sup>SO<sub>4</sub> macromolecule secretion from tracheal glands of ferrets.** *J Appl Physiol* 1984; **57**: 457-66.

16 - Coles SJ, Neill KH, Reid LM, et al. **Effects of leukotrienes C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> on glycoprotein and lysozyme secretion by human bronchial mucosa.** *Prostaglandins* 1983; **25**: 155-70.

17 - Marom Z, Shelhamer JH, Kaliner M. **Effects of arachidonic acid, monohydroxyeico-satetraenoic acid and prostaglandins on the release of mucous glycoproteins from human airways in vitro.** *J Clin Invest* 1981; **67**: 1695-702.

18 - Marom Z, Shelhamer JR, Sun F, Kaliner M. **Human airway monohydroxyeicosatetraenoic acid generation and mucus release.** *J Clin Invest* 1983; **72**: 122-7.

19 - Leikauf GD, Ueki JF, Widdicombe JH, Nadel JA. **Alteration of chloride secretion across canine tracheal epithelium by lipoxygenase products of arachidonic acid.** *Am J Physiol* 1986; **250**: 47-53.

20 - Leikauf GD, Ueki JF, Widdicombe JH, Nadel JA. **Bradykinin stimulates Cl secretion and prostaglandin E<sub>2</sub> release by canine tracheal epithelium.** *Am J Physiol* 1985; **248**: 48-55.

21 - Marin MG, Davis B, Nadel JA. **Effect of histamine on electrical and ion transport properties of tracheal epithelium.** *Am J Physiol* 1977; **42**: 735-8.

22 - Pavia D, Bateman JRM, Sheahan NF, Agnew JE, Clarke SW. **Tracheobronchial mucociliary clearance in asthma: impairment during remission.** *Thorax* 1985; **40**: 171-5.

23 - Mezey RJ, Cohn MA, Fernandez RJ, Januszkiewicz J, Warner A. **Mucociliary transport in allergic patients with antigen-induced bronchospasm.** *Am Rev Respir Dis* 1978; **118**: 677-84.

24 - Batista SP, Denine EP, Kensler CJ. **Restoration of tracheal mucosa and ciliary particle transport activity after mechanical denudation in the chicken.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; **22**: 56-60.

25 - Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Haahtela T. **Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patient with asthma.** *Am Rev Respir Dis* 1985; **131**: 599-606.

26 - Heino M, Karjalainen J, Ylikoski J, Laitinen A, Laitinen LA. **Bronchial ciliogenesis and oral steroid treat-**

**ment in patients with asthma.** *Br J Dis Chest* 1988; **82**: 175-8.

27 - Ryley HC, Brogan TD. **Variation in the composition of sputum in chronic chest diseases.** *Br J Exp Pathol* 1968; **49**: 625-33.

28 - Brogan TD, Ryley HC, Neale L, Yass J. **Soluble proteins of bronchopulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, asthma and bronchitis.** *Thorax* 1975; **30**: 72-9.

29 - Becker CG, Nachman RL. **Contractile proteins of endothelial cells, platelets and smooth muscle.** *Am J Pathol* 1973; **71**: 1-22.

30 - Persson CGA. **Role of plasma exudation in asthmatic airways.** *Lancet* 1986; **2**: 1126-9.

31 - Heino M, Juntunen-Backman K, Leijala M, Rapola J, Laitinen LA. **Bronchial epithelial inflammation in children with chronic cough after early lower respiratory tract illness.** *Am Rev Respir Dis* 1990; **141**: 42832.

32 - Boushey HA, Holtzman MJ, Sheller JR, Nadel JA. **Bronchial hyperreactivity.** *Am Rev Respir Dis* 1980; **121**: 389-413.

33 - Hogg JC, Eggleston PA. **Is asthma an epithelial disease?** *Am Rev Respir Dis* 1984; **129**: 207-8.

34 - Vanhoutte PM. **Epithelium-derived relaxing factor(s) and bronchial reactivity.** *J Allergy Clin Immunol* 1989; **83**: 855-61.

35 - Leikauf GD, Ueki IF, Widdicombe JH, Nadel JA. **Alteration of chloride secretion across canine tracheal epithelium by lipoxygenase products of arachidonic acid.** *Am J Physiol* 1986; **250**: 47-53.

36 - Hunter JA, Finkbeiner WE, Nadel JA, Goetzl EJ, Holtzman MJ. **Predominant generation of 15-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid by epithelial cells from human trachea.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 4633-7.

