



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

VASCO PINHEIRO DIÓGENES BASTOS

**AÇÃO BRONCODILATADORA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO 1,8-
CINEOL EM MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA EM
COBAIAS**

FORTALEZA
2009

VASCO PINHEIRO DIÓGENES BASTOS

**AÇÃO BRONCODILATADORA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO 1,8-CINEOL
EM MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA EM COBAIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para outorga do Título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof^o Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

**FORTALEZA
2009**

B331a Bastos, Vasco Pinheiro Diógenes

Ação broncodilatadora e anti-inflamatória do 1,8-cineol em modelo experimental de asma em cobaias/
Vasco Pinheiro Diógenes Bastos. – Fortaleza, 2009.

163 f. : il.

Orientador: Prof^o Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em
Farmacologia.

1. Eucalyptol. 2. Broncodilatadores. 3.
Antiinflamatórios I. Magalhães, Jorge Caldas
(orient.) II. Título.

CDD 615.323766

VASCO PINHEIRO DIÓGENES BASTOS

**AÇÃO BRONCODILATADORA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO 1,8-CINEOL
EM MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA EM COBAIAS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 11/12/2009

Banca Examinadora

Prof^o Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Gisele Zapata Sudo
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof^o Dr. Fabiano Elias Xavier
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^o Dr. Marcelo Alcântara Holanda
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^o Dr. Armênio Aguiar dos Santos
Universidade Federal do Ceará - UFC

A Deus, fonte maravilhosa de sabedoria.

A Teresa Maria, minha esposa, pela
eterna colaboração, compreensão
e apoio nas minha caminhadas.

Aos meus filhos João Vitor e Lícia, preciosidades
que Deus me deu, pelo amor e estímulo
para completar esta jornada.

Aos meus pais, Juarez Diógenes Bastos (*In Memória*) e Maria Haydée Pinheiro
Diógenes pelos ensinamentos de justiça e honestidade.
As minhas irmãs, Christina Maria e Bibiana Christina, pela ajuda imensurável e
encorajamento durante as várias etapas de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, pela sua orientação científica, pelos conhecimentos, paciência e pela sua disponibilidade em atender os meus chamados.

Ao Prof^o Dr. Armênio Aguiar dos Santos, pelo apoio, disponibilidade e desprendimento durante esta trajetória acadêmica.

A Faculdade Integrada do Ceará e Prefeitura Municipal de Maracanaú, pelo apoio no aperfeiçoamento e desenvolvimento desse estudo.

A Faculdade Christus pelo apoio logístico na realização dessa pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso, Cristiano Teles de Sousa, João Paulo Melo de Pinho, Davi M. Jucá, e em especial a Teresinha Brito Silva e Francisco José Batista Lima Júnior, por compartilharmos momentos de descontração e ajuda na execução dos experimentos.

Aos amigos do Walter Breno Freire, Claudijane Sousa da Silva, Larissa Câmara, Patrícia Magalhães, Móises Tolentino, Palheta Júnior e Rodrigo Siqueira pela convivência e companheirismo.

Aos Prof^o Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro, Prof^o Marcellus Henrique L. Ponte Souza e integrantes do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer, especialmente Antonela Souza Gomes, pela ajuda imensurável na realização dos experimentos.

Aos amigos e irmãos da SVE Fisioterapeutas Associados, pelo incentivo na minha qualificação acadêmica.

A Cláudia Bezerra, Cláudia Simone Araújo, Lenise Fernandes, Nilce Almino de Freitas e a Wilma Pinheiro, pela constante convivência no trabalho e apoio para concluir essa etapa acadêmica.

À Áurea Rhanes Yida e Márcia Herminia Pinheiro Borges pela atenção e dedicação aos trabalhos prestados na Secretaria da Pós-Graduação em Farmacologia.

À Maria Silvandira França Pinheiro, José Haroldo Pinheiro Ferreira, José Ivan Rodrigues de Souza, Maria Eleonora de Souza Rodrigues e Maria Hosana de Assis Rodrigues pela presteza e atenção na execução dos experimentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse estudo, meu sincero agradecimento.

RESUMO

Ação broncodilatadora e anti-inflamatória do 1,8-cineol em modelo experimental de asma em cobaias. Bastos, V. P. D. Tese de Doutorado em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2009.

Dentre as doenças obstrutivas das vias aéreas, a asma envolve processos broncoconstritores e inflamatórios, ambos fisiologicamente reversíveis. O uso terapêutico do 1,8-cineol (eucaliptol) nessa disfunção vem sendo estudado nos últimos anos. Nesse estudo, objetivou-se avaliar o efeito do eucaliptol na contratilidade da musculatura lisa das vias aéreas de cobaias sensibilizadas e desafiadas com antígeno, bem como estudar seus efeitos nos parâmetros fisiopatológicos das vias aéreas na fase inflamatória pós-desafio. Foram utilizados anéis de traquéia montados em câmara para órgão isolado para estudar a contratilidade. Os parâmetros inflamatórios foram estudados por meio de análise histológica, contagem das células inflamatórias, níveis de citocinas e de MPO no lavado broncoalveolar. Adicionalmente, foram verificadas as pressões inspiratória e expiratória e a frequência respiratória desses animais, bem como o transporte mucociliar (TMC). O 1,8-cineol (6×10^{-6} a 2×10^{-2} M) induziu relaxamento concentração-dependente no tônus basal de preparações de animais naive com epitélio íntegro, cujo valor de pD_2 correspondeu a 2.23 [2.10 – 2.37]. Em preparações com epitélio removido ou ainda em tecidos com o epitélio íntegro, mas na presença de L-NAME, TEA, TTX ou propranolol, não foram observadas alterações significativas da potência ou do efeito máximo (E_{max}) induzido por 1,8-cineol. O 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-6}$ a $6,5 \times 10^{-3}$ M) foi capaz de reverter significativamente a resposta contrátil histaminérgica. Quando adicionado em meio sem Ca^{2+} e na presença de ACh, o 1,8-cineol reduziu a curva concentração-efeito promovida pela adição de Ba^{2+} , mas foi ineficaz quando na curva foi induzida pela adição de Ca^{2+} , efeito semelhante ao do verapamil. 1,8-cineol reduziu a contração induzida pela adição de OVA (reação de Schultz-Dale) em tecidos de animais sensibilizados e desafiados ao antígeno. O 1,8-cineol diminuiu a hiperreatividade traqueal ao KCl e ao CCh observada após desafio ao antígeno inibindo preferencialmente a curva concentração-efeito induzida por KCl. O pré-tratamento com 1,8-cineol no grupo de animais desafiados ao antígeno reverteu significativamente as alterações detrimenais na histologia do tecido traqueal e no TMC promovidas pelo desafio antigênico. Foi observada redução significativa na contagem total de células inflamatórias, eosinófilos e neutrófilos, bem como nos níveis de IL-1, TNF- α e MPO no grupo de animais desafiados e tratados com 1,8-cineol. Também foi observado aumento na expressão da citocina anti-inflamatória, IL-10. A degranulação de mastócitos foi inibida em animais naive pré-tratados com 1,8-cineol, efeito similar ao observado com cromoglicato dissódico. O 1,8-cineol reverteu as alterações produzidas pelo desafio antigênico nas pressões expiratórias e inspiratórias, bem como na frequência respiratória. Esses resultados demonstram que o 1,8-cineol apresenta efeito anti-inflamatório quando utilizado previamente e tem uma ação relaxante na musculatura lisa de traquéias de cobaias, agindo preferencialmente em eventos eletromecânicos no músculo liso das vias aéreas.

Palavras-chave: eucaliptol, miorelaxamento, anti-inflamatório

ABSTRACT

Bronchodilator and anti-inflammatory action of 1,8-cineole in experimental model of asthma in guinea pigs. Bastos, V. P. D. Doctoral Thesis in Pharmacology, Federal University of Ceará, 2009.

Considered as an obstructive disease of airways, asthma involves reversible processes in respiratory tree such as bronchoconstriction and airway inflammation. Therapeutic use of 1,8-cineole (eucalyptol) against this disorder have gained importance recently. This study aimed to evaluate the effects of eucalyptol on the contractile behavior of airway smooth muscle obtained from ovalbumin-sensitized and challenged guinea-pigs. We also aimed to study the effects of 1,8-cineole on pathophysiological parameters changed by airway inflammation induced by antigen challenge. We used tracheal rings which were mounted in isolated organ chambers to study its contractility. Inflammatory parameters were studied by means of histological analysis of tracheal rings, inflammatory cells counting, cytokine levels and myeloperoxidase (MPO) activity in bronchoalveolar lavage. Additionally, the inspiratory and expiratory pressures and respiratory rate of these animals were evaluated, as well as the mucociliary transport (MCT). The 1,8-cineol (6×10^{-6} to 2×10^{-2} M) decreased the basal tone of epithelium-intact tracheal rings from naïve guinea-pigs with pD_2 value correspondent to 2.23 [2.10 to 2.37]. In either epithelium-removed preparations or in epithelium-intact tracheal rings pretreated with L-NAME, TEA, TTX or propranolol, no significant changes in pharmacological potency or maximal relaxant effect (E_{max}) induced by 1,8-cineole were observed. 1,8-cineol (6.5×10^{-6} to 6.5×10^{-3} M) significantly reversed the histamine-induced contractile response. In Ca^{2+} -free medium maintained in presence of ACh, 1,8-cineole reduced the concentration-effect curve promoted by the addition of Ba^{2+} , but it was ineffective when the curve was induced by adding Ca^{2+} , an effect similar to that of verapamil. 1,8-cineole reduced the contraction induced by the antigen OVA (Schultz-Dale reaction) in tissues obtained from OVA-sensitized and OVA-challenged animals. The 1,8-cineole decreased tracheal hyperreactivity to KCl and CCh observed after antigen challenge by inhibiting selectively the concentration-effect curve induced by KCl. Pretreatment of antigen challenged animals with 1,8-cineole significantly reversed the detrimental changes in histology of the tracheal tissue, as well as changes of the MCT, which were promoted by the antigen challenge. We observed a significant reduction in the total count of inflammatory cells, especially eosinophils and neutrophils, and in the levels of IL-1, TNF- α and MPO in the bronchoalveolar lavage of challenged-animals treated with 1,8-cineole. We also observed increased expression of the anti-inflammatory cytokine, IL-10. Mast cell degranulation was inhibited in naive animals pretreated with 1,8-cineole, an effect similar to that observed with cromolyn. 1,8-cineol reversed the changes produced by antigen challenge in inspiratory and expiratory pressures and respiratory frequency. These results demonstrate that the 1,8-cineole has anti-inflammatory effect when used previously and has a relaxing action on smooth muscle of guinea pig trachea, acting preferentially in electromechanical events in smooth muscle of the airways.

Keywords: eucaliptol, myorelaxant, anti-inflammatory

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do 1,8-cineol	60
Figura 2 - Sistema de cubas isoladas e captação dos dados	70
Figura 3 - Efeito mio-relaxante do 1,8-cineol no tônus basal de traquéia de cobraia	83
Figura 4 - Reversão pelo 1,8-cineol da resposta contrátil de anéis de traquéia de cobraias em resposta à adição de histamina	85
Figura 5 - Efeito do 1,8-cineol e verapamil na curva concentração efeito induzida pelo Ca^{2+} em traquéias de cobraias	87
Figura 6 - Efeito do 1,8-cineol e verapamil na curva concentração efeito induzida pelo Ba^{2+} em traquéias de cobraias	89
Figura 7 - Efeito do 1,8-cineol no músculo liso traqueal contraído <i>in vitro</i> com 10 $\mu\text{g/mL}$ de ovalbumina (OVA)	91
Figura 8 - Curvas concentração-efeito ao KCl (10^{-5} M a 1.2×10^{-4} M) em traquéias isoladas de cobraias sensibilizadas e desafiadas	93
Figura 9 - Curvas concentração-efeito ao CCh (10^{-9} a 10^{-4} M) em traquéias isoladas de cobraias sensibilizadas e desafiadas	96
Figura 10 – Curva concentração efeito ao CCh (10^{-9} a 10^{-4} M) em traquéia isolada de cobraias sensibilizadas e desafiadas submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol	99
Figura 11 - Efeito do pré-tratamento com 1,8-cineol no transporte mucociliar em cobraias naive, sensibilizadas ou desafiadas à ovalbumina (OVA)	101
Figura 12: Fotomicrografia de segmentos do tecido traqueal de cobraias naive, sensibilizadas ou desafiadas à ovalbumina (OVA) submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol.	104
Figura 13 - Efeito do pré-tratamento com 1,8-cineol na resposta migratória de células inflamatórias em cobraias desafiadas à ovalbumina (OVA)	106

Figura 14 - Efeito do pré-tratamento com 1,8-cineol nos níveis de IL-1 (pg/mL) no lavado bronco-alveolar de cobaias desafiadas à ovalbumina (OVA)	109
Figura 15 - Efeito do pré-tratamento com 1,8-cineol nos níveis de TNF- α (pg/mL) no lavado bronco-alveolar de cobaias desafiadas à ovalbumina (OVA)	110
Figura 16 - Efeito do pré-tratamento com 1,8-cineol nos níveis de IL-10 (pg/mL) no lavado bronco-alveolar de cobaias desafiadas à ovalbumina (OVA)	111
Figura 17 - Efeito do pré-tratamento com 1,8-cineol na Atividade de MPO (U/mL) no lavado bronco-alveolar de cobaias desafiadas à ovalbumina (OVA)	113
Figura 18 - Efeito do 1,8-cineol na degranulação de mastócitos em cobaias naive	115
Figura 19 - Análise das pressões expiratórias de cobaias sensibilizadas e desafiadas à ovalbumina submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol	117
Figura 20 - Análise das pressões inspiratórias de cobaias sensibilizadas e desafiadas à ovalbumina submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol	118
Figura 21 - Análise das frequências respiratórias de cobaias sensibilizadas e desafiadas à ovalbumina submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Potência (pD_2) e valores de E_{max} do efeito relaxante induzido por 1,8-cineol no tônus basal de traquéia de cobaias naive	84
Tabela 2 – Potência (pD_2) e valores de E_{max} das curvas concentração-efeito induzidas pelo K^+ em traquéias obtidas de cobaias sensibilizadas ou sensibilizadas e desafiadas à ovalbumina	94
Tabela 3 - Potência (pD_2) e valores de E_{max} das curvas concentração-efeito induzidas pelo CCh em traquéias obtidas de cobaias sensibilizadas ou sensibilizadas e desafiadas à ovalbumina	97
Tabela 4 - Efeito do pré-tratamento por inalação de 1,8-cineol no dano epitelial traqueal provocado pelo desafio antigênico em cobaias sensibilizadas à ovalbumina	103
Tabela 5 - Efeito do pré-tratamento com 1,8-cineol em animais desafiados antigenicamente sobre a contagem diferencial de células (macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos) presentes no lavado bronco-alveolar de cobaias	107

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AMPC	Adenosina 3',5' - monofosfato cíclico
ATP	Trifosfato de Adenosina
Ba²⁺	Íon de Bário
Ca²⁺	Íon de Cálcio
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
CCE	Curva Concentração-efeito
CCh	Carbacol
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação com Animais
CONT	Controle
DAG	Diacilglicerol
DES	Desafiado
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EC₅₀	Concentração necessária para produzir metade da resposta máxima
EGTA	Ácido Etileno Glicol O'-bis(2-aminoetil)-N, N, N', N'-tetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
E_m	Potencial de Membrana
E_{max}	Efeito Máximo
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
fMLP	Formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina
FR	Frequência Respiratória
GMPc	Guanosina 3',5' - monofosfato cíclico
HA	Histamina
HE	Hematoxilina-eosina
HRB	Hiperreatividade Brônquica
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercecelular 1
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato

iPDE4	Inibidor de Fosfodiesterase-4
irpm	Incursões respiratórias por minuto
IVAM-1	Molecula de Adesão da Célula Vascular 1
K_{ca++}	Canal de Potássio dependente de Cálcio
KCl	Cloreto de Potássio
KH₂PO₄	Fosfato Monopotassico
LBA	Lavado Bronco-alveolar
L-NAME	L-nitro-arginina-metil-ester
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB₄	Leucotrieno B ₄
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MgSO₄	Sulfato de Magnésio
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NaH₂PO₄	Fosfato de Sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de Sódio
NANC	Não Adrenérgico e Não Colinérgico
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator de Agregação Plaquetária
pD₂	Cologaritmo da dose necessária para produzir metade da resposta
PDE	Fosfodiesterases
PE	Pressão Expiratória
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PI	Pressão Inspiratória
ROCCs	Canais de Cálcio Operados por Receptor
SENS	Sensibilizado
TEA	Tetraetilamônio
TGF-β	Fator de Crescimento Tumoral beta
TMC	Transporte Mucociliar
TNF-α	Fator de Crescimento Tumoral alfa
TTX	Tetrodotoxina
TXA₂	Tromboxano A ₂
VOCCs	Canais de Cálcio Operados por Voltagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Vias Aéreas Respiratórias	23
1.1.1 Anatomia e Fisiologia das Vias Aéreas	23
1.1.2 Controle Neural das Vias Aéreas	25
<i>1.1.2.1 Sistema Nervoso Colinérgico</i>	25
<i>1.1.2.2 Sistema Nervoso Adrenérgico</i>	26
<i>1.1.2.3 Sistema Nervoso não Adrenérgico e não Colinérgico (NANC)</i>	27
1.1.3 Músculo Liso das Vias Aéreas	28
<i>1.1.3.1 Canais para Cálcio (Ca^{2+})</i>	29
1.1.4 Epitélio das Vias Aéreas	31
1.2 Processo Inflamatório	32
1.3 Processo Asmático	35
1.3.1 Resposta asmática precoce e tardia	42
1.4 Terapêutica Farmacológica da Asma	45
1.4.1 Glicocorticóides	47
1.4.2 Agonistas β_2 -adrenérgicos	48

1.4.3 Metilxantinas	49
1.4.4 Antagonistas de Leucotrienos	51
1.4.5 Cromolin sódico ou nedocromil	51
1.4.6 Inibidores da Fosfodiesterase	52
1.4.7 Fitoterápicos	53
1.5 Produtos Naturais	53
1.5.1 Óleos Essenciais	56
1.5.2 Óleo Essencial de Eucalipto – <i>Eucalyptol globulus</i>	59
1.5.3 1,8-cineol	60
2 JUSTIFICATIVA	65
3 OBJETIVOS	66
4 METODOLOGIA	67
4.1 Materiais e métodos	67
4.1.1 Aspectos Éticos	67
4.1.2 Animais	67
4.1.3 Método de sensibilização dos animais	68
4.1.4 Metodologia de desafio antigênico	68

4.1.5 Experimentos com traquéias isoladas	69
4.2 Protocolos experimentais para estudo da contratilidade Traqueal	71
4.2.1 Confeção das curvas concentração-efeito	71
4.2.2 Farmacologia do 1,8-cineol na musculatura lisa isolada de traquéia de cobaias naive	71
4.2.2.1 CCE para o 1,8-cineol adicionado à preparação sob tônus basal	71
4.2.2.2 CCE para o 1,8-cineol adicionado à preparação sob tônus aumentado pela adição de histamina	72
4.2.2.3 Efeito da adição <i>in vitro</i> do 1,8-cineol na CCE induzida por Ca^{2+} em anéis de traquéia mantidos na presença de acetilcolina em meio sem Ca^{2+}	72
4.2.2.4 Efeito da adição <i>in vitro</i> do 1,8-cineol na CCE induzida por Ba^{2+} em anéis de traquéia mantidos em meio sem Ca^{2+} na presença de acetilcolina	73
4.2.3 Farmacologia do 1,8-cineol na musculatura lisa isolada de traquéia de cobaias sensibilizadas e desafiadas à ovalbumina	73
4.2.3.1 Efeito do 1,8-cineol na contração da traquéia de cobaia induzida pela reação de Schultz-Dale	73
4.2.3.2 Efeito da adição <i>in vitro</i> do 1,8-cineol na CCE induzida por KC	74
4.2.3.3 Efeito da adição <i>in vitro</i> do 1,8-cineol na CCE induzida por CCh	74
4.2.3.4 Efeito da inalação de solução de 1,8-cineol na CCE induzida por CCh	75
4.3 Protocolos experimentais para estudo da inflamação	75
4.3.1 Farmacologia dos efeitos anti-inflamatórios do 1,8-cineol	75

4.3.1.1 Efeito do 1,8-cineol na análise histopatológica de tecido traqueal de cobaia	75
4.3.1.2 Efeito do 1,8-cineol no conteúdo do lavado bronco-alveolar de cobaia	76
<u>4.3.1.2.1 Contagem total e diferencial das células</u>	77
<u>4.3.1.2.2 Técnica Colorimétrica</u>	77
<u>4.3.1.2.3 Técnica Imunoenzimática</u>	78
4.3.1.3 Efeito do 1,8-cineol na degranulação de mastócitos de mesentério de cobaias	78
4.4 Farmacologia do 1,8-cineol nas vias aéreas de cobaias em experimentos <i>in-vivo</i>	79
4.4.1 Efeito do 1,8-cineol na Mensuração da velocidade de transporte mucociliar	79
4.4.2 Medidas das pressões pulmonares	80
4.5 Soluções e drogas	80
4.6 Análise estatística	81
5 RESULTADOS	82
5.1 Análise da Resposta do K⁺ em traquéias isoladas de cobaias	82
5.2 Efeito do 1,8-cineol no tônus basal em traquéias isoladas de cobaias	82
5.3 Efeito do 1,8-cineol na resposta da histamina em traquéias isoladas de cobaias	85

5.4 Efeito do 1,8-cineol e verapamil nas curvas concentração-efeito ao Ca^{2+} em traquéia isolada de cobaia mantida em meio sem Ca^{2+} na presença de acetilcolina	86
5.5 Efeito do 1,8-cineol e verapamil nas curvas concentração-efeito ao Ba^{2+} em traquéia isolada de cobaia mantido em meio sem Ca^{2+} na presença de acetilcolina	88
5.6 Efeito do 1,8-cineol na resposta à Ovalbumina (OVA) em traquéias isoladas de cobaias sensibilizadas e desafiadas ao antígeno sensibilizante	90
5.7 Análise dos efeitos do 1,8-cineol nas curvas concentração-efeito induzida por KCl em traquéias isoladas de cobaias ativamente sensibilizadas e desafiadas com salina ou com antígeno	92
5.8 Análise dos efeitos do 1,8-cineol nas curvas concentração-efeito induzidas por CCh em traquéias isoladas de cobaias ativamente sensibilizadas e desafiadas com salina ou com antígeno	95
5.9 Análise da Curva concentração efeito ao CCh em cobaias sensibilizadas e desafiadas ao antígeno, após inalação de solução contendo 1,8-cineol	98
5.10 Análise dos efeitos do 1,8-cineol no Transporte Mucociliar (TMC) de cobaias anestesiadas ativamente sensibilizadas e desafiadas ao antígeno	100
5.11 Efeito do 1,8-cineol sobre o dano epitelial provocado pelo desafio antigênico por inalação em traquéias de cobaias ativamente sensibilizadas ao antígeno	102
5.12 Efeito do 1,8-cineol na migração de células inflamatórias no lavado bronco-alveolar de cobaias desafiadas à ovalbumina	105
5.13 Efeito do 1,8-cineol sobre os níveis de IL-1, IL-10 e TNF-α no lavado bronco-alveolar de cobaias ativamente desafiadas ao antígeno	108
5.14 Efeito do 1,8-cineol sobre a atividade da enzima mieloperoxidase no lavado bronco-alveolar de cobaias ativamente desafiadas ao antígeno	112
5.15 Efeito do 1,8-cineol na degranulação de mastócitos em mesentério de cobaias	114

5.16 Efeito do 1,8-cineol nas medidas das pressões pulmonares e frequência respiratória de cobaias	116
6 DISCUSSÃO	120
7 CONCLUSÃO	129
REFERÊNCIAS	130
APÊNDICE	156

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vias Aéreas Respiratórias

1.1.1 Anatomia e Fisiologia das Vias Aéreas

As vias aéreas são subdivididas em superiores e inferiores, sendo as primeiras constituídas pelas fossas nasais, nasofaringe, orofaringe, laringe e porção superior da traquéia, e as inferiores pela porção inferior da traquéia, brônquios, bronquíolos e partes distais (alvéolos). A traquéia localiza-se abaixo da laringe, apresentando o formato de um tubo vertical, tendo uma porção cervical e outra torácica, e sendo formada por anéis ou semi-anéis cartilagosos sobrepostos ligados pela membrana cricotraqueal. Na porção posterior da traquéia não existe anel, tal porção é mole e apresenta um músculo traqueal que tensiona as bordas da cartilagem e não deixa que elas se abram. Isso faz com que apresente certa mobilidade. A membrana cricotraqueal reveste externamente todo o órgão e vai unindo os anéis até a bifurcação onde a traquéia se divide, aparecendo uma saliência mediana que é o ponto de divisão, chamada carina.

As vias aéreas vão assim se subdividindo em vários tubos, os quais se ramificam tornando-se cada vez mais curtos e mais numerosos à medida que penetram no pulmão. Assim, o ar chega aos pulmões por meio da traquéia, dos brônquios e dos bronquíolos. A traquéia é denominada via respiratória de primeira geração, e os dois brônquios principais direito e esquerdo de segunda geração, e assim sucessivamente. Já foi determinada a existência de aproximadamente 20 a 25 gerações (brônquicas) antes de o sistema tubular alcançar os alvéolos.

O tecido traqueal e bronquiolar são formados por quatro camadas: uma camada mucosa (epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado e uma lâmina própria), uma camada submucosa, uma camada de músculo liso com peças cartilagosas e uma camada adventícia. Existem três tipos comuns de células no epitélio traqueobronquico: células ciliadas, células caliciformes e células basais (ROSS; REITH; ROMRELL, 1993; BOERS; AMBERGEN; THUNNISSEN, 1998; NAKAJIMA et al., 1998; EVANS et al., 2001). As células ciliadas estão presentes por toda a zona de condução, indo até aos bronquíolos respiratórios. Varrem pelo movimento dos cílios, o muco

desde os pontos mais distais das vias aéreas até a faringe. As células caliciformes estão localizadas entre as células ciliadas. A sua função está na produção do muco que vem somar com aquele produzido pelas glândulas submucosas das vias de condução. Existem ainda as células basais, que funcionam como fonte de novas células, não atingem a superfície do epitélio, estando sobre a lâmina basal.

Cada vez 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. O bronquíolo respiratório, presente na zona de respiração, é constituído por epitélio cilíndrico ou cúbico. Na porção da traquéia e dos brônquios não ocupadas por lâminas de cartilagem, as paredes são formadas por músculo liso; entretanto, a parede dos bronquíolos consiste quase que totalmente por músculo liso, porém nos bronquíolos respiratórios existem apenas algumas fibras musculares lisas. Os alvéolos são sacos aéreos, onde é permitida a troca gasosa. A extremidade distal das vias aéreas da zona respiratória é formada pelo saco alveolar, que vem a ser um conjunto de alvéolos. A sua parede é delgada, sendo recoberto, basicamente, por três tipos de células epiteliais: pneumócitos do tipo I, pneumócitos do tipo II e as células em escova.

As vias aéreas são mantidas úmidas 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.

O ar flui pelas vias aéreas facilmente, visto que menos de 1 cm de água de gradiente de pressão é necessário para se ter uma respiração tranquila. Entretanto, a resistência oferecida ao fluxo aéreo não é observada nos brônquios de pequeno calibre e sim nos brônquios maiores, já próximos à traquéia. Esta resistência é devida a uma menor quantidade destes brônquios maiores em relação aos bronquíolos terminais.

1.1.2 Controle Neural das Vias Aéreas

O Sistema Nervoso Autônomo atua tanto na broncoconstricção como na broncodilatação das vias aéreas, pois os sistemas colinérgico e adrenérgico exercem esta ação em várias espécies (VAN NIEUWSTADT; HAJER; BREUKINK, 1994). Laitinen; Laitinen (1987), Palmer; Barnes (1987) e Barnes (1988) descreveram outros sistemas distintos dos sistemas colinérgico e adrenérgico, os quais interfeririam na contratilidade da musculatura lisa das vias aéreas, o chamado sistema não adrenérgico e não colinérgico (NANC). Sendo assim, a inervação das vias aéreas feita por quatro classes de nervos autonômicos: nervos colinérgicos, nervos adrenérgicos, nervos excitatórios não adrenérgico e não colinérgico e nervos inibitórios não adrenérgico e não colinérgico. Van Nieuwstadt; Hajer; Breukink (1994) destacaram a existência, bem como a diferença quanto à distribuição da densidade dos receptores para os três sistemas Colinérgico, Adrenérgico e NANC entre as espécies.

1.1.2.1 Sistema Nervoso Colinérgico

Ao nível das vias aéreas, o sistema nervoso colinérgico é constituído principalmente pelas fibras pós-ganglionares do Sistema Nervoso Parassimpático, possuindo grande importância na manutenção do tônus da musculatura lisa das vias aéreas, constituindo o principal sistema de controle motor, onde medeiam a broncoconstricção de vários animais, incluindo cobaia e homem (NADEL, 1980; GROSS; SKORODIN, 1984; BARNES, 1986; PENDRY, 1993; VAN DER VELDEN; HULSMANN, 1999; CANNING; FISCHER, 2001; WALKER et al., 2004).

Mazzone; Canning (2002) ressaltam que os nervos colinérgicos que provém do Sistema Nervoso Parassimpático inervam diretamente a musculatura lisa respiratória; sua ativação tem como consequência a broncoconstricção. As células secretoras, também recebem inervação colinérgica. Os gânglios parassimpáticos estão intimamente aderidos às paredes dos brônquios e bronquíolos, liberando um neurotransmissor, a acetilcolina, através dos neurônios pós-ganglionares.

Os receptores muscarínicos M_3 medeiam à contração induzida pela ACh em músculo liso das vias aéreas, e os receptores muscarínicos M_2 , localizados pré e pós-juncional, apresentam efeito oposto na regulação do tônus das vias aéreas (JACOBY; FRYER, 2001), pois o *feedback* negativo evidenciado nos receptores M_2 pré-juncional

limita a ação da liberação da ACh para a estimulação dos nervos colinérgicos, limitando assim o nível de broncoconstricção. Em contraste, os receptores M_2 pós-juncional ativam a Proteína $G_{\alpha i}$, podendo aumentar o nível de broncoconstricção por oposição a eventos mediados pela Proteína $G_{\alpha s}$, incluindo a ativação da adenil ciclase ou abertura da condutância de cálcio ativado pelos canais de potássio (FRYER et al., 1999; WALKER et al., 2004).

O nível da broncoconstricção é quem determina a severidade do quadro de asma, a qual pode ser amenizada pelo uso de drogas broncodilatadoras. Estudos em vias aéreas de animais mostram excessiva ativação de receptores muscarínicos M_2 pós-juncionais, sendo contraposto pela ativação dos receptores β_2 adrenérgicos, os quais podem inibir a contração, provocando o relaxamento das vias aéreas (WALKER et al., 2004).

1.1.2.2 Sistema Nervoso Adrenérgico

A inervação adrenérgica na musculatura lisa respiratória é pobre (VAN NIEUWSTADT; HAJER; BREUKINK, 1994), pois Zaagsma et al., em 1987, já haviam destacado que a musculatura lisa das vias aéreas de humanos parecia estar isenta de nervos adrenérgicos. Esta ausência de inervação adrenérgica ao nível da musculatura lisa das vias aéreas de humanos foi reafirmada por Rang; Dale; Ritter (1997), relatando cabalmente que a musculatura lisa bronquial não sofre influência do sistema simpático. Entretanto, em bois e cães foi evidenciada moderada, mas presente inervação adrenérgica na musculatura lisa das vias aéreas (VAN NIEUWSTADT; HAJER; BREUKINK, 1994).

Trabalhos de O'Donnell; Saar; Wood (1978) e Doidge; Satchell (1982) já haviam detectado a presença de fibras adrenérgicas, apesar de esparsas, nas vias respiratórias de cobaias, principalmente na traquéia, mas não conseguiram detectá-las ao nível da musculatura lisa bronquiolar. Apesar das controvérsias do controle exercido pelo sistema nervoso simpático, pela inexistência em seres humanos, ou existência pobre em outros grupos animais de fibras adrenérgicas na musculatura lisa das vias aéreas, os receptores adrenérgicos (do tipo β_2) têm importante papel no relaxamento bronquial, provavelmente através da ativação pela adrenalina circulante (VAN DER VELDEN; HULSMANN, 1999; STEPHENS, 2002). Oh et al. (2006) demonstraram que o reflexo do nervo simpático medeia o relaxamento do músculo liso das vias aéreas de traquéia de cobaia.

1.1.2.3 Sistema Nervoso não Adrenérgico e não Colinérgico (NANC)

A via neuronal não adrenérgica e não colinérgica citada pela primeira vez por Coburn; Tomita (1973) está também envolvida nos mecanismos broncoconstrictor e broncodilatador das vias aéreas. Na musculatura lisa bronquiolar em adição aos nervos simpáticos e parassimpáticos, o controle neural da respiração se dá também pela inibição e excitação dos nervos não adrenérgicos e não colinérgicos do Sistema NANC. No sistema NANC existem mediadores, incluindo substância P, neurocinina A, peptídeo intestinal vasoativo e óxido nítrico, que podem causar relaxamento ou contração da musculatura lisa bronquial, que são mediadores inibitórios (broncodilatadores) (MAARSINGH et al., 2005) e excitatórios (broncoconstrictores), apresentando importante papel na patogênese da asma (JOOS; GERMONPRE; PAUWWLS, 2000).

As fibras nervosas NANC estão presentes no epitélio das vias aéreas, nos músculos e vasos sanguíneos, liberando taquicininas, incluindo substância P, neurocinina A e neurocinina B (SAETTA; FINKELSTEIN; COSIO, 1994). Embora as vias aéreas estejam sob forte controle colinérgico, outros mediadores também exercem seu controle, tais como leucotrienos, prostaglandinas, histamina e serotonina (SOLWAY; LEFF, 1991; BELVISI et al., 1993).

Richardson (1979), Barnes (1986) e Van der Velden; Hulsmann (1999) demonstraram a existência de mecanismos não adrenérgicos não colinérgicos excitatórios e inibitórios nas vias aéreas de animais e seres humanos; bem como, a contração neural não colinérgica foi demonstrada em vias aéreas de cobaia *in-vitro* (GRUNDSTROM; ANDERSSON; WIKBERG, 1981).

Esta broncoconstrição não colinérgica em cobaias é mediada por reflexo axonal local envolvendo fibra nervosa sensorial (LUNDBERG; SARIA, 1982-1983). Shah; Page; Spina (1998) demonstraram que a estimulação elétrica de campo, em brônquios isolados de cobaias, induziu uma resposta contrátil não-adrenérgico não-colinérgico (NANC).

O papel importante dos neurônios sensoriais aferentes não mielinizados (fibras C) na regulação das funções das vias aéreas tem sido extensivamente observado em várias espécies, incluindo a humana. A ativação desses neurônios por vários tipos de irritantes, como cigarro, ar frio e solução salina hipertônica, ou mediadores químicos endógenos pode resultar na broncoconstrição reflexa, via mecanismo colinérgico mediado centralmente (COLERIDGE; COLERIDGE, 1984; ANDERSON; FISCHER,

1993). Além disso, a estimulação das fibras C por estímulos químicos, como a capsaicina, resulta na liberação de taquicininas, tais como a substância P, neurocinina A e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, que possuem efeitos biológicos potentes em vários tipos celulares, incluindo a célula muscular lisa das vias aéreas (HOLZER, 1988; COLERIDGE; COLERIDGE, 1995; LEE; PISARRI, 2001).

Neuropeptídeos excitatórios NANC não somente tem papel na asma pela sua ação direta na musculatura lisa bronquial ou vascular; porém, nos últimos anos, existem evidências de que os neuropeptídeos são moduladores de células imunes, semelhantes aos mastócitos, eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (KRANEVELD et al., 2000).

1.1.3 Músculo Liso das Vias Aéreas

A estrutura das células musculares lisas e sua organização diferem em cada órgão quanto as suas dimensões, feixes, camadas, respostas aos estímulos contráteis, características de inervação e função. O músculo liso pode ser classificado em duas formas principais, multiunitário e unitário, sendo esta última a classificação dada ao músculo das vias aéreas humanas. O músculo liso unitário se caracteriza pela presença de uma massa única que se contrai como uma só unidade.

As fibras musculares lisas, em geral, se apresentam agregadas em camadas ou feixes, estando aderidas entre si por suas membranas celulares, que contêm múltiplos pontos de adesão; estes pontos conferem à capacidade de transmitir a força contrátil de uma célula à outra. As membranas são acopladas por junções abertas, pelas quais pode ocorrer a livre passagem de íons, de modo que os potenciais de ação ou mesmo o fluxo iônico possa passar por fibras adjacentes.

O comportamento anormal do músculo liso, constituinte da maioria dos sistemas fisiológicos como vasos sanguíneos, trato gastrointestinal e vias aéreas, está relacionado a uma série de doenças, incluindo hipertensão, aterosclerose e asma brônquica. Pesquisadores tentam elucidar as características biofísicas e bioquímicas do músculo liso das vias aéreas, visando uma melhor compreensão de como se dá a sua alteração na asma (STEPHENS, 2002; WEBB, 2003).

A contratilidade da musculatura lisa das vias aéreas contribui para o aumento da resistência das vias aéreas em doenças semelhantes à asma (KIM; HOQUE; HAI, 2004), pois a musculatura lisa destas vias tem efeito no controle do calibre das vias aéreas,

sendo susceptível a disfunções na musculatura, contribuindo, assim, para a patogênese da asma. Pode favorecer a mudanças, resultando em inflamação aguda ou crônica dessas vias, associada com reparação tecidual ou remodelamento do tecido (AN et al., 2007).

A contração excessiva das células da musculatura das vias aéreas é uma das causas do desencadeamento da asma. Essa mudança na função contráctil da musculatura secundária à inflamação das vias aéreas pode contribuir para o aumento da resistência do fluxo aéreo, devido à presença de hipersecreção e a espessura das vias aéreas (BAI; ZHANG; SANDERSON, 2007). Tais alterações podem ser induzidas em animais de laboratório através de sensibilização e desafio, por inalação de substâncias alérgicas irritantes (HARKEMA; WAGNER, 2005). A musculatura lisa pode ser estimulada por agonistas, tais como: colinérgicos (NAKAZAWA et al., 1990), peptídeos (NAKAZAWA et al., 1990; LEE; SHUTTLEWORTH; SANDERS, 1995), norepinefrina (INOUE; KURIYAMA, 1993), endotelina (CHEN; WAGONER, 1991), histamina (KOMORI et al., 1992) angiotensina (NOUAILHETAS et al., 1994), e ATP (XIONG; KITAMURA; KURIYAMA, 1991).