37 - Dunhill MS, Massarella GR, Anderson JA. **A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis and in emphysema.** *Thorax* 1969; **24**: 176-9.

38 - Molina C, Brun J, Coulet M, Betail G, Delage J. **Immunopathology of the bronchial mucosa in "late on set" asthma.** *Clin Allergy* 1977; **7**: 137-45.

39 - Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. **Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics.** *Lancet* 1989; **1**: 520-4.

40 - Kountz WB, Alexander HL. **Death from bronchial asthma.** *Arch Pathol* 1928; **5**: 1003-19.

41 - Callerame NM, Condemi JJ, Bohrod MG, Vaughan JH. **Immunologic reactions of bronchial tissues in asthma.** *N Engl J Med* 1971; **284**: 459-64.

42 - Butcher EC. **Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity.** *Cell* 1991; **67**: 1033-6.

43 - Berman JS, Weller PF. **Airway eosinophils and lymphocytes in asthma. Birds of a feather?** *Am Rev Respir Dis* 1993; **145**: 1246-8.

44 - Kumar A, Busse WW. **Airway inflammation in asthma.** *Scient Amer Scie & Med* 1995; 38-47.

45 - Frieri M, Metcalf DD. **Analysis of the effect of mast cell granules on lymphocyte blastogenesis in the absence of mitogens: identification of heparin as a granule associated suppressor factor.** *J Immunol* 1983; **131**: 1942-8.

46 - Page CP. **An explanation of the asthma paradox.** *Am Rev Respir Dis* 1993; **147**: 529-32.

47 - Barnes PJ. **A new approach to the treatment of asthma.** *N Engl J Med* 1989; **321**: 1517-27.

48 - Horn BR, Robin ED, Theodore J, VanKessel A. **To-**

tal eosinophil counts in the management of bronchial asthma. *N Engl J Med* 1975; **292**: 1152-5.

49 - Weller P. **The immunobiology of eosinophils.** *N Engl J Med* 1991; **324**: 1110-8.

50 - Amoux B, Simões-Caieiro ME, Landes A, Mathieu M, Dureaux P, Benveniste J. **Alveolar macrophages from asthmatic patient release platelet activating factor (Paf-acether) and lyso-Paf-acether when stimulate with specific allergen (abstract).** *Am Rev Respir Dis* 1982; **125**: A70

51 - Nathan CF. **Secretory products of macrophages.** *J Clin Invest* 1987; **79**: 3 19-26.

52 - Barnes PJ, Holgate ST, Laitinen LA, Pauwels R. **Asthma mechanisms, determinants of severity and treatment: the role of nedocromil sodium.** *Clin Exper Allergy* 1995; **25**: 771-87.

53 - Belcher NG, Murdoch RD, Daton N, House FR, Clark TJH, Rees PJ, Lee TH. **A comparison of mediator and catecholamine release between exercise - and hypertonic saline-induced asthma.** *Am Rev Respir Dis* 1988; **137**: 1026-32.

54 - Maxwell DL, Hawksworth RJ, Lee TH. **Inhaled nedocromil sodium reduces histamine release from isolated large airway segments of asthmatic subjects in vivo.** *Eur Respir J* 1993; **6**: 1145-50.

55 - Barnes PJ. **Neural control of the airways in health and disease.** *Am Rev Respir Dis* 1986; **134**: 1289-314.

56 - Barnes PJ. **Neural control of the airway function: new perspectives.** *Molec Aspects Med* 1990; **11**: 351-423.

57 - Barnes PJ, Barainuk J, Belvisi MG. **Neuropeptides in the respiratory tract.** *Am Rev Respir Dis* 1991; **144**: 1391-9.

58 - Coleridge HM, Coleridge JCG. **Afferent nerves in the airways.** In: Barnes PJ, ed. *Autonomic control of the respiratory system.* London: Harwood, 1994.

59 - Barnes PJ. **Bradykinin and asthma.** *Thorax* 1992; **47**: 979-83.

60 - Kuo H-P, Rhode JAL, Tokuyama K, Barnes PJ, Rogers DF. **Capsaicin and sensory neuropeptide stimulation of goblet cell secretion in guinea pig trachea.** *J Physiol* 1990; **431**: 629-41.

61 - Coleridge HM, Coleridge JCG. **Reflexes evoked from the tracheobronchial tree and lungs.** In: Cherniack NS, Widdicombe JG. Eds. *Handbook of Physiology.* 3. The Respiratory System, vol II. Control of breathing, Bethesda: American Physiological Society, 1986; 395-429.

62 - Ujiie Y, Sezikawa K, Aikawa T, Sasaki H. **Evidence for substance P as an endogenous substance causing cough in guinea pigs.** *Am Rev Respir Dis* 1993; **148**: 1628-32.

63 - Juniper EF, Kline PA, Morris MM, Hargreave FE. **Airways constriction by isocapnic hyperventilation of cold dry air: comparison of magnitude and duration of protection by nedocromil sodium and sodium cromoglycate.** *Clin Allergy* 1987; **17**: 523-8.

64 - Phillips GD, Scott VL, Richards R, Holgate ST. **Effect of nedocromil sodium and sodium cromoglycate against bronchoconstriction induced by inhaled adenosine 5'-monophosphate.** *Eur Respir Dis* 1989; **2**: 2;107.

65 - Silverman M, Connolly NM, Balfour-Lynn L, Godfrey S. **Long term trial of disodium cromoglycate and isoprenaline in children with asthma.** *BMJ* 1972; **3**: 378-81.

66 - Hoag JE, McFadden ER Jr. **Long-term effect of cromolyn sodium on nonspecific bronchial hyper-responsiveness: A review.** *Ann Allergy* 1991; **66**: 53-63.

67 - Saunders KB, Rudolf M, Brostoff J. **Sodium cromoglycate in intrinsic asthma.** *BMJ* 1978; **1**: 1184.

68 - McLean WL, Lozano J, Hannaway P, Sakowitz S,

Mueller HL. **Cromolyn treatment of asthmatic children.** *Am J Dis Child* 1973; **125**:332-7.

69 - Leung KB et al. **Effects of sodium cromoglycate and nedocromil sodium on histamine secretion from human mast cells.** *Thorax* 1988; **43**: 756-61.

70 - Kay AB et al. **Disodium cromoglycate inhibits activation of human inflammatory cells in vitro.** *J Allergy Clin Immunol* 1987; **80**: 1-8.

71 - Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. **Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates.** *Ann Intern Med* 1993; **119**: 1198-1208.

72 - Muller M, Renkawitz R. **The glucocorticoid receptor.** *Biochem Biophys Acta* 1991; **1088**: 171-82.

73 - Adcock JM, Bronnegard M, Barnes PJ. **Glucocorticoid receptor mRNA localization and expression in human lung (Abstract).** *Am Rev Respir Dis* 1991; **143**: A628.

74 - Boumpas DT, Older SA, Anastassiou ED, Tsokos GC, Nelson D, Balow JE. **Dexamethasone inhibits huam IL-2 but not IL-2R gene expression in vitro at level of nuclear transcription.** *J Clin Invest* 1991; **87**: 1739-47.

75 - Sternberg EM, Wilder RL. **Corticosteroids.** in: McCarty DJ, Koopman WJ eds. *Arthritis and Allied Conditions.* Philadelphia: Lea & Febiger; 1993; 665-82.

76 - Sternberg EM, Chrousos GP, Wilder RL, Gold PW. **The stress response and the regulation of inflammatory disease.** *Ann Intern Med* 1992; **117**: 854-66.

77 - Phear D, Bali K, Page F. **Prolonged treatment with steroids in severe chronic asthma.** *Lancet* 1960; **1**: 39-41.

78 - Rees HA, Williams DA. **Long term steroid therapy in chronic intractable asthma.** *Br Med J* 1962; **1**: 575-9.

79 - Van Essen-Zandvliet EE et cols. **Effects of 22 months of treatment with inhaled corticosteroids and/or beta 2 agonists on lung function, airway hiperresponsiveness, and symptoms in children with asthma. The Dutch Chronic Nonspecific Lung Disease Study Group.** *Am Rev Respir Dis* 1992; **146**: 547-54.

80 - Juniper EF et als. **Effect of long-term treatment with an inhaled corticosteroid (budesonide) on airway hyperresponsiveness and clinical asthma in nonsteroid-dependent asthmatics.** *Am Rev Respir Dis* 1990; **142**: 832-6.

81 - Salmeron S et al. **Higs doses of inhaled corticosteroids in unstable chronic asthma. A multicenter, double-blind, placebo-controlled study.** *Am Rev Respir Dis* 1989; **140**: 167-71.