1.1.3.1 Canais para Cálcio (Ca^{2+})

O cálcio (Ca^{2+}) é praticamente um mensageiro universal que controla uma diversidade de processos celulares, como a transcrição de genes, a proliferação celular e a contração muscular (BOOTMAN et al., 2001). O processo de contração da célula muscular lisa foi descrito por Somlyo; Somlyo (1968), como sendo iniciado pelo aumento na concentração intracelular dos íons Ca^{2+} , que pode ocorrer através de vários mensageiros e/ou canais. Dentre os mensageiros envolvidos incluem-se o inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), o diacilglicerol (DAG), o ácido araquidônico e o próprio Ca^{2+} (BOOTMAN; BERRIDGE; RODERICK, 2002)

Os canais para Ca^{2+} são responsáveis pela entrada desse íon na célula em resposta à sinalização da membrana, e podem ser classificados em: (I) canais de entrada de Ca^{2+} e (II) canais de liberação de Ca^{2+} . A primeira classe subdivide-se em: (1) canais para Ca^{2+} voltagem-dependentes, que são ativados por despolarização da membrana através de estímulos químicos ou elétricos; (2) canais para Ca^{2+} operados por receptor, que envolve a ativação de receptores e está a uma mínima ou inexistente despolarização da membrana; e (3) canais para Ca^{2+} capacitativos, os quais são operados pela depleção de estoques intracelulares. A segunda categoria inclui os canais ativados por IP_3

(BENOFF, 1998; STEPHENS, 2002). A existência de diferença no mecanismo de sinalização do Ca^{2+} nas células da musculatura lisa pode ser responsável pela variação da contração das vias aéreas (BAI; ZHANG; SANDERSON, 2007), o que torna este processo o principal mecanismo regulatório do estado contrátil destas células (AKATA, 2007).

O acoplamento eletromecânico opera uma mudança no potencial de membrana devido ao efeito da concentração de Ca^{2+} no citoplasma. A liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático pode ser pela ativação de canais de Ca^{2+} via K^+ , e canais de Cl^- (SOMLYO; SOMLYO, 1994). Esse acoplamento de excitação-contração consiste do controle da contração muscular por potencial de membrana (acoplamento eletromecânico), e controle da contração muscular independente do potencial de membrana, não necessariamente independente da concentração de Ca^{2+} intracelular (farmacomecânico) (CARL; LEE; SANDERS, 1996).

Estes autores destacam, ainda, que o papel central do Ca^{2+} está em ambos os acoplamentos, eletro e farmacomecânico em tecido muscular liso, devido à habilidade da calmodulina e da ativação da fosforilação da miosina por miosina quinase.

Em traquéia de cobaia, o KCl em baixas concentrações não induz potenciais de ação, mas promove atividades de ondas lentas e, em concentrações mais elevadas, dispara potencial de ação (SMALL; FOSTER, 1990). Os efeitos espasmogênicos do KCl podem depender do influxo de Ca^{2+} através dos canais de membrana dependentes de voltagem (FOSTER; SMALL; WESTON, 1983). Similarmente ao KCl, os efeitos espasmogênicos do tetraetilamônio (TEA) em músculo liso respiratório dependem do influxo de Ca^{2+} por meio de canais de Ca^{2+} , dependentes de voltagem (WEISS; PANG; GOODMAN, 1985)

Os efeitos espasmogênicos da ACh e HA, em músculo liso das vias aéreas, provavelmente não dependem diretamente da abertura de canais de Ca^{2+} voltagem dependentes (FOSTER; OKPALUGO; SMALL, 1984; AHMED; FOSTER; SMALL, 1985), e sim do influxo de Ca^{2+} através de canais operados por receptores, mas, provavelmente, da liberação de estoques de Ca^{2+} intracelular (FOSTER; SMALL; WESTON, 1983; SANDERSON et al., 2008).

O papel crucial desses canais de Ca^{2+} tipo L na musculatura lisa das vias aéreas sugere que eles podem ser importantes na terapêutica de doenças das vias aéreas (HIROTA et al., 2003).

1.1.4 Epitélio das Vias Aéreas

O dano no epitélio das vias aéreas afeta a responsividade dessas vias de várias formas: (I) O epitélio atua como uma barreira fisiológica para difusão, assim ao ocorrer o dano epitelial, alérgenos, irritantes, gases e agonistas atingem com mais facilidade a célula muscular lisa. (II) A camada epitelial protege os neurônios da estimulação por produtos inalados, como os citados anteriormente. Portanto, a camada epitelial ao ser danificada expõe os neurônios sensoriais à ação de irritantes, por exemplo, e conseqüente broncoconstricção reflexa. (III) A camada epitelial tem uma função metabólica. Acetilcolina, histamina e neuropeptídios podem ser sintetizados e/ou metabolizados pelas células epiteliais. Dessa forma, uma disfunção da camada epitelial pode resultar no aumento da concentração de vários agentes contráteis. (IV) O epitélio das vias aéreas possui função secretora, sintetizando muco, citocinas e fatores relaxantes, como a prostaglandina E_2 e o óxido nítrico (STERK; BEL, 1989; FOLKERTS; NIJKMP, 1998).

O interesse na modulação da função da musculatura das vias aéreas pelo epitélio tem sido estimulado por observações de que danos no epitélio são comumente relacionados com doenças respiratórias, caracterizadas por aumento da responsividade das vias aéreas, com o a asma e a displasia broncopulmonar (LAITINEN et al., 1988; JEFFERY et al., 1989; MONTEFORT et al., 1992). Esse dano epitelial pode afetar a responsividade da musculatura lisa por provocar alterações importantes na sua função, que são: ação protetora e seletividade da barreira e liberação de substâncias que modulam a atividade do músculo liso. As substâncias originalmente liberadas no epitélio da musculatura lisa das vias aéreas são: Eicosanóides, citocinas, óxido nítrico, e fator derivado do epitélio (DORTCH-CARNES; SCOTT; FEDAN, 1999).

As células epiteliais ciliadas são indispensáveis para remoção e transporte de corpo estranho ou bactéria pelo muco das vias aéreas. A motilidade está regulada por transmissões autonômicas, hormônios, mediadores químicos, neuropeptídeos e materiais ativados fisiologicamente, como é evidenciada com os agonistas β_2 -adrenoceptores que facilitam os batimentos dos cílios das células ciliadas *in vitro* e *in vivo*, pois o clearance mucociliar é importante na função de manutenção das vias aéreas, estando o mesmo na dependência do transporte mucociliar das vias aéreas (KIMOTO et al., 1999).

A resposta imune na asma envolve alterações nas células do epitélio, ativação da produção de citocinas, ativação de células dendríticas e ativação de células residentes inflamatórias, incluindo mastócitos, eosinófilos e neutrófilos (BUSSE; LEMANSKE, 2001; GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008)

As mudanças da função das vias aéreas de um indivíduo asmático são múltiplas e complexas. As vias aéreas exibem um epitélio desnudo, disfunção nos cílios, hiperplasia celular e hipertrofia das glândulas da mucosa. A produção de muco pelo epitélio de um paciente asmático exibe um aumento da elasticidade, da viscosidade, do conteúdo de mucina, além de uma disfunção do surfactante. Os tecidos da submucosa mostram uma significativa infiltração de células inflamatórias caracterizada por linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e novos vasos (angiogênese). A musculatura lisa das vias aéreas apresenta hipertrofia e hiperplasia, o que pode contribuir para o aumento da contratilidade da musculatura lisa em indivíduos asmáticos (BUSSE; LEMANSKE, 2001; PASCUAL; PETERS, 2005; GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008), levando a sintomas e anormalidades na função respiratória desses pacientes (AN et al., 2007).

Todavia, a inflamação crônica pode resultar em remodelamento das vias aéreas, caracterizado por hipertrofia da musculatura lisa e glândulas mucosas, bem como por fibrose subepitelial (KEINAN et al., 2005).

1.2 Processo Inflamatório

A inflamação é um mecanismo de defesa e de reparo do organismo animal em resposta a um agente invasor. Isso remota a registros de suas características clínicas em papiros egípcios (~ 3.000 a.C.), porém foi Celso (Século I d.C.) que relacionou os quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, calor, dor e edema (WEISSMAN, 1992).

O processo envolve uma reação complexa aos agentes nocivos, como microorganismos e células danificadas, que compreende respostas vasculares, migração e ativação de leucócitos e reações sistêmicas. Muitos tecidos e células participam dessa reação, incluindo o fluido, proteínas plasmáticas, células circulantes, vasos sanguíneos e componentes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo. As células circulantes incluem neutrófilos, monócitos e eosinófilos. As células do tecido conjuntivo incluem os mastócitos, que estão intimamente ligados aos vasos sanguíneos, fibroblastos, macrófagos locais e linfócitos. Na matriz extracelular, estão envolvidos proteínas

fibrosas estruturais (colágeno e elastina), glicoproteínas de adesão (fibronectina, laminina, colágeno não-fibrilar, tenascina e outras) e proteoglicanos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A inflamação aguda é uma resposta rápida a um agente nocivo, encarregada de levar mediadores da defesa do hospedeiro ao local da lesão. Na resposta vascular, a vasodilatação é uma das primeiras manifestações da inflamação aguda, produzida pela ação de vários mediadores, como histamina e óxido nítrico; sendo ainda, responsável pelo calor e rubor. A vasodilatação é seguida pelo aumento na permeabilidade da microcirculação, que leva ao extravasamento de fluido rico em proteína (exsudato) para o tecido extravascular, causando o edema (SUFFREDINI, 1999).

A migração e a ativação de leucócitos são consideradas um dos principais mecanismos de defesa da imunidade inata. O processo de migração dos leucócitos ocorre inicialmente pela marginação, rolamento e adesão ao endotélio, seguido da diapedese através do endotélio e, por último, ocorre à migração nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo quimiotático (MULLER, 2002).

Durante o processo de migração, há o acúmulo de leucócitos na periferia do fluxo, próximo à superfície vascular. Subsequentemente, os leucócitos vão rolando pelo endotélio, aderindo transitoriamente a ele (processo chamado de rolamento) através das E e P-selectinas, moléculas de adesão apresentadas pelas células endoteliais que se ligam às moléculas de glicoproteínas na superfície dos leucócitos, que por sua vez também apresentam L-selectina na sua superfície. A firme adesão dos leucócitos ocorre após sua ativação por mediadores como PAF, IL-8, fator de complemento C5a, citocinas e produtos bacterianos, fMLP e lipopolissacarídeo – LPS. Os mediadores ligam-se aos neutrófilos por meio de receptores acoplados a proteína G. A adesão dos leucócitos à parede do vaso sanguíneo finalmente ocorre por meio de integrinas (CD1a (b, c) / CD18), que após a ativação dos leucócitos, são capazes de se ligar à molécula de adesão (molécula de adesão intercelular 1 – ICAM-1 e molécula de adesão da célula vascular – VCAM-1) da superfície endotelial. Ocorre, então, aumento da permeabilidade e os leucócitos migram para o interstício, processo este que é facilitado pela ação de enzimas proteolítica, como a elastase e a colagenase (MANTOVANI; SOZZANI; INTRONA, 1997; GONZALEZ-AMARO; SANCHEZ-MADRID, 1999; MCEVER, 2002; HYNES, 2002).

A migração unidirecional de células inflamatórias, como neutrófilos e monócitos, através dos espaços endoteliais ocorre através de gradiente de concentração

de fatores quimiotáticos (WITKO-SARSAT et al., 2000). O tipo de leucócito que migra varia com a duração da resposta inflamatória e com o tipo do estímulo. Em geral, na inflamação aguda os neutrófilos predominam no infiltrado inflamatório durante as primeiras 6 a 24 horas, sendo substituídos pelos monócitos depois de 24 a 48 horas (MADGER; PROBER, 2001; ROSSI; ZLOTNIK, 2000; JONES, 2000).

A inflamação aguda ou crônica pode ser observada durante as exacerbações com aumento de eosinófilos e neutrófilos (CARAMORI; ADCOCK, 2003), pois a inflamação clínica é definida por um processo patofisiológico caracterizado por vermelhidão, edema, dor e diminuição da função (KIM et al., 2004).

Todavia, os macrófagos são a chave das células inflamatórias e tem sido documentado um papel crítico em várias desordens das vias aéreas (YAO et al., 2005)

A descoberta dos neutrófilos, em 1880, por Elie Metchnikoff, e estudos na área da inflamação vieram mostrar que ele seria o componente celular mais abundante do sistema imune, e compreende 90% dos granulócitos circulantes. Ao migrarem para o foco inflamatório, os neutrófilos são estimulados, reconhecendo e fagocitando as bactérias e outros microorganismos, que são expostos a um arsenal de enzimas hidrolíticas armazenadas nos grânulos da célula, além de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) formadas mediante a estimulação dos neutrófilos (NISHIO et al., 2008; RASTOGI et al., 2008; WITKO-SARSAT et al., 2000).

Os neutrófilos possuem três tipos de grânulos, os primários ou azurófilos; os secundários ou específicos e os terciários ou gelatinase, que diferem quanto as suas funções primárias (BORREGAARD; COWLAND, 1997).

Os grânulos primários ou azurófilos contêm proteínas e peptídios direcionados para a destruição de microorganismos e à digestão, enquanto os grânulos específicos complementam os componentes da membrana e auxiliam para limitar as reações de radicais livres. Os grânulos azurófilos contêm mieloperoxidase (MPO) e três proteinases neutras; a catepsina G, a elastase e a proteinase 3 (CIEUTAT et al., 1998; KOLSET; GALLAGHER, 1990). Os grânulos específicos contêm lactoferrina insaturada, uma proteína que se liga e sequestra o ferro e o cobre presentes, gelatinase e outras proteínas que são encontradas na membrana plasmática, incluindo flavocitocromo b₅₅₈ e NADPH oxidase. Os grânulos terciários ou gelatinase possuem esse termo para indicar a presença de gelatinase e não de lactoferrina (HIBBS; BAINTON, 1989, NABOKINA, 2001).

A expressão aumentada da atividade da MPO tem sido evidenciada em várias doenças como: processos infecciosos, inflamatórios e isquêmicos. Esse aumento significativo da atividade da MPO se dá em proporção direta ao número de neutrófilos infiltrados no tecido. A atividade dessa enzima tem sido utilizada como índice de migração leucocitária (MARUYAMA; LINDHOLM; STENVINKEL, 2004). Assim, a MPO caracteriza-se como um mediador pró-inflamatório, além das suas atividades bactericida e enzimática (LAU et al., 2005).

A inflamação das vias aéreas consiste em papel central na patogênese de diversas doenças, incluindo a asma, a bronquite crônica, a bronquiectasia e as doenças obstrutivas crônicas (JUERGENS; STOBER; VETTER, 1998; JUERGENS et al., 1998), visto que os leucotrienos e a histamina originados dos mastócitos contribuem de forma efetiva para a broncoconstrição, o que torna os mastócitos um componente importante na patogênese destas doenças (LIN; LAI, 2005; BARNES, 2008).

A Histamina é o principal mediador liberado pelos mastócitos (YU et al., 2008). Estudos prévios de Yu et al. (2007) mostraram que o desafio à ovalbumina (OVA) *in vitro* induz a liberação de quantidades significativas de histamina dos mastócitos do esôfago de cobaias ativamente sensibilizados. Todavia, Kung et al. (1995) demonstram que a indução por inalação de alérgeno ativa mastócitos e eosinófilos nas vias aéreas, e que esse desafio por aerossol de ovalbumina em cobaias ativamente sensibilizadas resulta, na fase imediata, em redistribuição de mastócitos no epitélio do esôfago e, na fase tardia, em infiltração de eosinófilo na mucosa do esôfago.

As células inflamatórias possuem capacidade de produzirem oxidantes. No foco inflamatório, eosinófilos, neutrófilos, monócitos e macrófagos ativados, além das células epiteliais bronquial podem gerar oxidantes (BARNES; CHUNG; PAGE, 1998; HENRICKS; NIJKAMP, 2001; BOWLER; CRAPO, 2002).

Existem evidências que a inflamação crônica das vias aéreas observada na asma, resulta de um estresse oxidativo acentuado. Muitos dos estímulos que exacerbam a asma, incluindo infecções virais e poluentes, podem ativar a produção de oxidantes, induzindo à inflamação que produz os sintomas asmáticos (CARAMORI; PAPI, 2004).

1.3 Processo Asmático

Desde 1921 observava-se que indivíduos portadores de asma apresentavam a respiração asmática típica, após terem sido injetados com pilocarpina; entretanto, este

fato não era observado quando os pacientes eram indivíduos normais, não portadores de asma. Como a adrenalina causava alívio imediato nestas crises, os pesquisadores inferiram que os sintomas estavam relacionados com o desenvolvimento de broncoconstrição e especularam que o desequilíbrio nos sistemas nervosos simpático e parassimpático era um dos principais causadores deste sintoma respiratório.

Há indícios de que a asma começa a ser definida ainda na fase intra-uterina. Segundo estudos, a suscetibilidade para a asma é, em grande parte, determinada durante o desenvolvimento fetal e nos primeiros três a cinco anos de vida (WARNER et al., 1998). Fatores genéticos e ambientais operam num momento do desenvolvimento/crescimento pulmonar, definindo a estrutura e a função das vias aéreas. Alterações durante este período crítico tornam as vias aéreas mais suscetíveis aos poluentes ambientais e as predispõem à sensibilização por alérgenos (MARTINEZ, 1999).

A asma é uma doença muito comum, cujos números de portadores vêm crescendo em todo o mundo. Ela é caracterizada por obstrução das vias aéreas, a qual pode ser reversível. É uma doença inflamatória crônica das vias respiratórias, que envolve o recrutamento e ativação de células inflamatórias e mudanças estruturais nas células do pulmão, devido à expressão de múltiplas proteínas inflamatórias, incluindo citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas inflamatórias. Ela apresenta períodos de episódios e exacerbações, estando relacionada com o aumento da intensidade inflamatória das vias aéreas de condutância (BARNES, 2000; JEFFERY, 2000; CARAMORI; ADCOCK, 2003; BARNES, 2008), envolvendo disfunção do epitélio, mudança na função e hiperresponsividade bronquial não-específica, e obstrução ao fluxo aéreo, favorecendo um evidente dano no tecido epitelial, com diminuição da barreira funcional (SWINDLE; COLLINS; DAVIES, 2009).

Clinicamente, a asma se caracteriza por crises de tosse, sibilância, aperto no peito e dificuldade para respirar, particularmente à noite e pela manhã ao despertar. Este processo inflamatório nas vias aéreas é de um tipo especial, porque torna as vias aéreas hiper-reativas a uma grande variedade de estímulos (CHUNG et al., 1990; PAUWELS et al., 2001), através da interação de fatores genéticos e ambientais (BUSSE; LEMANSKE, 2001; COOKSON, 1999; KUMAR 2001; CARAMORI; ADCOCK, 2003).

Caramori; Adcock (2003) descreveram que na asma ocorre um aumento na expressão dos componentes inflamatórios, sendo caracterizada pela

hiperresponsabilidade bronquial, que significa a capacidade das vias aéreas em responder excessivamente aos estímulos específicos e inespecíficos (MORENO; HOGG; PARE, 1986; KIPS et al., 2003; EPSTEIN, 2004).

Muitos fatores contribuem na broncoconstrição das vias aéreas, sendo a diminuição do lúmem das vias aéreas o evento principal da asma. Além da broncoconstrição, tem sido descrito que a asma também está associada com a hipertrofia e/ou hiperplasia da musculatura lisa das vias aéreas, o que pode contribuir para a redução do seu lúmem (LEI et al., 1997).

A causa da asma não está bem conhecida, porém a inflamação aguda e crônica tem sido a principal hipótese para explicar o comportamento anormal das vias aéreas. Vários mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, que são liberados em células residentes do pulmão, tais como células T e outras células inflamatórias recrutadas nas vias aéreas, favorecem a inflamação das vias aéreas na asma.

A inflamação aguda vem da degranulação de mastócitos mediada pela ligação da IgE, causando permeabilidade microvascular (ELIAS et al., 2003), descontinuidade do epitélio, estimulação dos reflexos neural e secreção das glândulas mucosas. A inflamação crônica pode resultar em remodelamento das vias aéreas, caracterizada por hipertrofia da musculatura lisa, glândulas mucosas e fibrose subepitelial (KEINAN et al., 2005). Essa inflamação é devido à infiltração de linfócitos tipo T, eosinófilos, macrófagos/monócitos e mastócitos (CAMARONI; ADCOCK, 2003).

Conforme destacado, na asma há grande vasodilatação brônquica ao nível capilar e de veias capilares, devido a ação de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, levando a um aumento do número e do calibre dos vasos, e edema em consequência do extravasamento da microcirculação. Esse fator de permeabilidade alterada provocaria implicações diretas no remodelamento brônquico (MAUAD et al., 2000), pois a agressão repetida ou intensa ao epitélio da via aérea, associada à inflamação seria o evento inicial do desencadeamento do processo anormal de reparo na asma. Os eosinófilos teriam participação fundamental neste processo, visto que causam lesão epitelial e estimulam a fibrogênese por meio da produção de fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) e citocina, que regulam a produção de colágeno. Os mastócitos também podem produzir citocinas, como o fator de crescimento tumoral alfa (TNF- α), a Interleucina 4 (IL-4), o fator de crescimento fibroblástico (FGF), que além de influenciar na proliferação fibroblástica, atua na digestão da matriz extracelular (HARAGUCHI; SHIMURA; SHIRATO, 1999; MAUAD et al., 2000).

Na asma, os mastócitos parecem ter papel chave na liberação de vários broncoconstritores, incluindo histamina e mediadores, como leucotrienos C4, D4, E4 e prostaglandinas D2 (CHINEN; SHEARER, 2004; REBER; DA SILVA; FROSSART, 2006). A presença de mastócitos na musculatura lisa das vias aéreas tem sido relacionada à hiperresponsividade das vias aéreas em pacientes asmáticos (BRIGHTING, 2002).

Muitas citocinas e mediadores inflamatórios estão envolvidos nessas condições; a interleucina (IL-10) é um importante imunorregulador e citocina anti-inflamatória na patogênese da asma (WU et al., 2006; BELLENGHAUSEN; KNOP; SALOGA, 2001), uma vez que com o seu nível aumentado contribui para a diminuição da inflamação das vias aéreas (CEYHAN; ENC; SAHIN, 2004; LYON et al., 2004; STELMACH et al., 2002; BARNES; 2002). Os mecanismos da inflamação crônica das vias aéreas, bem como na asma, não estão completamente conhecidos, porém considera-se que ocorram através de um aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios e da redução de citocinas anti-inflamatórias (BARNES, 1994). Wu et al. (2006) demonstraram que em diversos estudos a IL-10 inibi a produção de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF.

O TNF- α é produzido, principalmente, por macrófagos e por varias células pró-inflamatórias, incluindo monócitos, células dentríticas, linfócitos tipo B e T, neutrófilos, mastócitos e eosinófilos, como também por células estruturais, incluindo fibroblastos, células epiteliais e células musculares lisa, estando relacionado à doença inflamatória crônica (BARNES; 2002; LONG, 2009).

A contribuição do TNF- α na resposta inflamatória das vias aéreas está relacionada ao aumento da severidade da asma, o qual apresenta sua expressão aumentada em cerca de 30 vezes, em pacientes asmáticos controlados (HOWARTH et al., 2005).

Os mastócitos devem ser considerados como parâmetro importante na fisiopatologia da asma (ROSSI, OLIVIERI, 1997), pois a liberação de mediadores dependente IgE, semelhante a histamina dos mastócitos tem papel na patogênese de doenças, semelhante a asma alérgica (BRADDING; HOLGATE, 1996; PAGE et al., 2001)

Tem sido mostrado que o número de mastócitos em músculo liso de pacientes com asma é correlacionado com o grau de hipersensibilidade das vias aéreas (BRIGHTLING et al., 2002)

O processo asmático é caracterizado por uma hiperresponsividade bronquial das vias aéreas, que até meados do século passado era atribuído ao mesmo "mecanismo nervoso anormal". Porém, Barnes (1989) demonstrou em experimentos laboratoriais e estudos clínicos que a hiperresponsividade bronquial poderia ser consequência da resposta inflamatória das vias aéreas. Este processo de hiperresponsividade pode ser exacerbado por infecções virais e o aumento da resposta broncoconstrictora desenvolver-se-ia para vários estímulos que causassem contração da musculatura lisa das vias aéreas (DUSSER et al., 1989).

O músculo liso brônquico é um dos principais alvos de atenção entre os estudiosos da asma. Mauad et al. (2000) destacaram que vários estudos mostraram que há hipertrofia e hiperplasia da camada muscular, sendo os trabalhos mais clássicos os de Heard; Hossain (1973) e Hossain (1973), que demonstraram, em material de autópsia, hiperplasia e hipertrofia de células musculares lisas brônquicas de pacientes asmáticos. A hiperplasia e hipertrofia de glândulas submucosas contribuem para a excessiva produção de muco presente na asma. James; Carroll (1995) já haviam destacado que a presença de muco, na luz das vias aéreas, pode aumentar substancialmente a sua resistência para graus leves de contração do músculo liso dessas vias.

O aumento da massa muscular poderia refletir: a) proliferação muscular induzida por mediadores inflamatórios; b) hipertrofia em decorrência de episódios repetidos de broncoespasmo; c) controle inibitório muscular reduzido, levando a uma atividade miogênica aumentada (MAUAD et al., 2000). Por isso, na asma a contração da musculatura lisa das vias aéreas é outro fator característico dessa enfermidade. O Ca^{2+} tem papel central na fisiopatologia da asma, e no envolvimento do mecanismo de acoplamento excitação-contração das células musculares lisas das vias aéreas. O Ca^{2+} entra nas células musculares das vias aéreas por meio de uma via sensível à diidopiridina em canais operados por voltagem (HESS, 1990; TSIEN; ELLIONOR; HORNE, 1991; CUTHBERT et al., 1994)

Cuthbert et al. (1994) demonstraram a existência da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares induzida por IP_3 , sendo este o mecanismo inicial da elevação dos níveis de Ca^{2+} livre para indução da contração. Todavia, em traquéia de cobaias existem ainda três diferentes maneiras de influxo de Ca^{2+} , uma por meio de VOCCs e as outras não mediadas por VOCCs, que seriam o influxo através de ROCCs e por canais de Ca^{2+} capacitativos (BENAFF, 1998; STEPHENS, 2002)

De modo geral, as vias aéreas do asmático respondem, exageradamente, a uma grande variedade de fatores ambientais; a esse fenômeno dá-se o nome de hiperresponsividade brônquica (MAUAD et al., 2000).

Embora a hiperreatividade brônquica (HRB) constitua uma característica essencial da asma, é encontrada também em outras condições, incluindo infecção respiratória viral, displasia broncopulmonar, fumo, atopia, bronquiectasia e fibrose cística (PATTEMORE et al., 1990; STERK, 1993). O aumento da resposta contrátil desta musculatura para diversos estímulos é chamado de hiperreatividade inespecífica, resposta essa evidenciada em cobaias sensibilizadas e desafiadas a ovalbumina (DIÓGENES-BASTOS, 2001). Em cobaias, as exposições repetidas ao antígeno têm causado hiperresponsividade das vias aéreas e infiltração tecidual de leucócitos, com característica histológica e farmacológica da asma em humanos (MASINI et al., 2004).

Cobaias sensibilizadas com ovalbumina, em modelo de asma alérgica, têm mostrado o desenvolvimento de hiperreatividade das vias aéreas após o desafio do antígeno. Essa hiperreatividade coincide com a infiltração de eosinófilos nas vias aéreas (Van OOSTERHOUT et al., 1993; PRETOLANI et al., 1994). O aumento significativo dos níveis da eosinófilo peroxidase e da proteína basal é observado no fluido de lavado bronco-alveolar de animais sensibilizados e desafiados (Van OOSTERHOUT et al., 1993; PRETOLANI et al., 1994; Van OOSTERHOUT et al., 1996).

Além do aumento da contração da musculatura lisa, está bem evidenciado que o edema das paredes das vias aéreas resultante de um extravasamento microvascular e a obstrução do lúmen com o exsudado plasmático e secreção podem contribuir, de maneira significativa, para o desenvolvimento do quadro asmático (BARNES; CHUNG; PAGE, 1988; KRANEVELD et al., 2000).

Clinicamente, a asma pode ser dividida em extrínseca e intrínseca. O termo "asma extrínseca" é utilizado quando se refere à asma que pode estar associada com exposição aos fatores ambientais, como: estímulos químicos e físicos, exercícios e reações antígeno-anticorpo específicas. As manifestações asmáticas desencadeadas diretamente por alérgenos ambientais são agudas e respondem, na maioria das vezes satisfatoriamente, à abordagem terapêutica com broncodilatadores. Por outro lado, a asma intrínseca apresenta etiologia complexa, não relacionada com alérgenos, e é menos responsiva à terapêutica broncodilatadora (POLOSA et al., 1998; CARRIERE et al., 2007).

Na asma, é importante o efeito das respostas mediadas pela imunoglobulina E (IgE) em indivíduos ou animais sensibilizados (CHUNG, 1986; CARAMORI; ADCOCK, 2003). A inalação do antígeno em indivíduos asmáticos resulta em uma resposta broncoconstrictora de fase imediata, bem como uma resposta mais tardia, caracterizada por um prolongado aumento na reatividade das vias aéreas, o qual está associado com a exacerbação dos sintomas da asma (COCKCROFT et al., 1977). Na ausência do antígeno por um período de 4 a 12 semanas, a melhora na asma resulta numa redução na reatividade das vias aéreas (PLATTS-MILLES et al., 1982).

As exacerbações asmáticas agudas apresentam vários graus de severidade e se resolvem espontaneamente ou com terapia. Em circunstâncias pouco comuns, episódios agudos podem ser fatais (McFADDEN; GILBERT, 1992). Os efeitos fisiológicos decorrem das respostas biológicas das células alvo (células endoteliais vasculares, músculo lisos, leucócitos etc) aos mediadores liberados pelos mastócitos ou basófilos ativados.

Assim, através desses inúmeros mediadores, as células causam lesões e alterações na integridade epitelial, anormalidades no controle neural autonômico, no tônus da via aérea, alterações na permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso da via aérea (KUMAR, 2001; HOLGATE, 2000).

As características anatomopatológicas da asma são bem evidenciadas, histologicamente, pelas significativas mudanças no epitélio, como: descamação do epitélio, espessamento da membrana basal, edema da submucosa, infiltrado linfomononuclear e de eosinófilos, hipertrofia do músculo liso e grande quantidade de secreção na luz brônquica (CAMPOS et al., 2003).

Enfim, na asma existem evidências (HOLGATE et al., 2003; BHARADWAJ; AGRAWAL, 2004) de que o processo contrátil muscular encontra-se rodeado e bombardeado por mediadores inflamatórios, que parecem ser responsáveis pelo aumento na velocidade de contração e pela diminuição na plasticidade muscular. Dessa forma, a disfunção do músculo liso das vias aéreas pode ser um dos primeiros mecanismos pelo qual a inflamação induz a hiperresponsividade que, somada ao remodelamento, causa um comprometimento ainda maior na função muscular das vias aéreas, no asmático (FERNANDES et al., 2003).

Todavia, as alterações estruturais levariam ou favoreceriam as mudanças funcionais de características irreversíveis do quadro de asma, pois a inflamação crônica,

associada à liberação de substâncias mediadoras, poderia atuar nas vias aéreas levando alterações de caráter anatômico, pois essa inflamação em pacientes asmáticos envolveria células, como: mastócitos, eosinófilos, macrófagos, além de elementos mesenquimais, como fibroblastos, células endoteliais e musculares. Como consequência surge o remodelamento brônquico das vias aéreas, pois as alterações epiteliais na asma são as descamações intensas de células para dentro do lume da via aérea, ocasionando um prejuízo da ciliogênese, com redução do número de cílios por célula epitelial, porém fora da crise de asma existe uma metaplasia de células caliciforme das vias aéreas e em menor grau a metaplasia escamosa, fenômeno inespecífico relacionado à regeneração epitelial (MAUAD et al., 2000)

Vários fatores podem levar a um estado de ruptura epitelial na asma, pois o dano epitelial pode levar a ação dos produtos derivados da degradação de eosinófilos, entre eles a proteína basal principal, que tem fator citotóxico epitelial, outros fatores incluem radicais livres de oxigênio, efeito de proteases neutras e do edema subepitelial (RENNARD et al., 1995).

Todos esses fatores associados seriam a consequência da persistência do processo inflamatório e/ou da grave intensidade da asma, que contribui para a perpetuação da condição clínica e presença de certo grau de irreversibilidade destas alterações estruturais (MAUAD et al., 2000).

1.3.1 Resposta asmática precoce e tardia

Nas décadas de 70 e 80 do século passado, foi dada uma maior atenção aos mecanismos broncoconstritores da asma e às anormalidades eventualmente apresentadas pela musculatura lisa das vias aéreas de asmáticos. Neste sentido, foi enfatizada a terapia através da utilização de broncodilatadores (OATES; WOOD, 1989; JOHNSON; RENNARD, 2001). Apesar de ser caracterizada, também, por uma resposta inflamatória típica das vias aéreas (BARNES, 1987; BARNES, 1989). Importantes alterações inflamatórias na submucosa das vias aéreas são encontradas, tanto na asma fatal, como na de intensidade leve (DUNNILL, 1960; BEASLEY et al., 1989; MAUAD et al., 2000).

Pepys; Hutchcroft já haviam estabelecido, desde 1975, duas fases na resposta asmática de obliteração das vias aéreas, que se sucede a uma provocação aguda induzida pelo alérgeno. A resposta que se manifesta precocemente, também chamada de reação

asmática aguda, instala-se rapidamente, com um pico de intensidade que se desenvolve entre 15 e 30 minutos, e cessa dentro de 1 a 3 horas. Passadas algumas horas, inicia-se a reação tardia que apresenta intensidade máxima cerca de 5 a 8 horas após o estímulo inicial, a qual pode cessar em 24 horas ou persistir por dias ou semanas.

Todavia, a resposta inicial pode ser caracterizada como a que ocorre, usualmente, dentro de uma hora após a exposição ao antígeno, devido à ligação do complexo alérgeno – IgE, específico aos receptores de alta afinidade nos mastócitos, e subsequente degranulação e liberação de vários mediadores inflamatórios. Já a resposta tardia inicia-se 3-4 h após a exposição ao antígeno, tendo seu pico em torno de 9h, enquanto a obstrução das vias aéreas dá-se entre 12-24h após exposição ao alérgeno (BHARADWQJ; AGRAWAL, 2004).

Apesar dos mastócitos terem importância significativa nas respostas broncoconstrictoras agudas a alérgenos, e possivelmente ao exercício, seu papel na asma crônica, particularmente relacionada às respostas tardias a alérgenos, e com a presença de hiperreatividade brônquica tem sido ressaltada (OATES; WOOD, 1989).

Os mastócitos não são as únicas células ativadas e que liberam mediadores quando da inalação do alérgeno. Os macrófagos (JOSEPH et al., 1980-1981), eosinófilos (CAPRON et al., 1981) e plaquetas (JOSEPH et al., 1983) também possuem receptores para IgE. Certamente, os macrófagos e as plaquetas parecem ser ativados após desafios seguidos com alérgenos (HUTSON, 1989), sendo a eosinofilia uma das características da hiperreatividade nas vias aéreas presente na asma (DIÓGENES-BASTOS, 2001; CHINEN; SHEARER, 2004)

Os mediadores liberados e produzidos durante o processo de degranulação dos mastócitos podem ser divididos em quatro grupos: moléculas pré-formadas e armazenadas nos grânulos (histamina, fatores quimiotáticos para eosinófilos, TNF- α , Endotelina-1); moléculas formadas durante o processo de degranulação (superóxidos, leucotrienos, prostaglandinas, adenosina); proteínas recentemente sintetizadas, transcritas horas após a iniciação da granulação (interleucinas, fatores de crescimento de colônias de macrófagos); material macromolecular derivado dos “grânulos matrix”, que podem ter seus efeitos perpetuados por um período prolongado após a degranulação (triptase, heparina, quinase, catepsina G, carboxipeptidase, peroxidase e fatores inflamatórios) (KALINER, 1999).

Nos últimos 30 anos, a resposta tardia ao desafio induzido pelo alérgeno foi bem caracterizada, particularmente por grupos de trabalhos de Booij-Noord et al. (1972) e

Pepys (1973). Em 1970, Altounyan observou que após a inalação do alérgeno ocorria gradual aumento da resposta bronquial para histamina. Posteriormente, Cockcroft et al., (1977) demonstraram que aquele aumento da resposta bronquial apresentado para a histamina e para a metacolina, que ocorria após a inalação do alérgeno, poderia estar correlacionado com a resposta asmática tardia. Esta hipótese foi, mais tarde, reforçada por Cartier et al. (1982).

A reação de fase tardia caracteriza-se por uma maciça infiltração celular resultante da ação de mediadores quimiotáticos, como o LTB_4 para os eosinófilos, o fator de ativação plaquetária (PAF), a interleucina 5 (IL-5) e uma potente citocina (fator quimiotático para linfócito). A reação de fase tardia leva ao desenvolvimento de edema e ao aumento significativo da produção de muco (HARGREAVE et al., 1986), diminuição da velocidade de transporte do muco e aumento significativo de eosinófilos (CARAMORI; ADCOCK, 2003).

Solley et al. já haviam demonstrado, em 1976, que a resposta tardia avaliada na pele de humanos estava associada ao influxo de células inflamatórias, inicialmente neutrófilos, seguidos por eosinófilos e células mononucleares. Diversos trabalhos detectaram a presença de células inflamatórias no fluido do lavado bronco-alveolar após um desafio antigênico. DeMonchy et al. (1985) demonstraram a presença destas células no lavado bronco-alveolar em humanos, durante a resposta asmática tardia (6 a 7 horas após a inalação do alérgeno). Estes pesquisadores verificaram 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., 1986-1987, DIÓGENES-BASTOS, 2001).

Na resposta tardia ocorre edema da mucosa, aumento da secreção e outros efeitos inflamatórios, que podem ser resultantes da liberação de produtos de células inflamatórias, acumuladas nas vias aéreas. Eosinófilos e neutrófilos parecem ser as células predominantes na resposta tardia em humanos, e ambas as células têm 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. Elas são responsáveis pela

broncoconstrição e pelo desenvolvimento de uma hiperreatividade inespecífica, cuja associação com a resposta asmática tardia ainda não é bem conhecida (HUTSON, 1989).

Todavia, Caramori; Adcock (2003) destacaram que na inflamação aguda ou crônica pode ser observada uma exacerbação no aumento de eosinófilos/neutrófilos, sendo este aumento mais significativo nos animais que foram desafiados ao antígeno em relação aos somente sensibilizados (DIÓGENES-BASTOS, 2001).