82 - Harter JG, Reddy WJ, Thorn GW. **Studies on an intermittent corticosteroid dosage regimen.** *N Engl J Med* 1963; **269**: 591-6.

83 - Ellul-Micallef R, Borthwick RC, McHardy GJR. **The time course of response to prednisolone in chronic bronchial asthma.** *Clin Sci* 1974; **147**: 105-17.

84 - Fanta CH, Rossing TH, McFadden Jr ER. **Glucocorticoids in acute asthma: a critical controlled trial.** *Am J Med* 1983; **74**: 845-51.

85 - Collins JV, Clark TJH, Brown D, Townsend J. **The use of corticosteroids in the treatment of acute asthma.** *Quart J Med* 1975; **174**: 259-73.

87 - Sue MA, Kwong FK, Klaustermeyer WB. **A comparison of intravenous hydrocortisone, methylprednisolone, and dexamethasone in acute bronchial asthma.** *Ann Allergy* 1986; **56**: 406-9.

88 - Pierson WE, Bierman CW, Kelley VC. **A double-blind trial of corticosteroid therapy in status asthmaticus.** *Pediatrics* 1974; **54**: 282-8.

- 89 - Corrigan CJ, Brown P, Barnes NC *et al.* **Glucocorticoid resistance in chronic asthma: glucocorticoid pharmacokinetics, glucocorticoid receptor characteristics and inhibition of peripheral blood T-cell proliferation by glucocorticoids *in vitro*.** *Am Rev Respir Dis* 1991; **144**: 1016-25.
- 90 - Adelroth E, Rosenhall L, Johansson SA, Linden M, Venge P. **Inflammatory cells and eosinophilic activity in asthmatics investigated by bronchoalveolar lavage: the effects of anti-asthmatic treatment with budesonide and terbutaline.** *Am Rev Respir Dis* 1990; **142**: 91-9.
- 91 - Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, Tsai JJ, Frew AJ, Kay AB. **Glucocorticoid Resistance in Chronic Asthma. Peripheral blood T lymphocyte activation and comparison of the T lymphocyte inhibitory effects of glucocorticoids and cyclosporin** *Am Rev Respir Dis* 1991; **144**: 1026-32.
- 92 - Hall IP, Chilvers ER. **Inositol phosphates and airway smooth muscle.** *Pulmon Pharmacol* 1989; **2**: 11320.
- 93 - Mueller E, VanBreeman C. Role of intracellular Ca<sup>++</sup> sequestration in beta adrenergic relaxation of airway smooth muscle. *Nature* 1979; **281**: 682-3.
- 94 - Takuwa Y, Takuwa N, Rasmussen H. **The effect of isoproterenol on intracellular Calcium concentration.** *J Biol Chem* 1988; **263**: 762-8.
- 95 - Jones TR, Charete L, Garcia NM, Kaczorowski GJ. **Selective inhibition of relaxation of guinea-pig trachea by chlorybdotoxin, a potent Ca<sup>++</sup> activated K<sup>+</sup> channel inhibitor.** *J Pharmacol Exp Ther* 1990; **225**: 697-706.
- 96 - Silver PJ, Stull JT. **Regulation of myosin light chain kinase and phosphorylase phosphorylation in tracheal smooth muscle.** *J Biol Chem* 1982; **257**: 6145-50.
- 97 - Gunst SJ, Stropp JQ. **Effect of Na-K adenosine triphosphatase activity on relaxation of canine tracheal smooth muscle.** *J Appl Physiol* 1988; **64**: 635-41.
- 98 - Peters SP, Schulman ES, Schleimer RP, Macglashan DW, Newball HH, Lichtenstein LM. **Dispersed human lung mast cells. Pharmacological aspects and comparison with human lung tissue fragments.** *Am Rev Respir Dis* 1982; **126**: 1034-9.
- 99 - Gallant SP, Duriseti L, Underwood S, Insel PA. **Decreased b-adrenergic receptors on polymorphonuclear leukocytes after adrenergic therapy.** *N Engl J Med* 1978; **299**: 933-6.
- 100 - Twentyman OP, Finnerty JP, Hogale ST. **The inhibitory effect of nebulized albuterol on the early and late asthmatic reactions and decrease in airway responsiveness provoked by inhaled allergen in asthma.** *Am Rev Respir Dis* 1991; **144**: 782-7.