1.4 Terapêutica Farmacológica da Asma

Segundo alguns estudos, a asma progride e piora com o tempo (KERSTJENS et al, 1992; HAAHTELA et al., 1991), e é considerada como um dos maiores problemas sociais, porém vem sendo pesquisada terapia para essa condição patológica (MASINI et al., 2004), pois a história do tratamento da asma começa com o relato do uso de broncodilatador. Em 1924, foi usada a efedrina como droga dilatadora na medicina ocidental, apesar de conhecida pelos chineses por mais de 5.000 anos. Todavia, no início do século XX, a teofilina foi utilizada como broncodilatador para pacientes asmáticos. Ela é uma metilxantina com estrutura semelhante à cafeína e à teobromina. Historicamente, seu emprego no tratamento da asma nasceu de uma sugestão de William Withering que, em 1786, recomendou café forte como um remédio para os sintomas asmáticos. Pouco tempo depois, em 1860, o Dr. Henry Hyde Salter, que era asmático, também afirmou ser o café forte o melhor tratamento disponível para a asma (PERSSON, 1985; CAMPOS et al. 2003).

Em 1900, o laboratório Boehringer passou a sintetizar a teofilina e, a partir da década de 30 do século passado, começou a ser amplamente utilizada no tratamento da asma. Com a sua contribuição Ahlquist, em 1948, classificou os receptores adrenérgicos em alfa e em beta, e observou que os últimos mediavam a broncodilatação; a partir de então, os estudos foram conduzidos para a descoberta de drogas que estimulassem receptores beta específicos. Em 1967, Lands et al. demonstraram que havia duas classes de receptores betas: β_1 e β_2 . O primeiro seria responsável pelos efeitos cronotrópicos e inotrópicos sobre o coração, e o segundo, pela broncodilatação. Assim, os rumos das pesquisas passaram a objetivar a busca de drogas seletivas dos receptores β_2 (CAMPOS et al., 2003).

Na década de 70, o reconhecimento da asma como doença inflamatória provocou mudança no tratamento para a terapia anti-inflamatória. Por essa razão, os corticosteróides passaram a constituir a principal terapêutica da asma, ficando os broncodilatadores indicados para o controle sintomático agudo. Com essa associação, seria possível ter um controle tanto dos sintomas, como seria possível imaginar a remissão da doença. Todavia, a prática demonstrou o contrário, o que provocou o interesse em estudar mais profundamente os fatores envolvidos no insucesso. Com a introdução do conceito de remodelamento brônquico, o termo remissão passou a ser caracterizado como a ausência de sintomas de asma durante a corticoterapia e não após a sua suspensão (CAMPOS et al., 2003).

A partir desses estudos foi possível apresentar uma variedade de opções na terapêutica da asma, cujas drogas utilizadas podem favorecer um alívio imediato, ou evitar o desenvolvimento das crises asmáticas. A indústria farmacêutica continuou buscando novas opções medicamentosas, que permitissem ampliar o espectro terapêutico e superar as barreiras na adesão ao tratamento.

A asma, como já descrito, se divide em duas fases: aguda ou precoce e crônica ou tardia. Na crise aguda, são utilizados medicamentos com a finalidade de produzirem um relaxamento rápido dos brônquios; são os broncodilatadores. Porém, a asma crônica é considerada uma doença inflamatória, e como tal é tratada com anti-inflamatórios. Existem pelo menos três grupos de medicamentos classificados como anti-inflamatórios utilizados na asma: 1) corticóides – grupo de melhor resultado, utilizado principalmente por via inalatória, apresenta biodisponibilidade baixa, ou seja, sem efeitos sistêmicos importantes ao contrário do que acontece quando administrados por via oral ou injetável; 2) cromonas – nedocromil e cromoglicato, empregados principalmente na asma leve; 3) antagonistas dos leucotrienos, que podem ser ministrados em associação com os corticóides inalados, quando estes sozinhos não controlam a doença (SOCIEDADE DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2002; BHARADWAJ; AGRAWAL, 2004).

Contudo, os tratamentos atuais têm causado efeitos colaterais e/ou não são muito efetivos em muitos pacientes com asma. Assim, tem sido imperativo a necessidade da busca constante de uma terapia que elimine ou reduza os inconvenientes da atual farmacoterapia.

Dessa forma, a pesquisa de fármacos oriundos de plantas medicinais que combinem as atividades anti-inflamatórias, anti-oxidante e relaxante muscular, e que

apresentem menos efeitos indesejáveis em relação à farmacoterapia atual é atrativa para o tratamento de doenças inflamatórias das vias aéreas.

1.4.1 Glicocorticóides

A eficácia do tratamento anti-inflamatório na história natural da asma ainda é objeto de debate na literatura especializada, pois o controle do quadro asmático pode ser obtido pelo uso de agentes anti-inflamatórios, sendo um dos mais potentes os glicocorticóides. O tratamento com os glicocorticóides reduz a responsividade das vias aéreas à histamina, agonistas colinérgicos, alérgenos, exercícios, bradicinina, frio, adenosina, e à substâncias irritantes (BARNES, 1990; VAN DEN BERGE et al., 2001).

A terapêutica com glicocorticóides não somente apresenta importante diminuição para as substâncias espasmogênicas, como também limita ao máximo o estreitamento das vias aéreas (BEL et al., 1991). Quando a terapia é interrompida, a responsividade das vias aéreas geralmente retorna aos níveis de antes do tratamento (VATHENEN et al., 1991; HAAHTELA et al., 1994; JUPITER et al., 1991).

Os glicocorticóides apresentam marcada redução no número de mastócitos, macrófagos, linfócitos T e eosinófilos no lavado bronco-alveolar e na parede bronquial (BARNES, 1995; VAN RENSEN et al., 1999), pois a atividade anti-inflamatória dos glicocorticóides em pacientes asmáticos pode ter envolvimento na redução de eicosanóides (leucotrienos B₄ e tromboxano B₂) e na síntese de citocinas (IL-1 β), bem como na supressão dos efeitos das células inflamatórias, inibindo a exudação do plasma e da secreção mucosa nas vias aéreas inflamadas (CARAMORI; ADCOCK, 2003)

Os glicocorticóides também bloqueiam várias citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, incluindo interleucinas IL-1, IL-4, IL-5, IL-8 e TNF- α em pulmões de asmáticos (CHUNG; BARNES, 1999). Todavia, eles podem aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) (JOHN et al., 1998).

Apesar de toda a sua eficácia no processo inflamatório, os glicocorticóides apresentam um leque de efeitos indesejáveis quando usados em grandes doses ou administrados por períodos prolongados. Na literatura pode-se destacar: a cicatrização de feridas, a ulceração péptica, surgimento de osteoporose, com conseqüente risco de fraturas, tendência a hiperglicemia, evidenciado com o uso de glicocorticóides exógenos, e ainda o desenvolvimento de atrofia muscular e fraqueza. Tem-se como efeitos colaterais dos corticóides intolerância à glicose, ganho de peso, aumento da

pressão sanguínea, catarata, imunossupressão e redução na taxa de crescimento em crianças (LIN; CASALE, 2002).

A inclusão do corticosteróide inalatório como mais uma terapia na asma trouxe a perspectiva de que a utilização precoce do fármaco seria capaz de alterar sua evolução natural e permitir sua remissão após seu uso prolongado. Todavia, o desenvolvimento de corticosteróides inalatórios comprovadamente eficazes através dos ensaios terapêuticos não se apresentava efetivos no controle da asma. A discrepância nesses resultados obtidos em laboratório e na prática clínica resultava de problemas na adesão ao tratamento. Posteriormente, foi preconizado o tratamento associado (corticosteróide + β_2 -agonista de ação prolongada inalatórios) para quase todas as formas clínicas de asma (CAMPOS et al., 2003).

Os corticosteróides que não apresentam ação direta em mastócitos no pulmão (SCHLEIMER et al., 1983) inibem, efetivamente, a resposta tardia e previnem ou reduzem a hiperreatividade brônquica (COCKCOFT; MURDOCK, 1987). Esses esteróides são usados em ataques de asma, quer seja por via oral ou intra-venosa, pois têm eficácia similares (MATSAS; THOMSON, 2004).

1.4.2 Agonistas β_2 -adrenérgicos

A ação dos agonistas β_2 , *in vitro* e *in vivo* inibem a liberação de mediadores pelas células dos mastócitos, exudação plasmática e pode reduzir a ativação dos nervos sensoriais (SZCZKLIK et al., 1998; JOHNSON; RENNARD, 2001), sendo o tratamento de primeira linha na asma suave a moderada (MATSAS; THOMSON, 2004).

Agonistas β_2 -adrenérgicos, amplamente utilizados como broncodilatadores no tratamento da asma, relaxam o músculo liso das vias aéreas através de mecanismo dependente de AMPc. Está bem documentado que o GMPc, à semelhança do AMPc, é um segundo mensageiro importante na regulação do tônus das vias aéreas (BEAVO, 1995).

A terapêutica exclusiva dos agonistas β_2 não é capaz de controlar as crises de asma (LAZARUS et al., 2001; LEMANSKE et al., 2001), porém quando associada ao uso de glicocorticóides, estes agentes são efetivos, favorecendo uma diminuição de neutrófilos e da expressão da molécula de adesão ICAM na mucosa brônquica

(JEFFERY et al., 2002). A associação de agonistas β_2 com Brometo de ipatrópico tem efetividade na terapiam nas duas primeiras horas do ataque da asma, e são recomendados quando os sintomas são refratários ao tratamento do agonista β_2 (MATSAS; THOMSON, 2004).

O uso de agonistas β_2 inalado pode ser efetivo na prevenção da indução da asma durante o exercício, visto que essa proteção é mantida devido ao uso prolongado desse agonista (NELSON et al., 1998). Porém, Pearlman et al. (1992) destacaram que as propriedades broncodilatadoras destes agonistas favorecem o tratamento em asma persistente. Convém ressaltar que essa terapia por tempo prolongado leva à dessensibilização dos receptores adrenérgico, provocando uma regulação decrescente dos receptores β_2 (DAVIES et al., 1998, VAN DER WOUDE et al., 2001).

Os agonistas adrenérgicos β_2 não são muito efetivos no tratamento da reação alérgica tardia e o seu uso crônico tem causado taquicardia, tremores, câimbras, distúrbios metabólicos (LIN; CASALE, 2002), palpitações, cefaléia e ruborização da pele, tendo relato na literatura de isquemia cardíaca e arritmias, particularmente em pacientes com arteriopatia coronária.

Os agonistas β -adrenérgicos não apresentam efeito marcante na resposta tardia associada à hiperreatividade brônquica (COCKCROFT; MURDOCK, 1987), pois as propriedades broncodilatadoras destes agonistas são efetivas nos pacientes com asma, sendo o seu uso de forma não crônico (CARAMORI; ADCOCK, 2003).

Conforme os trabalhos de Lipworth; Aziz (1999) e Lipworth; Jackson (1999), estudos futuros são necessários para avaliar a relevância clínica deste fenômeno farmacológico do agonistas β_2 utilizado no tratamento das crises exacerbadas de asma.

1.4.3 Metilxantinas

A teofilina, que é uma metilxantina, tem sido usada no tratamento de pacientes asmáticos há décadas, porém, no final do século passado foi mostrado que pequena dose de teofilina revelou significativo efeito anti-inflamatório nas vias aéreas desses pacientes (SULLIVAN et al., 1994; FINNERTY et al., 1996). Porém, em altas doses, essa droga induz inibição de degranulação de eosinófilo e liberação de proteína basal de eosinófilo (YUKAWA et al., 1989; KITA et al., 1991), prevenindo, assim, a liberação e expressão de TNF- α e IL-1 β em monócito sanguíneo e reduzindo a produção de IL-2 e de células

T, além da supressão não específica da ativação de linfócitos em sangue periférico de humanos (SPATAFORA et al., 1994).

No quadro de asma noturna, a teofilina apresenta uma significativa diminuição de neutrófilos no lavado bronco-alveolar e da liberação de leucotrienos B₄ (CARAMORI; ADCOCK, 2003).

Estudos anteriores têm mostrado que baixas doses de teofilina reduzem o aumento de eosinófilos nas vias aéreas, após desafio ao alérgeno (BANNER; PAGE, 1995), e que a sua retirada em pacientes com asma severa favorece o aumento de linfócitos T nas vias aéreas (KIDNEY et al., 1995).

Apesar de amplamente utilizada por décadas no tratamento de asmáticos, Vassallo; Lipsky (1998) já haviam destacado que o real mecanismo de ação da teofilina é ainda incerto, e as hipóteses incluem inibição inespecífica de fosfodiesterases (PDE), antagonismo ao receptor de adenosina, estímulo à secreção de catecolaminas, inibição de mediadores envolvidos na inflamação brônquica e alteração no fluxo intracelular do cálcio (CAMPOS et al., 2003).

Banner; Page, em 1995, demonstraram que o mecanismo da teofilina em altas concentrações em pacientes asmático está relacionado à inibição da fosfodiesterase, bem como ao aumento dos níveis intracelular de monofosfato cíclico de 3'5'-adenosina (AMP cíclico) e monofosfato cíclico de 3'5'-guanosina (GMP cíclico), resultando em um relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas e inibindo a ativação das células inflamatórias. Todavia, é um inibidor fraco e não-seletivo das fosfodiesterases (PDEs), pois essas enzimas são responsáveis pela degradação dos nucleotídeos cíclicos na célula, o que leva ao aumento das concentrações intracelulares do AMPc e do GMPc.

Posteriormente, o desenvolvimento de broncodilatadores mais potentes e com menor potencial de toxicidade (β_2 -agonistas) fez com que a teofilina passasse a ser utilizada como medicação de terceira linha e indicada apenas para os asmáticos mal controlados ou para as situações nas quais o custo da medicação fosse primordial (CAMPOS et al., 2003). Entretanto, a aminofilina não apresenta benefícios no tratamento da asma suave a moderada, e não é recomendada para crianças (MATSAS; THOMSON, 2004).

1.4.4 Antagonistas de Leucotrienos

Os leucotrienos medeiam ações diversas na patogênese da asma, que incluem contração da musculatura lisa, aumento da permeabilidade vascular, secreção de muco, diminuição do *clearens* mucociliar, recrutamento de eosinófilo das vias aéreas, favorecendo a manutenção da resposta inflamatória crônica das vias aéreas, da inflamação neurogênica e do remodelamento das vias aéreas (HOLGATE;BRADDING; SAMPSON, 1996; PANETTIERI et al., 1998).

Os antagonistas de leucotrienos inibem a sua síntese, sendo efetivos clinicamente em pacientes asmáticos, e levando a uma inalação de menores doses de glicocorticóides (DEMPSEY; KENNEDY; LIPWORTH, 2002), embora essa associação não seja considerada tão adequada no controle do quadro de asma (DUCHARME; HICKS, 2002; ROBINSON; CAMPBELL; BARNES, 2001).

Todavia, em pacientes com quadro de asma moderada a severa persistente, o uso de inalação de agonista β_2 de longa ação tem se mostrado mais efetivo no controle do quadro asmático, que os anti-leucotrienos associados à inalação de glicocorticóides (WILSON et al., 2001; FISH et al., 2001; NELSON et al., 2000).

1.4.5 Cromolin sódico ou neodocromil

O cromolin sódico vem sendo usado há mais de 20 anos como agente antialérgico, pois tem o efeito de proteger a indução de broncoconstrição provocada por vários estímulos. Ele tem se mostrado um inibidor da liberação de mediadores mediados pelo IgE em mastócitos de humano (LEUNG et al., 1988), e na supressão da ativação de outras células inflamatórias (NORRIS, 1996).

O seu uso de maneira prolongada em asmáticos diminui a porcentagem de eosinófilos presentes no sangue e no lavado bronco-alveolar, sugerindo um efeito anti-inflamatório nas vias aéreas de humanos (AMAYASU et al., 2001); sendo bem tolerado no tratamento de crianças asmáticas. Porém, em estudos controle não tem sido mostrado eficácia no tratamento da asma persistente (ANON, 2000; TASCHE et al., 2000). Em outros estudos, ele tem provocado uma redução na asma induzida pelo exercício, quando inalada antes da atividade (KELLY et al., 2000). No entanto, este efeito é menor que o provocado pelos agonistas β_2 .

Assim, as drogas que estabilizam as membranas de mastócitos, impedindo sua degranulação, têm pouca utilidade no controle dos sintomas crônicos da asma (OATES WOOD, 1989).

1.4.6 Inibidores da Fosfodiesterase

A fosfodiesterase-4 (PDE-4) é expressada por macrófagos, neutrófilos e células de músculos liso das vias aéreas (TORPHY, 1998); a sua inibição aumenta os níveis intracelulares de AMPc, resultando em uma ação broncodilatadora e de supressão da inflamação (CARAMORI; ADCOCK, 2003).

Os estudos dos inibidores da fosfodiesterase-4 (iPDE-4), enzima que degrada nucleotídeos cíclicos inibidores da ativação celular, visam definir o valor dos iPDE-4 no tratamento da asma. Dessa forma, foram demonstradas as propriedades imunomodulatórias do AMPc e o potencial anti-inflamatório dos iPDE. Inibindo-se as PDEs, o nível intracelular de AMPc aumenta, levando ao relaxamento do músculo liso e à potencialização do efeito broncodilatador dos β -agonistas (CAMPOS et al., 2003). Porém, inibidores da PDE tipo 5, tais como o sildenafil e o zaprinast, podem elevar o nível de GMPc, o que leva ao relaxamento do músculo liso traqueal de cobaias (BERNAREGGI et al., 1999).

Como a PDE-4 é a PDE predominante nas células inflamatórias, inferiu-se que sua inibição teria efeito anti-inflamatório útil no tratamento da asma. Em modelos animais de asma, alguns iPDE-4 mostraram-se capazes de inibir a broncoconstrição e a infiltração eosinofílica induzidas por antígenos, a geração local de citocinas, de induzir a apoptose de eosinófilos e de reduzir a infiltração eosinofílica após a exposição alérgica, reduzindo a hiperreatividade brônquica (TURNER et al., 1996; UNDERWOOD et al., 1994).

Os inibidores da fosfodiesterase vêm sendo desenvolvidos como uma nova classe de droga, porém essa nova classe tem causado efeitos adversos, particularmente com náuseas, vômitos e outros efeitos gastrointestinais (CARAMORI; ADCOCK, 2003; KOHYAMA et al., 2002). Agregam duas vantagens: são usados pela via oral e não possuem o potencial de efeitos indesejáveis dos corticosteróides (MASINI et al., 2004).

1.4.7 Fitoterápicos

Além de toda a gama de drogas farmacológicas no tratamento do quadro da asma, tanto de forma profilática como terapêutica, os estudos têm evoluído para a utilização de produtos naturais, sendo desenvolvidas drogas com comprovado efeito de alívio da asma.

Os estudos dos produtos naturais têm cada vez mais recebidos destaques, uma vez que fornecem uma grande variedade de agentes potencialmente úteis na clínica, proporcionando um grande recurso na elaboração de novas drogas, pois esta variedade de moléculas químicas produzirá um grande espectro de atividade farmacológica.

O eucalipto tem sido usado, nos países Europeus, no tratamento de pacientes asmáticos de forma bem ampla, sendo a espécie *Eucalyptus globulus*, a sua forma medicinal.

O tratamento não farmacológico para asma foi, formalmente, considerado nas diretrizes para tratamento de asma publicada, em 2003, pela *British Thoracic Society* (BTS) e *Scottish Intercollegiate Guidelines Network* (SIGN) (MATSAS; THOMSON, 2004).

Alguns monoterpenos, também, têm sido considerados alternativas potenciais, sendo utilizados em muitos produtos de uso humano: condimentos artificiais, perfumes (TEMPLETON, 1998) e em inúmeras formulações de expectorantes, descongestionantes, analgésicos externos e anti-sépticos (KLOCKE; DARLINGTON; BALANDRIN, 1987; WINDHOLZ et al., 1998), além do uso no tratamento de sinusite e bronquite crônica (JUERGENS; STOBER; VETTER, 1998; JUERGENS et al., 2003).

1.5 Produtos Naturais

Na história da humanidade pode ser evidenciada a presença da utilização de plantas nas mais variadas maneiras, suprimindo as necessidades fisiológicas (alimentação, vestimenta e habitação), nas necessidades sociais (defesa pessoal, ataque com forma de proteção ou defesa, transportes, artes e religiões) e como forma de promover a saúde.

As repercussões causadas por algumas plantas, quando ingeridas, podem contribuir para elevar as plantas à categoria de entidades divinas, uma vez que as plantas com propriedades alucinógenas foram rapidamente incluídas em rituais

religiosos, e a elas foram atribuídas propriedades mágicas de colocar os homens em contato direto com os deuses (FONTENELE, 2004).

As plantas com propriedades terapêuticas e toxicológicas passaram a ser o foco de grandes estudos, pois em túmulos pré-históricos, têm sido encontradas substâncias que foram consideradas como plantas, tidas como medicinais. No território do atual Iraque, em 1975, foi descoberto um esqueleto humano de quase 60.000 anos de idade, e junto dele foi encontrado petrificado pequena quantidade de pólen concentrado de achilea e jacinto, plantas estas utilizadas pelos camponeses daquela região (OTTE, 1994).

Na investigação de plantas medicinais tem sido usada como estratégia, amplamente apresentada na literatura, a combinação de informações adquiridas junto às comunidades locais, que fazem uso da flora medicinal, com estudos químicos e farmacológicos realizados em laboratórios especializados, como o desenvolvido por Farnsworth et al. (1985), os quais fizeram uma revisão em 117 drogas botânicas, e destacaram que 73,5% (86 substâncias) delas possuíam o mesmo uso relacionado com aqueles das plantas de origem.

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos revelarem uma gama, quase que inacreditável, de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (GUERRA; NODARI, 2000).

A biodiversidade brasileira está associada aos diversos solos e climas, os quais favorecem um ecossistema diversificado, porém associado a isso temos os conhecimentos etnofarmacológicos provenientes da miscigenação da população, os quais constituem um fator importante no processo de desenvolvimento de projetos com plantas medicinais, que proporcionam ao Brasil uma participação importante no aproveitamento desse recurso de maneira sustentável (CORDELL, 2000; SILVA et al., 2001).

Todavia, a biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos.

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350.000 e

550.000. Mais da metade dessas espécies encontra-se nas florestas tropicais, cuja área corresponde a apenas 7% da superfície da terra (SOEJARTO, 1996).

Todavia, Guerra; Nodari (2000) ressaltaram que somente uma parcela de 8% das espécies vegetais da flora brasileira já havia sido estudada em busca de compostos bioativos, e 1100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais. Destas, somente 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde, para utilização no comércio.

Entretanto, a exploração de plantas de uso medicinal da flora nativa através da extração direta nos ecossistemas tropicais tem proporcionado reduções drásticas das populações naturais dessas espécies, seja pelo processo predatório de exploração, seja pelo desconhecimento dos mecanismos de perpetuação das mesmas. Todavia, existe outro aspecto, menos discutido, com relação à devastação das florestas tropicais, que é a perda do conhecimento, acumulado por milênios, sobre o uso medicinal tradicional das plantas destas florestas pelas populações a elas associadas. Este fator provoca a migração destas comunidades, normalmente para centros urbanos, provocando o rompimento do fluxo de conhecimento adquirido e acumulado ao longo do tempo (FONTENELE, 2004).

Porém, existem atualmente normas, como a Medida Provisória N° 2.186-16 de 2001; Ministério do Meio Ambiente – IBAMA, destinadas ao controle e acesso à biodiversidade e às informações (BRASIL, 2001). Recentemente, foi publicado o Decreto N° 5.459 de 07.01.2005; Presidência da República – Casa Civil, que disciplina as sanções aplicáveis ao não atendimento das normas legais; o seu não cumprimento pode ser enquadrado como caso de “biopirataria” (BRASIL, 2005).

No Ceará, tem-se um grande avanço nas pesquisas com plantas medicinais, que se iniciaram por volta da década de 50 do século XX, quando o estudioso Francisco José de Abreu Matos se dedicou ao estudo multidisciplinar da flora medicinal. Esses estudos já produziram inúmeros projetos de pesquisas, iniciação científica, mestrado e doutorado, bem como trabalhos publicados em revistas nacionais e internacionais, tendo ainda, pesquisas premiadas e solicitações de patentes.

Todavia, Leal (2006) destaca que algumas espécies vegetais foram ou continuam sendo objetos de estudos, tais como a *Amburana cearensis* A. C. Smith, *Myracrodruon urudeuva* Allemão, *Cissus sicyoides* L., *Justicia pecoralis* var *stenophylla* Leon e *Curcuma longa* L, sendo ainda incluída a essa gama de espécies o *Eucalyptus globulus*.

Várias espécies de plantas produtoras de óleos essenciais são abundantes no Nordeste do Brasil e largamente usadas na medicina popular, sendo de grande importância estudos fitoterápicos que visem ratificar sua validade como agentes terapêuticos.

Nos últimos anos, tem crescido o número de plantas conhecidas para a produção de óleos essenciais em bases econômicas. Tal ocorrência vai desde plantas rasteiras, como é o caso da hortelã, até plantas de porte arbóreo, como o eucalipto (VITTI; BRITO, 2003).

1.5.1 Óleos Essenciais

O conhecimento sobre óleos essenciais de plantas data de alguns séculos antes da era cristã. As referências históricas de obtenção e utilização desses óleos estão originalmente nos países orientais, com destaque para o Egito, Pérsia, Japão, China e Índia. A evolução técnica no aprofundamento dos conhecimentos sobre os óleos essenciais ocorreu em meados do século XVIII, período em que ocorreram os estudos de caracterização química (VITTI; BRITO, 2003).

Os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos ou simplesmente essências, são definidos pela *International Standard Organization* (ISO) como produtos obtidos de diversas partes das plantas através de processos específicos, sendo o mais frequente a destilação por arraste com vapor d'água, destacando-se que a composição química dos óleos essenciais pode variar de acordo com a parte do vegetal de onde é extraído (caule, folhas, flores, frutos, sementes e raiz), ao longo do dia e no decorrer do ano, e ainda recebe influência do solo e do clima (CRAVEIRO et al., 1981; VITTI; BRITO, 2003).

Esses constituintes são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, que recebem a nomenclatura abrangente de óleos voláteis, pois a maioria possui aroma agradável e intenso (SIMÕES, 2000; VITTI; BRITO, 2003). As denominações dadas a estes óleos são devido às suas características físico-químicas. São considerados óleos por serem, geralmente, líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente; e, por apresentarem volatilidade, recebem o nome de óleos voláteis; são chamados de essências, devido ao aroma agradável e intenso da maioria de seus representantes. A denominação óleos etéreos é referente ao fato dos

mesmos serem solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter (SIMÕES; SPTIZER, 1999).

Estão localizados em pequenas bolsas entre as células e desempenham importante papel na bioquímica vegetal. Funcionam como reguladores e mensageiros, agem como catalisadores das reações bioquímicas, protegem a planta de parasitas ou doenças, e ajudam na fertilização atraindo insetos. Os óleos transmitem informações de uma célula à outra, controlando a multiplicação e renovação celular e são agentes de adaptação da planta ao meio ambiente. Podem ser encontrados no exterior das folhas, na película dos frutos cítricos e casca de algumas árvores (LAVABRE, 1993). A sua presença nas plantas está associada à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, sendo usado, tradicionalmente, na prática médica popular.

Matos (2000) destaca que as substâncias constituintes dos óleos essenciais são produzidas no laboratório celular da planta, cujas reações são facilitadas, energeticamente, pela radiação solar, absorvida no processo de fotossíntese.

Segundo Vitti; Brito (2003), algumas características podem ser identificadas nos óleos essenciais: a) sabor: picante e com gosto acre (ácido); b) cor: ao serem extraídos são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados. Raros óleos apresentam cor (i.e. camomila, apresenta cor azulada); c) estabilidade: são instáveis na maioria deles, principalmente na presença da luz, calor, umidade, metais e ar; d) os óleos essenciais possuem índice de refração e são opticamente ativos, propriedades estas usadas na sua identificação e controle da qualidade.

Grande diversidade de constituintes químicos é identificada nos óleos essenciais, que são: hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos etc. (MATOS; FERNANDES, 1975-1978; SIMÕES, 2000).

Todavia alguns destes apresentam-se em maior concentração, e é classificado como componente principal, e os que apresentam baixa concentração são conhecidos como composto traço. Porém, um constituinte pode ser principal em um óleo e traço em outro, como é no caso do 1,8-cineol ou eucaliptol, que é o constituinte principal no óleo de *Eucalyptus globulus* com concentração média de 80%, e traço no óleo de bergamota com concentração em torno de 0,002%, sendo o componente principal o constituinte desejado e o fator pelo qual ocorre a exploração econômica das plantas produtoras de óleo (VITTI; BRITO, 2003).

Os óleos essenciais são moléculas biologicamente ativas, que produzem através de alteração na estrutura molecular de seus constituintes químicos, compostos de importância terapêutica e científica (TISSERAND; BALACS, 1995). Alterações essas, que têm levado aos estudos da relação entre estrutura química e ação farmacológica, levando as moléculas ativas dos óleos essenciais a servirem como protótipo para obtenção de novos fármacos com maior eficácia e seletividade. Estudos com derivados sintéticos de constituintes de óleos com atividade comprovada mostram que modificações de grupamentos moleculares podem aumentar ou inverter os efeitos farmacológicos dos mesmos (DALMEIER; CARLINI, 1981).

Os efeitos farmacológicos dos óleos essenciais foram cientificamente comprovados, como antiparasitários, analgésicos, diuréticos (LUZ et al., 1984), hipotensores (LAHLOU et al., 2002), anti-inflamatórios (MAROM et al., 1982; LUNDGREN; SHELHAMMER, 1990; SANTOS; RAO; SILVEIRA, 1997; JUERGENS et al., 1998-2003; SANTOS; RAO, 2000), anticonvulsivantes (SANTOS; RAO; SILVEIRA, 1997; SANTOS, 1999), gastroprotetor (PAIVA et al., 1998; SANTOS, 1999), broncodilatador (COELHO-DE-SOUZA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2009) dentre outros.

Porém, pelo fato de possuir propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras são usados no tratamento de doenças alérgicas. Além destas propriedades são, também, antiespasmódicos, e por isso são usados em doenças com envolvimento dos músculos lisos, como a asma (BEZERRA, 2004).

Estudos realizados em laboratórios têm mostrado que os óleos essenciais obtidos de várias plantas, no Nordeste brasileiro, têm propriedades miorrelaxantes em musculatura lisa de traquéia (MAGALHÃES et al., 2003; COELHO-DE-SOUZA et al., 2005; EVANGELISTA et al., 2006).

Dentre as famílias de plantas que concentram os elementos voláteis (que compõem os óleos essenciais) nas folhas, destaca-se a família *Myrtaceae*. Quatro gêneros são os mais importantes na família *Myrtaceae*: *Eucalyptus*, *Maleleluca*, *Eugenia* e *Psidium*. O óleo essencial de muitas espécies de *Eucalyptus* encontra inúmeras aplicações na indústria farmacêutica, cosmética e de matérias de limpeza (SIANI, 2000).

Os óleos medicinais são aqueles que apresentam como componente principal o cineol, em quantidade mínima de 70%, e são destinados à fabricação de produtos farmacêuticos (inalantes, estimulantes da secreção nasal, produtos de higiene bucal ou,

simplesmente, como função de dar sabor e aroma aos medicamentos). As principais espécies de eucalipto cultivadas para a produção de óleo essencial são: o *Eucalyptus citriodora*, o *Eucalyptus globulus* e o *Eucalyptus staigeriana*, sendo a principal produtora deste tipo de óleo no Brasil, o *Eucalyptus globulus* (VITTI; BRITO, 2003). Mundialmente, os óleos de eucaliptol para fins medicinais representam o maior volume produzido e comercializado. O *E. globulus* apresenta importância econômica, sendo cultivado em menor intensidade, pois tem seu valor comercial estritamente ligado à produção de óleo essencial (MAFFEIS; SILVEIRA; BRITO, 2000).

1.5.2 Óleo Essencial de Eucalipto – *Eucalyptol globulus*

O *Eucalyptus globulus* foi a primeira espécie de eucalipto introduzida no Brasil, em 1855. Porém, somente em 1903, grandes plantações de eucalipto foram iniciadas pela antiga Companhia Paulista de Estradas de Ferro, tendo o início da extração de óleo ocorrido durante a Segunda Guerra Mundial, em decorrência da dificuldade de importação desse óleo, o qual apresenta um rendimento em óleo essencial no Brasil variando de 1,6 a 2 % com teor de 1,8-cineol de 70 a 80% (VITTI; BRITO, 2003).

Dentre as espécies de eucaliptol descritas, apenas cerca de aproximadamente 20 espécies de eucalipto são usadas na exploração comercial, dos quais os óleos essenciais são divididos em três grupos principais, que são: óleos medicinais, óleos industriais e óleos para perfumaria (DORAN, 1991).

Os óleos essenciais do eucalipto são provenientes das folhas, sendo produzidos em pequenas cavidades globulares, chamadas glândulas. A origem biossintética dos óleos essenciais de eucalipto relaciona-se com o seu metabolismo secundário, não considerado como fundamental para a manutenção da vida do organismo, porém confere às plantas a capacidade de adaptação às condições do meio em que vive. Com relação ao eucalipto, as referências são as de que a ocorrência do óleo essencial estaria relacionada com a defesa da planta contra insetos (DORAN, 1991).

Vitti; Brito (2003) evidenciaram que os óleos medicinais do *Eucalyptus globulus* têm como principal componente o 1,8-cineol ou *eucalyptol*, com teor de 60-85%, pois o componente principal é o constituinte desejado e o fator pelo qual ocorre a exploração econômica das plantas produtoras de óleo. Todavia, com relação a esse teor, o trabalho de Balacs (1997) destaca que esta espécie contém entre 62,4% e 82,2% de cineol.

1.5.3 1,8-cineol

O 1,8-cineol (*eucaliptol*) é um óxido monoterpênico cíclico, com peso molecular de 154,3g, incolor, com odor semelhante à cânfora, sendo constituinte de uma variedade de óleos essenciais, tais como, óleos das espécies de *Eucaliptus*, *Croton*, *Hyptis* (*Hyptis martuisi*), *Pectis* (*Pectis apodacephala*), *Melaleuca* (*Melaleuca alternifolia*) (CRAVEIRO et al., 1981; TISSERAND; BALACS, 1995; MIYAZAWA; NAKAMURA; ISHIKAWA., 2000; TZAKOU et al., 2001; LOUGHRIN; KASPERBAUER, 2003). Tendo como estrutura química:

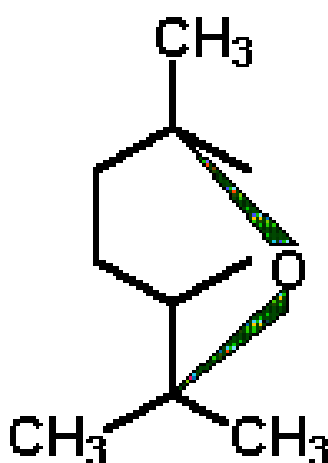


Figura 1- Estrutura química do 1,8-cineol
Fonte: VICENZI et al., 2002, p. 270.

Tradicionalmente, é recomendado para tratar sintomas de doenças das vias áreas, exacerbados por infecção (PATTMAICK et al., 1997). Os monoterpênos são descritos como tratamento das desordens obstrutivas crônicas das vias áreas, principalmente por sua familiar propriedade secretolítica (JUERGENS et al., 1998; JUERGENS; STOBBER; VETTER, 1998), podendo ser usado na terapia anti-inflamatória na asma (JUERGENS et al., 1998), sendo empregado na aplicação de preparações farmacêuticas (MADYASTHA; CHADHA, 1986), como em cosméticos e no tratamento da tosse, dor muscular, neuroses, reumatismo, asma e cálculo renal (MIYAZAWA; SHINDO; SHIMADA, 2001).

Na asma, o aumento de secreção ou diminuição do calibre do brônquio pode promover a tosse; particularmente nos estudos do cineol, o mesmo não teve ação anti-tussígena. Porém, altas concentrações de cineol podem diminuir a tosse por meio da

inibição da broncoconstrição ou da secreção das vias aéreas (LAUDE; MORICE; GRATTAN, 1994).

A farmacocinética do cineol tem sido extensivamente estudada, visto que o composto é bem absorvido por via inalatória, com pico de concentração após 18 minutos (JAGER et al., 1996), sendo estes monoterpenoides metabolizados por microsomas do fígado, em diferentes espécies de mamíferos e excretados pela urina (DUISKEN et al., 2005).

Juergens et al. (2003) destacaram que as várias misturas de óleos essenciais, monoterpenos com propriedades secretoras, são amplamente utilizadas pelo homem. Ressaltaram ainda, que a irritação das vias aéreas e a contração brônquica provocada pelas misturas naturais de monoterpenos seria um fator limitante ao seu uso. Porém, o 1,8-cineol seria bem mais tolerado, devido ser um monoterpeno saturado.

Estes efeitos tóxicos do cineol podem ser manifestados por meio de efeito depressivo, respiratório e constrição pupilar. A dose tóxica pode levar à sonolência, deixando o paciente inconsciente rapidamente (15 minutos), levando ainda à dor epigástrica, fraqueza nas pernas e dores de cabeça. Os efeitos no sistema respiratório são bem diversificados, como respiração anormal (TISSERAND; BALACS, 1995).

O 1,8-cineol suprime a produção de metabólitos do ácido araquidônico, leucotrieno B₄ (LTB₄) e PGE₂ em monócitos de pacientes com asma brônquica (JUERGENS et al, 1998). Juergens et al. (1998) destacam que a sua inibição está na produção de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, prostaglandinas e leucotrienos.

A inibição da fase da ciclooxygenase foi apresentada como primeira evidência na potente atividade anti-inflamatória do 1,8-cineol (DEWHIRST, 1980), pois mediadores inflamatórios são conhecidos na indução da hipersecreção induzida pela estimulação da secreção de Cl⁻ em vias aéreas (LUNDGREN; SHELHAMMER, 1990; JUERGENS et al., 2003). Dados clínicos ou experimentais têm sido descritos na literatura acerca do uso do 1,8-cineol como medicação anti-inflamatória, ou mesmo antiasmática (JUERGENS et al., 2003-2004; ZHOU et al., 2007).

Todavia, altas concentrações sistêmicas do 1,8-cineol foram capazes de inibir os efeitos inflamatórios em ratos, isto é, em edema de pata induzido por carregenina (SANTOS; RAO, 2000).

A relação química entre o monoterpeneo 1,8-cineol e os glicocorticóides, também membro da família terpene, possibilitaram um mecanismo comum de supressão de mediadores inflamatórios na eficácia de anti-inflamatórios (JUERGENS et al., 2003).

Todavia, inibe a produção de TNF- α , IL-1 β , LTB₄ e TXA₂ produzidos pela estimulação com LPS, em monócitos humanos *in vitro*. Sendo assim, sugerem que o 1,8-cineol seja um potente inibidor de citocinas, e que pode ser utilizado para o tratamento de inflamação das vias aéreas, na asma brônquica e outras desordens sensíveis a esteróides (JUERGENS; STOBER; VETTER., 1998). O tratamento sistêmico do 1,8-cineol pode ser utilizado no controle da ativação de processos inflamatórios e na exacerbação da asma e DPOC (JUERGENS et al. 2004). Porém, recentemente, foi evidenciada a ação do 1,8-cineol com propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (SANTOS; RAO, 2000).