- 101 - Lofdahl CG, Chung KF. **Long acting p2-adrenoceptor agonists: a new perspective on the treatment of asthma.** *Eur Respir J* 1991; **4**: 218-26.
- 102 - Tatterfield AE, Barnes PJ. **b2-agonists and corticosteroids: new developments and controversies. Report of a meeting in november 1990.** *Am Rev Respir Dis* 1992; **146**: 1637-41.
- 103 - Spitzer WO, Suissa S, Ernst P, Horwitz RJ, Habbick B, Cockcroft D, Boivin JF, McNutt M, Buist AS, Rebuck AS. **The use of beta-agonists and the risk of death or near death from asthma.** *N Engl J Med* 1992; **326**: 501-10.
- 104 - Mullen NM, Mullen B, Carey M. **The association between O-agonist use and death from asthma. A meta-analytic integration of case-control studies.** *JAMA* 1993; **270**: 1842-5.
- 105 - Suissa S, Ernst P, Boivin JF *et al.* **A cohort analysis of excess mortality in asthma and the use of inhaled b-agonists.** *Am J Respir Crit Care Med* 1994; **149**: 604-10.
- 106 - Taylor DR, Sears MR. **Regular beta-adrenergic agonists. Evidence, not reassurance, is what is needed.** *Chest* 1994; **106**: 552-9.
- 107 - Smolensky NM, Barnes PJ, Reinberg A, McGovern JP. **Chronobiology and asthma. L Day-night differences in bronchial patency and dyspnea and circadian rhythm dependencies.** *J Asthma* 1980; **23**: 321-43.
- 108 - Gaultier C, Reinberg A, Motohashi Y. **Circadian rhythm in total pulmonary resistance of asthmatic children: effects of a beta-Agonist agent.** *Chronobiol Int* 1988; **5**: 285-90.
- 109 - DeVries K, Goei JT, Booy-Noord H, Orië NGM. **Changes during 24 hours in lung function and histamine hyperreactivity of the bronchial tree in asthmatic and bronchitic patients.** *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1962; **20**: 93-101.
- 110 - Reinberg A, Gervais P, Morin M, Abulker C. **Rythme circadian humain du seil de la response bronchique a l'acetylcholine.** *Compte Rendu Acad Sci (Paris)* 1971; **272**: 1879-81.
- 111 - Gervais P, Reiberg A, Gervais C, Smolensky MH, deFrance O. **Twenty-four-hour rhythm in the bronchial hyperreactivity to house dust in asthmatics.** *J Allergy Clin Immunol* 1977; **59**: 207-13.
- 112 - Smolensky NM, D'Alonzo GE. **Medical chronobiology: concepts and applications.** *Am Rev Respir Dis* 1993; **147**: S2-S19.
- 113 - Turner-Warwick M. **Epidemiology of nocturnal asthma.** *Appl J Med* 1988; **85 (Supl 1 B)**: 6-8.
- 114 - Reinberg A, Gervais P, Levi F, Smolensky M, Del Cerro L, Uglioni C. **Circadian and circannual rhythms of allergic rhinitis: an epidemiologic study involving chronobiologic methods.** *J Allergy Clin Immunol* 1988; **81**: 51-62.
- 115 - Rocco MB, Nabel EG, Selwyn AP. **Circadian rhythms and coronary artery disease.** *Am J Cardiol* 1987; **59**: 13C-17C.
- 116 - Master AM, Jaffee I-IL. **Factors in the onset of coronary occlusion and coronary insufficiency.** *JAMA* 1952; **148**: 794-8.
- 117 - Lemmer B. **Temporal aspects of the effects of cardiovascular active drugs in humans.** in: Lemmer B, ed. **Chrono-pharmacology: cellular and biochemical interactions.** New York; Marcel Dekker 1989; 525-4 1.
- 118 - Portaluppi F, Montanari L, Ferlini M, Gilli P. **Altered circadian rhythms of blood pressure and heart rate in non-hemodialysis chronic renal failure.** *Chronobiol Int* 1990; **7**: 321-7.
- 119 - Meyer-Sabellek W. **24-hour recordings of blood pressure in hypertensives: technical and methodological background.** *Chronobiol Int* 1991; **8**: 8-9.
- 120 - Harkness JAL, Richter NIB, Panayi GS, Van de Pete K, Unger A, Pownall R, Geddawi M. **Circadian variation in disease activity in rheumatoid arthritis.** *BMJ* 1982; **284**: 551-4.