Estudos mostram uma significativa inibição do LTB₄ e IL-1, após a terapia com 1,8-cineol (200mg) (JUERGENS et al., 1998), também inibindo a produção de citocinas em humanos não seletivamente, TNF- α , IL-1, IL-4 e IL-5 (JUERGENS et al., 2004).

Nos estudos de Santos (1999), o 1,8-cineol apresentou atividade pró-inflamatória e pró-nociceptiva local, com ações sobre os mastócitos e a adenosina, em modelo de indução de edema de pata de rato. Porém, quando administrado sistemicamente o 1,8-cineol exerceu efeito anti-inflamatório e antinociceptivo, inibindo o edema inflamatório agudo e a permeabilidade vascular, proporcionando a supressão de formação de tecido granuloso induzida por irritante físico.

Neste mesmo estudo, os autores ainda apresentaram propriedades relacionadas ao 1,8-cineol, como sedativas e anticonvulsivantes, quando era proporcionado uma potencialização do tempo de sono induzido por pentobarbital, e preveniu convulsões em modelos de epilepsia por pentilenotetrazol. Outras funções apresentadas pelo 1,8-cineol, no estudo de Santos (1999) e Santos; Rao (2000) foram: função gastroprotetora (redução da acidez gástrica e o aumento do muco gástrico), função antissecretória e efeito de proteção contra hepatite tóxica.

Tisserand; Balacs (1995) mostraram que os efeitos adversos do cineol no sistema respiratório estavam relacionados com a dose, isto é, quando em altas doses ocorre uma estimulação na produção de muco na árvore respiratória; por outro lado, em baixas doses favorece a diminuição dessa produção de muco. Entretanto, o uso do óleo de eucaliptol tem sido empregado, amplamente, na medicina tradicional para bronquites, sinusites e na tosse com medicação secretora (JUERGENS et al., 2003).

Juergens et al. (2003) destacaram que a ação anti-inflamatória do 1,8-cineol já havia sido apresentada por Dewhirst, em 1980, quando ele ressaltou que a inibição da fase da ciclooxigenase pelo 1,8-cineol teria uma ação potente de inibição no processo inflamatório. Mais recentemente, Juergens et al. (1998) mostraram que o monoterpene 1,8-cineol apresentava sua supressão dos metabólitos do ácido araquidônico e na produção de citocinas em linfócitos e monócitos de humano, semelhante ao apresentado pelos glicocorticóides. A redução da produção de citocinas sugere uma ação anti-inflamatória e, conseqüentemente, inibição de citocinas induzidas nas vias aéreas, bem como na atividade secretora, tanto quanto na hipersecreção de muco (JUERGENS et al., 2004), sendo farmacologicamente ativo, em estudos mostrados em humanos e animais (BALACS, 1997).

Os trabalhos de Marom et al. (1982) e de Lundgren; Shelhammer (1990) destacaram que os mediadores inflamatórios induzem a hipersecreção devido ao estímulo da secreção de íons de cloro nas vias áreas.

Santos; Rao (2000) apresentam nos seus estudos com modelos de inflamação em ratos, que a utilização de altas concentrações sistêmicas de 1,8-cineol pode apresentar uma inibição deste processo inflamatório.

A evidência da utilização de monoterpenos 1,8-cineol como anti-inflamatório na asma foi apresentado mais recentemente por Juergens et al. (2003), tendo ainda destacado o seu uso como agente mucolítico nas doenças das vias aéreas. Porém, investigações experimentais mostram que o cineol tem propriedades broncodilatadoras e relevância clínica como anti-inflamatório no tratamento da asma (JUERGENS et al., 1998).

Na literatura há carência de trabalhos referendando que o 1,8-cineol apresente ação broncodilatadora; pode-se citar, porém, o trabalho desenvolvido por Wittmann et al., em 1998, quando evidenciaram uma resposta broncodilatadora em pacientes com asma, que fizeram uso de 1,8-cineol por sete dias. Outro trabalho que aborda o efeito de relaxamento do 1,8-cineol foi o desenvolvido por Nascimento et al. (2009), que destaca a ação broncodilatadora do 1,8-cineol em cobaias, porém caracteriza esta resposta por meio de um mecanismo inespecífico.

Recentemente, trabalho desenvolvido por Coelho-de-Souza et al. (2005), demonstrou que o óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* Sm. produz um relaxamento concentração-dependente no tônus basal de traquéias de cobaias *in vitro*, e que este relaxamento foi evidenciado também após a contração induzida pelo potássio, porém

em menor amplitude do que a induzida pela aminofilina. Neste mesmo estudo evidenciou-se que as contrações induzidas pela acetilcolina, na concentração de 200-400 μ g/mL, eram aumentadas pelo óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis*, e que em concentrações maiores (800-1000 μ g/mL) este efeito contráctil era reduzido. O mesmo efeito bifásico, diferencial do óleo essencial de *Eucalyptus tereticornis* para a acetilcolina também foi evidenciado quando a preparação foi contraída com estímulo elétrico.

O 1,8-cineol, principal constituinte do *Eucalyptus tereticornis*, provocou ainda a redução da resposta contráctil do potássio de maneira concentração-dependente, tendo aumentado às contrações provocadas pela acetilcolina, tendo este efeito sido evidenciado em todas as concentrações utilizadas.

2 JUSTIFICATIVA

Embora o interesse pelo estudo do 1,8-cineol tenha aumentado nos últimos tempos, os detalhes de sua ação farmacológica ainda podem ser considerados escassos acerca do seu uso no efeito de broncodilatação, especialmente em modelo de asma, porém é amplamente utilizado nas doenças respiratórias devido ao efeito anti-inflamatório. Questionamos se este efeito benéfico do 1,8-cineol, nas doenças respiratórias inflamatórias, não seria somente devido a esta ação anti-inflamatória e se não existiria uma ação de miorelaxamento das vias aéreas associada ao uso do 1,8-cineol.

3 OBJETIVOS

O presente estudo teve com objetivos gerais:

1. Avaliar o efeito do eucaliptol na contratilidade da musculatura lisa das vias aéreas.
2. Avaliar o efeito do 1,8-cineol em tecidos musculares lisos provenientes das vias aéreas de animais sensibilizados e desafiados com antígeno.
3. Avaliar o efeito do 1,8-cineol em parâmetros fisio-patológicos nas vias aéreas.

Tendo ainda como objetivos específicos:

1. Detectar, *in vitro*, eventuais alterações na resposta contráctil de traquéias de cobaias sensibilizadas, desafiadas à ovalbumina e submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol.
2. Analisar as alterações histopatológicas do tecido traqueal de cobaias sensibilizadas, desafiadas à ovalbumina e submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol.
3. Mensurar o transporte mucociliar na traquéia de cobaias sensibilizadas, desafiadas à ovalbumina e submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol.
4. Analisar o conteúdo celular do lavado bronco-alveolar de cobaias sensibilizadas, desafiadas à ovalbumina e submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol.
5. Verificar os níveis de marcadores inflamatórios no lavado bronco-alveolar de cobaias sensibilizadas, desafiadas à ovalbumina e submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol.
6. Verificar a degranulação dos mastócitos de cobaias submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol.
7. Analisar parâmetros respiratórios em cobaias sensibilizadas, desafiadas à ovalbumina e submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol.

4 METODOLOGIA

O percurso metodológico seguido nesse estudo compreendeu do desenvolvimento de diversos protocolos, sendo descritos a seguir os materiais e métodos utilizados na pesquisa.

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Aspectos Éticos

O estudo seguiu os aspectos éticos que envolvem a pesquisa com animais para cuidados e uso de animais de laboratórios publicado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação com Animais (COBEA), o qual foi submetido à apreciação e aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (Protocolo número 34/06).

4.1.2 Animais

No presente trabalho foi utilizado cobaias machos, da espécie *Cavia porcellus*, pesando 300-500 g no início dos experimentos, provenientes do Biotério da Faculdade Integrada do Ceará (FIC). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biofísica, Fisiologia e Farmacologia da Faculdade Integrada do Ceará, no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso, Laboratório Escola Prof. Luiz Capelo e no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram alojados no Biotério durante o período de quatro semanas em gaiolas plásticas com tampas metálicas (54 x 20 x 40 cm). Durante o período de alojamento, a manipulação das cobaias consistiu apenas dos procedimentos necessários para troca de ração, água, limpeza e higienização das gaiolas. A água e a ração foram fornecidas *ad libitum*.

Os animais considerados nesse estudo foram tratados de acordo com os procedimentos acima descritos e podem ser divididos em 03 grupos assim definidos:

Animais naive: cobaias que não receberam nenhum tratamento sensibilizante antes da realização dos experimentos.

Animais sensibilizados: cobaias que foram imunizados com o antígeno sensibilizante, mas não sofreram o processo de desafio antigênico.

Animais desafiados: cobaias que foram sensibilizados ao antígeno e foram desafiados com o antígeno sensibilizante.

4.1.3 Método de sensibilização dos animais

Um grupo de animais foi sensibilizado ativamente por meio de injeções intraperitoneais de ovalbumina (*chicken egg albumin, grade II*, 10 mg/kg, 3 aplicações em dias alternados - nos dias 1, 3 e 5) de acordo com o método descrito por Weinreich; Undem (1987). Esses animais foram utilizados após um período mínimo de 21 dias e não mais que 50 dias após a última injeção aplicada no período de sensibilização. Os animais assim manipulados foram utilizados para experimentos *in vivo* ou *in vitro*.

4.1.4 Metodologia de desafio antigênico

São considerados animais desafiados os cobaias previamente sensibilizados que foram submetidos ao desafio antigênico por inalação. Conforme descrito acima, o desafio antigênico (broncoprovação) ocorreu no período entre os dias 21 e 50 pós-sensibilização, exatamente 24 horas antes da realização dos experimentos *in vivo* ou *in vitro*. No processo de desafio antigênico, os animais foram colocados em uma caixa de acrílico com as medidas de 30 x 16,6 x 19,8 cm. Na parte superior da caixa existe uma tampa removível para a colocação dos animais no compartimento interno. Nas porções laterais existem dois orifícios: um para acoplar o nebulizador ultra-sônico, por meio do qual foi realizada a nebulização de solução com o antígeno sensibilizante e o outro para servir de escape, evitando a reinalação do ar expirado.

A ovalbumina (OVA) para o desafio antigênico foi preparada em solução salina (NaCl 0,9%) mantida à temperatura ambiente e imediatamente antes da sua utilização. Após preparo, a solução de ovalbumina foi acondicionada em recipiente adaptado ao nebulizador (Respira Max[®] Inalador ultra-sônico, NS Indústria de Aparelhos Médicos Ltda, SP) que foi acoplado à caixa de acrílico para iniciar o processo de nebulização do antígeno. Após colocação do animal na caixa de acrílico, o período máximo de duração

da inalação foi mantido em 30 minutos, exceto quando ocorresse alteração respiratória (aparecimento de tiragem intercostal, desconforto respiratório, aumento do ritmo respiratório ou tosse associada à coriza intensa) que pudesse, eventualmente, comprometer a sobrevivência do animal. A inalação do antígeno no período de 30 minutos foi realizada em duas sessões seqüenciais de 15 minutos cada. Na primeira, a concentração de ovalbumina utilizadas foi de 1 mg/mL e na segunda sessão de 5 mg/mL.

4.1.5 Experimentos com traquéias isoladas

Para a obtenção das traquéias para os estudos de contratilidade do músculo liso das vias aéreas, os animais sofreram eutanásia com altas doses de anestésico, hidrato de cloral a 40% (1 mL/kg). Em seguida, após incisão mediana ventral, a traquéia foi rapidamente cortada em segmento único de aproximadamente 10 - 12 mm. A seguir o segmento cortado, foi transportado rapidamente para uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (mmol/l: NaCl 118,0, KCl 4,7, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 25,0, KH₂PO₄ 1,2 e glicose 10,0) à temperatura ambiente. Após a remoção dos tecidos adjacentes, a traquéia foi cortada em quatro segmentos sob a forma de anéis, que foram transferidos para câmaras de banho para órgão isolado contendo 5 mL de solução de Krebs-Henseleit, aerada continuamente com ar atmosférico, o pH da solução foi ajustado manualmente para 7,4 e mantida a 37°C pelo uso de bomba de circulação Haake FJ equipada com termostato. A luz dos anéis traqueais foi atravessada por duas peças metálicas confeccionadas em fino aço inoxidável, as quais foram atadas a dois pontos, um fixo na câmara e outro conectado à unidade transdutora de força (Grass, modelo FT03C, Quincy, Mass., EUA) apropriada para registro das contrações isométricas. Os sinais gerados pelo transdutor de força foram amplificados e registrados em um sistema de aquisição computadorizado (Dataq, PM-1000, WCE, Akron, Ohio, EUA) (Figura 2). A tensão aplicada a cada segmento traqueal foi ajustada em 1g. O período de equilíbrio foi de 1 hora com troca do líquido de incubação a cada 15 minutos.

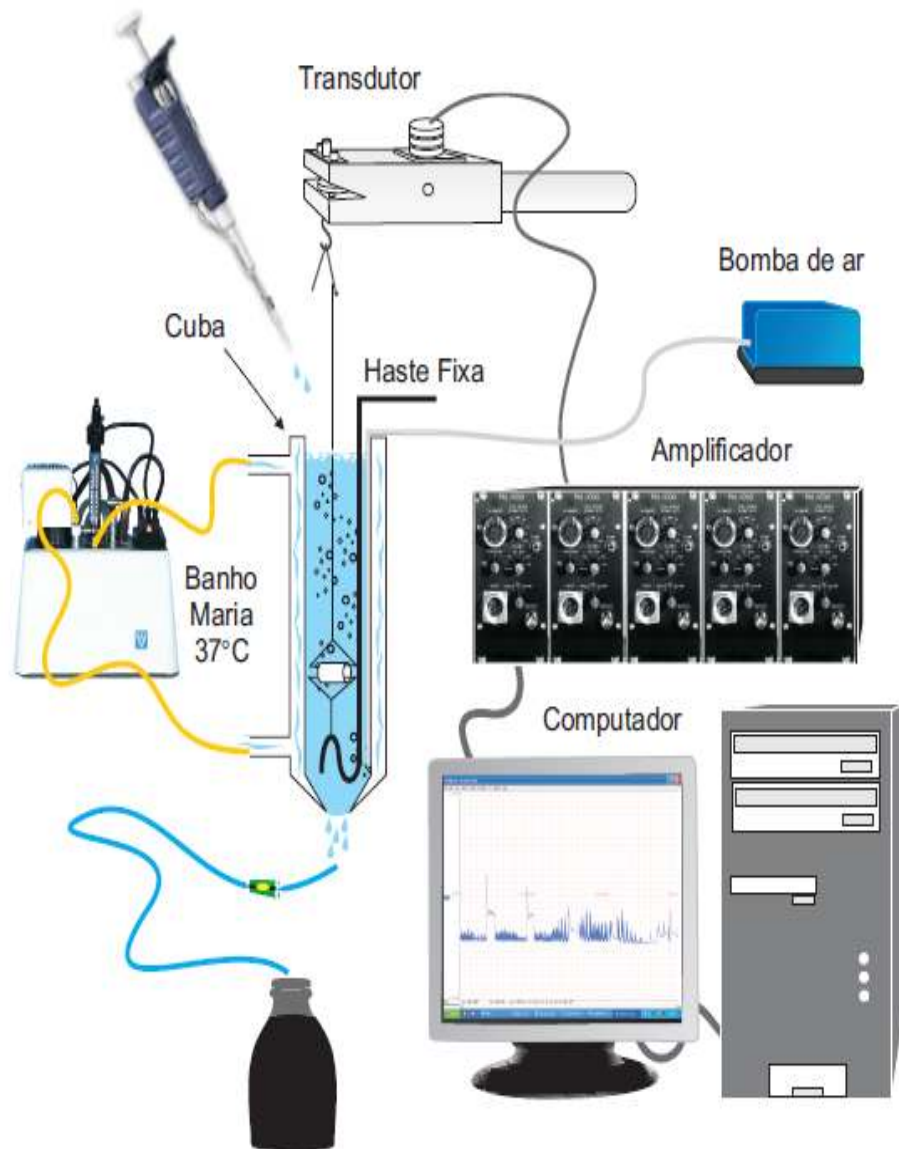


Figura 2 - Sistema de cubas isoladas e captação dos dados

Fonte: Figura adaptada de Jucá, 2007, p. 33

4.2 Protocolos experimentais para estudo da contratilidade traqueal

Após o período de equilíbrio das preparações conforme descrição anterior, os tecidos foram estimulados visando à obtenção de contrações de referência para avaliar inicialmente a responsividade tecidual. As contrações foram consideradas como a deflexão positiva dos traçados experimentais registrados no software de aquisição e foram medidas pela diferença entre o valor assintótico do pico da deflexão e o valor registrado no traçado de tensão basal observada antes da adição do agente contrátil. Em todos os experimentos, contrações iniciais foram induzidas pela adição de alta concentração de K^+ (60 mM) e esse procedimento foi repetido até que duas contrações de mesma magnitude fossem observadas. Nesse momento o tecido foi considerado em condições de iniciar qualquer outro procedimento. A maioria dos dados registrados ao longo desse trabalho, salvo quando explicitamente indicado, foram normalizadas em função da amplitude dessa última contração registrada para o K^+ .

4.2.1 Confeção das curvas concentração-efeito

Curvas concentração-efeito (CCE) foram obtidas pela exposição da preparação a concentrações cumulativamente crescentes de 1,8-cineol, KCl ou carbacol (CCh). Cada concentração de uma dada substância foi adicionada ao banho e assim foi mantida por um período de cinco minutos até a adição da concentração subsequente (eventualmente foram necessários até 10 minutos para observação do platô da resposta contrátil). O efeito máximo (E_{max}) para a CCE foi alcançado quando o aumento na concentração de dada substância não induziu resposta contrátil adicional àquela observada com a concentração anterior.

4.2.2 Farmacologia do 1,8-cineol na musculatura lisa isolada de traquéia de cobaias naive

4.2.2.1 CCE para o 1,8-cineol adicionado à preparação sob tônus basal

Anéis de traquéia com o epitélio íntegro obtidos de animais naive foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme descrição no item 4.1.5. Para estudar as alterações no tônus basal de traquéias isoladas de cobaias, foram

confeccionadas CCEs com a adição cumulativa e crescente de 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-6}$ a 2×10^{-2} M). Adicionalmente, as CCEs para o 1,8-cineol foram obtidas em preparações nas quais houve retirada do epitélio como também em preparações com o epitélio intacto na presença de diferentes substâncias como tetraetilamonio (TEA, 5 mM), L-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME, 50 μ M), tetrodotoxina (TTX, 0,5 μ M) ou propranolol (5 μ M). A retirada do epitélio foi realizada pela remoção mecânica através de esfregaços suaves e sucessivos na luz do segmento traqueal com hastes de algodão umidificado em solução fisiológica de Krebs. A remoção da camada epitelial foi confirmada por microscopia óptica. Após a observação do efeito máximo, o tecido foi lavado mediante trocas sucessivas e completas da solução fisiológica na câmara de banho, para se observar o retorno do traçado à linha de base, indicando assim a recuperação do tecido. Outro parâmetro avaliado que indica a integridade do tecido ao final do experimento, é a repetição de uma contração induzida por K^+ 60 mM e a comparação de sua amplitude com a amplitude obtida no início do experimento.

4.2.2.2 CCE para o 1,8-cineol adicionado à preparação sob tônus aumentado pela adição de histamina

Anéis de traquéia com o epitélio íntegro obtidos de animais naive foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme descrição no item 4.1.5. Para estudar as alterações em traquéia isolada de cobaias mantidas sob tônus aumentado, contrações sustentadas foram induzidas pela adição de histamina (10 μ M). Depois de atingido o estado estacionário da contração, foram confeccionadas CCEs com a adição cumulativa e crescente de 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-6}$ a $6,5 \times 10^{-3}$ M).

4.2.2.3 Efeito da adição in vitro do 1,8-cineol na CCE induzida por Ca^{2+} em anéis de traquéia mantidos na presença de acetilcolina em meio sem Ca^{2+}

Anéis de traquéia com o epitélio íntegro obtidos de animais naive foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme descrição anterior (ver item 4.1.5). Inicialmente foram obtidas duas respostas da acetilcolina (ACh) na concentração de 100 μ M em uma solução contendo Ca^{2+} , no intuito de verificar a eficácia da droga. Após essas respostas serem confeccionadas, a solução das câmaras foi trocada por 3 a 6 vezes por uma solução fisiológica confeccionada sem a adição de Ca^{2+} , mas contendo

EGTA (4 mM) e Verapamil (10 μ M). Após um período de cinco minutos, uma nova adição de ACh (100 μ M) foi realizada e uma pequena contração não sustentada foi registrada. Após o retorno do traçado ao valor basal uma CCE pela adição cumulativa de Ca^{2+} (10^{-4} a 2×10^{-2} M) foi iniciada com intervalo de quatro minutos entre as concentrações, ainda na presença de ACh. Em preparações pareadas a CCE à adição de Ca^{2+} foi confeccionada na presença de 1,8-cineol (6.5×10^{-3} M) mantendo-se as mesmas condições experimentais anteriormente descritas.

4.2.2.4 Efeito da adição in vitro do 1,8-cineol na CCE induzida por Ba^{2+} em anéis de traquéia mantidos em meio sem Ca^{2+} na presença de acetilcolina

Anéis de traquéia com o epitélio íntegro obtidos de animais naive foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme descrição anterior (ver item 4.1.5). O protocolo seguido foi o mesmo do item 4.2.2.3, exceto pelo fato de que a adição de Ca^{2+} foi substituída pela adição de Ba^{2+} de maneira cumulativa na faixa de concentração de 10^{-4} a 2×10^{-2} M. Foram obedecidos os mesmos intervalos de tempo para adição de concentrações subseqüentes. Em preparações pareadas a CCE à adição de Ba^{2+} também foi confeccionada na presença de 1,8-cineol (6.5×10^{-3} M) mantendo-se as mesmas condições experimentais anteriormente descritas.

4.2.3 Farmacologia do 1,8-cineol na musculatura lisa isolada de traquéia de cobaias sensibilizadas e desafiadas à ovalbumina

4.2.3.1 Efeito do 1,8-cineol na contração da traquéia de cobaia induzida pela reação de Schultz-Dale

Anéis de traquéia com o epitélio íntegro obtidos de animais naive desafiados com salina, animais sensibilizados também desafiados com salina (SENS) ou de animais sensibilizados e desafiados com o antígeno sensibilizante (DES) foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme descrição anterior (item 4.1.5). Os tecidos traqueais foram mantidos em condições basais durante 10 minutos e foi realizada adição de solução de ovalbumina (OVA; 10 μ g/mL) na cuba para a iniciação da reação de *Schultz-Dale*. Essa reação foi considerada positiva quando os tecidos obtidos de animais sensibilizados produziram respostas contráteis imediatas e vigorosas

pela adição de OVA que foram registradas pelo valor assintótico máximo observado na deflexão do traçado. Em preparações pareadas, esse procedimento foi realizado na presença de 1,8-cineol (2×10^{-3} ou $6,5 \times 10^{-3}$ M) adicionado previamente (5 min) à OVA.

4.2.3.2 Efeito da adição in vitro do 1,8-cineol na CCE induzida por KCl

Anéis de traquéia com o epitélio íntegro obtidos de animais sensibilizados e desafiados com salina (SENS) ou de animais sensibilizados e desafiados com o antígeno sensibilizante (DES) foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme descrição anterior (item 4.1.5). Foram confeccionadas CCEs com a adição cumulativa, crescente e hipertônica de KCl (10^{-5} a $1,2 \times 10^{-4}$ M), inicialmente na ausência e posteriormente, após lavagens sucessivas da preparação para retorno do tecido às condições experimentais iniciais, na presença de 2×10^{-3} M de 1,8-cineol e, novamente na presença de $6,5 \times 10^{-3}$ M de 1,8-cineol. Em um grupo separado de tecidos, a CCE para o KCl foi repetida na presença apenas do veículo (Tween 80, 0,01% v/v) nas mesmas proporções usadas para dissolver o 1,8-cineol, para demonstrar que as alterações observadas seriam causadas pelo 1,8-cineol.

4.2.3.3 Efeito da adição in vitro do 1,8-cineol na CCE induzida por CCh

Anéis de traquéia com o epitélio íntegro obtidos de animais sensibilizados e desafiados com salina (SENS) ou de animais sensibilizados e desafiados com o antígeno sensibilizante (DES) foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme descrição anterior (item 4.1.5). Foram confeccionadas CCEs com a adição cumulativa e crescente de CCh (10^{-9} a 10^{-4} M), inicialmente na ausência e posteriormente, após lavagens sucessivas da preparação para retorno do tecido às condições experimentais iniciais, na presença de 2×10^{-3} M de 1,8-cineol e, novamente na presença de $6,5 \times 10^{-3}$ M de 1,8-cineol. Em um grupo separado de tecidos, a CCE para o CCh foi repetida na presença apenas do veículo (Tween 80, 0,01% v/v) nas mesmas proporções usadas para dissolver o 1,8-cineol, para demonstrar que as alterações observadas seriam causadas pelo 1,8-cineol.

4.2.3.4 Efeito da inalação de solução de 1,8-cineol na CCE induzida por CCh

Em um grupo separado de animais sensibilizados ao antígeno, foi realizada inalação mediante nebulização de uma solução de 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) por 15 minutos antes da sessão de desafio antigênico. Imediatamente após os 15 minutos, os animais foram desafiados mediante nebulização apenas de solução salina ou de solução salina contendo o antígeno sensibilizante. Após 24 horas, os animais foram sacrificados e os anéis de traquéia foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme descrição anterior (item 4.1.5) para confecção das CCEs pela adição cumulativa de CCh (10^{-9} a 10^{-4} M).

4.3 Protocolos experimentais para estudo da inflamação

4.3.1 Farmacologia dos efeitos anti-inflamatórios do 1,8-cineol

4.3.1.1 Efeito do 1,8-cineol na análise histopatológica de tecido traqueal de cobaia

Anéis de traquéia com o epitélio íntegro obtidos de animais naive desafiados com salina, animais sensibilizados desafiados com salina (SENS) ou de animais sensibilizados e desafiados com o antígeno sensibilizante (DES) sem ou com pré-tratamento do 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) foram fixados em formol tamponado a 10 %. Em seguida o material foi processado em álcool anidrido para desidratação, xilol para a diafanização e impregnado em parafina. Após a impregnação em parafina o material foi cortado em micrótomo com espessura de 5 μ m, que após ser montado em lâminas foi feita à coloração pelo método da hematoxilina-eosina (HE). Terminada a coloração a lâmina foi recoberta com lamínula afixada mediante uma gota de bálsamo sobre o corte. Desta forma o material estava apto para ser examinado em microscopia óptica.

Nas análises histopatológicas dos tecidos traqueais de cobaias foi estabelecida uma escala de escores variando de 0 a 4, levando em consideração o grau de comprometimento do tecido, considerando-se o valor 0 ao tecido com menor comprometimento (LIMA, 2004, modificado).

Nesta análise foram avaliados os aspectos inflamatórios como presença e intensidade do infiltrado celular, dilatação e ingurgitamento vasculares, edema, dano no

tecido epitelial, sendo classificados de acordo com os escores padronizados, citados a seguir:

- **Escore 0:** epitélio e tecido conjuntivo íntegros; infiltrado celular ausente; ausência de edema na mucosa
- **Escore 1:** epitélio e tecido conjuntivo sem vasodilatação; infiltrado celular ausente ou discreto; ausência de edema na mucosa.
- **Escore 2:** ingurgitamento vascular discreto; áreas de descamação discreta do epitélio; infiltrado celular discreto, com maior número de células inflamatórias, ausência de edema na mucosa.
- **Escore 3:** ingurgitamento vascular moderado; áreas de descamação moderada do epitélio; infiltrado celular moderado, com predomínio de eosinófilos; presença de edema e de eventuais alterações da mucosa.
- **Escore 4:** ingurgitamento vascular acentuado; áreas de descamação acentuada do epitélio, vasodilatação acentuada; infiltrado celular acentuado, com maior número de eosinófilos; presença de áreas de edema e alterações da mucosa .

4.3.1.2 Efeito do 1,8-cineol no conteúdo do lavado bronco-alveolar de cobaia

Para avaliação dos efeitos do 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) no conteúdo do lavado bronco-alveolar de cobaias, os animais foram inicialmente anestesiados com hidrato de cloral a 40% (1 mL/kg) em altas doses. Após exposição cirúrgica e canulação da traquéia, os animais foram exsanguinados pela secção da artéria carótida e os pulmões foram preenchidos com 5 mL de solução salina a 37°C, injetada na cânula traqueal por meio de uma seringa de 20 mL, de acordo com Hutson (1989). A seringa foi mantida conectada à cânula traqueal por três minutos e, então, o fluido injetado foi lentamente recuperado. Este procedimento foi repetido uma vez com mais 5 mL de salina. Os fluidos recuperados foram misturados e acondicionados em dois tubos de ensaio, um destinado à contagem de células e o outro para dosagens colorimétricas e imunoenzimáticas.

4.3.1.2.1 Contagem total e diferencial das células

A amostra do lavado bronco-alveolar usada para contagem celular foi centrifugada a 4°C por 10 minutos a 200 g (HUTSON, 1989). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuscitado em 2 mL de salina heparinizada (heparina 0,1/100 mL de salina). As contagens total e diferencial das células das amostras dos grupos naive, SENS e DES obtidas de animais tratados ou não pelo 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) foram realizadas baseadas no método de Souza; Ferreira (1985). Para tanto, 20 μ l do material ressuscitado, foram diluídos em 380 μ l de líquido de Turk (1:20), e em seguida utilizados para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. Uma outra alíquota de 30 μ l do ressuscitado foi utilizada para a contagem celular diferencial. Foram confeccionados os esfregaços e a seguir citocentrifugados a 400 g, durante 10 min. Ao fim da citocentrifugação foram corados pelo método da hematoxilina-eosina (corante HEMA 3). As células foram examinadas em microscópio óptico utilizando uma objetiva com aumento de 100 vezes, onde foram contadas 100 células em cada lâmina. Foram diferenciados quatro tipos de células: macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. O número de eosinófilos foi estimado e avaliado em função da porcentagem total de leucócitos encontrada (contagem total), bem como para as outras células.

4.3.1.2.2 Técnica Colorimétrica

Para a realização da imunohistoquímica foram utilizados 2 mL do fluido coletado do lavado bronco-alveolar os quais foram congelados a -70°C para avaliação da atividade da mieloperoxidase ou dosagem de citocinas.

- Avaliação da Atividade da Mieloperoxidase

O material coletado para avaliar a atividade da mieloperoxidase (MPO) foi proveniente das amostras do lavado bronco-alveolar dos grupos naive, SENS e DES obtidas de animais tratados ou não pelo 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M). A atividade da MPO foi aferida através da técnica descrita por Bradley et al. (1982), utilizando 0,0005% de peróxido de hidrogênio como substrato para a MPO. A unidade da atividade de MPO

foi definida como aquela capaz de converter 1 μmol de peróxido de hidrogênio em água em 1 minuto a 22° C. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio era degradado ocorria a produção do ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidina em um composto de cor marrom. Os resultados foram expressos como atividade de MPO/mL do lavado bronco-alveolar.

4.3.1.2.3 Técnica Imunoenzimática

- Dosagem de Citocinas

As concentrações de IL-1 β , IL-10 e TNF- α foram medidas no material proveniente do lavado bronco-alveolar, obedecendo aos mesmos grupos descritos anteriormente (item 4.3.1.2.1), sendo usada a técnica ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) como descrito no Kit do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, E.U.A). O material proveniente do lavado bronco-alveolar foi estocado em tampão para citocinas contendo anti-proteases em freezer -70°C. A amostra foi centrifugada por 10 min em 3000 x g e o supernadante foi imediatamente usado para o ensaio de ELISA com anticorpos específicos para as citocinas IL-1 β , IL-10 e TNF- α (SOUZA et al., 2001).

4.3.1.3 Efeito do 1,8-cineol na degranulação de mastócitos de mesentério de cobaias

Para estudar os efeitos do 1,8-cineol na degranulação de mastócitos o leito mesentérico de animais naive foi obtido após eutanásia dos animais. As peças do mesentérico foram incubadas por 20 minutos em 20 mL de solução de Tyrode contendo o composto 48/80, um agente farmacológico que causa a desgranulação de mastócitos, na concentração de 0,8 $\mu\text{g/mL}$. Após o período de incubação, as peças foram transferidas para outra placa de Petri contendo solução de azul de toluidina (solubilizado em álcool 70% na concentração de 0,1 g/L, e posteriormente diluído em NaCl 1% na proporção de 1:10, resultando na concentração de 0,01 g/L) para coloração à temperatura ambiente. Em seguida, a preparação foi lavada com Tyrode e colocada para secar sobre lâmina de vidro. Após secagem e retirada do excesso de tecido, foram contadas cem células em diferentes campos através de um microscópio óptico (aumento 200x) e desse total, foi estimado o percentual de degranulação pelo número de

mastócitos degranulados. A avaliação da degranulação de mastócitos foi realizada na ausência e na presença de 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) incubado previamente por 5 minutos em solução de Tyrode.

A degranulação de mastócitos também foi avaliada em leito mesentérico obtido de animais que inalaram solução de 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) por 15 min. Após 15 min do término da inalação, os animais foram eutanizados e procedeu-se a avaliação da degranulação de mastócitos com a incubação do leito mesentérico inicialmente em solução de Tyrode contendo o composto 48/80, seguida de coloração com azul de Toluidina, conforme anteriormente descrito. Como controle positivo, alguns animais inalaram solução de cromoglicato dissódico ($4,03 \times 10^{-3}$ M).

4.4 Farmacologia do 1,8-cineol nas vias aéreas de cobaias em experimentos *in-vivo*

4.4.1 Efeito do 1,8-cineol na Mensuração da velocidade de transporte mucociliar

Para avaliação dos efeitos do 1,8-cineol no transporte mucociliar, seguimos uma adaptação do método descrito anteriormente por Kimoto et al. (1999). Após o processo de sensibilização e desafio na ausência ou na presença de pré-tratamento com 1,8-cineol (inalação de solução de 1,8-cineol $6,5 \times 10^{-3}$ M nebulizada durante 15 minutos), os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 40% (1 mL/kg) em altas doses para realização do experimento. Depois de constatada a anestesia mediante a ausência de resposta ao pinçamento da pata traseira, os animais foram colocados em posição supina com elevação do plano em 30°, para diminuir a influência da gravidade no deslocamento do marcador. Uma vez posicionado o animal, a superfície anterior da traquéia foi exposta mediante incisão mediana ventral por meio da qual foram injetados 2 µl de mistura coloidal gelatinosa (gelatina em pó incolor comestível, Dr. Oetker, SP) (0,3 g/mL contendo 0,5% do corante azul de Evans como marcador) no lúmen traqueal através do espaço intercartilaginoso imediatamente acima do manúbrio esternal. Decorridos dois minutos, as traquéias foram abertas longitudinalmente do ponto de injeção até a altura da cartilagem cricóide. O transporte mucociliar foi considerado como a medida da distância percorrida pelo marcador a partir do ponto de injeção. A distância percorrida foi medida em cm mediante uso de paquímetro.

4.4.2 Medidas das pressões pulmonares

Os efeitos do 1,8-cineol foram avaliados nas pressões inspiratória (PI) e expiratória (PE) e na frequência respiratória (FR) de cobaias. Após 24 h do processo de desafio por inalação de salina ou antígeno com animais sensibilizados, na ausência ou na presença de pré-tratamento com 1,8-cineol (inalação de solução de 1,8-cineol 6.5×10^{-3} M nebulizada durante 15 minutos), as cobaias foram anestesiadas com uretana (1.2 g/kg, *i.p.*). A traquéia foi canulada e conectada em sistema fechado a um transdutor de pressão, ao final da inspiração, não permitindo escape de fluxo aéreo. A conexão foi assim mantida até que o animal apresentasse tiragem intercostal (aproximadamente 20 segundos). Essa mensuração foi realizada três vezes em cada animal, o tempo de intervalo ocorria de acordo com a normalização do padrão e ritmo respiratórios. O registro dos parâmetros ventilatórios foram feitos em sistema de aquisição PowerLab/8sp, AD Instruments[®]. Os valores de FR foram derivados dos picos de pressão expiratória com o auxílio do programa LabChart[®] v 4.0. Os valores de frequência respiratória foram expressos como irpm (incursões respiratórias por minuto) e os valores de pressão em cmH₂O (centímetros de água).

4.5 Soluções e drogas

As soluções utilizadas nos experimentos com solução fisiológica foram a de Krebs-Henseleit (em mmol/l): NaCl 118,0, KCl 4,7, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 25,0, KH₂PO₄ 1,2 e glicose 10,0, Solução de Ringer-KCl (mmol/l): KCl 164,2; KH₂CO₃ 3,5; Glicose 5,4, Solução Salina 0,9% (Gaspar Viana) e Solução de Tyrode (mmol/l): NaCl 136, KCl 5, MgCl₂ 0,98, CaCl₂ 2, NaH₂PO₄ 0,36, NaHCO₃ 11,9 e glicose 5,5. As drogas acetilcolina, verapamil, carbacol (CCh), composto 48/80, EGTA (ácido etileno glicol O'-bis(2-aminoetil)-N, N, N', N'-tetracetico), histamina, propranolol, tetrodotoxina (TTX), tetraetilamonio (TEA), L-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME) e ovalbumina foram preparadas pela adição da substância pura diretamente para a água destilada e armazenados no freezer em concentrações 100 a 1000 vezes maior do que aqueles usados no banho câmara. A solução de 1,8-cineol foi preparada para cada experimento, dissolvendo-o diretamente em Krebs-Henseleit contendo Tween 80 a 0,2% imediatamente antes da utilização. Diluições adicionais foram realizadas para alcançar a concentração desejada e a concentração de Tween não ultrapassou 0,01%

(v/v). Sais e drogas (todos de grau analítico) foram adquiridos da Sigma Chemical (Saint Louis, MO, E.U.A.) ou Merck (Dermstadt, Alemanha). O hidrato de cloral foi adquirido do Laboratório Cromato Produtos Químicos Ltda (Diadema, SP, Brasil) e o cromoglicato dissódico 4% foi do laboratório Sanofi-Aventis (São Paulo, Brasil). Para análise das citocinas IL-1, IL-10 e TNF- α foi usado o kit para anticorpos de captura, primários e secundários da R&D Systems, Minneapolis, MN, E.U.A.

4.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. Para comparação entre os grupos, foram utilizados: análise de variância (ANOVA), teste de Mann-Whitney, Holm-Sidak, Dunn's e teste t de Student. Probabilidade de ocorrência de nulidade menor que 0,05 foi aceita como indicativa de significância estatística. Os dados de contratilidade foram expressos em valores absolutos (g) ou em percentual (%) da resposta média da contração de referência induzida por K⁺ (60 mM), obtida no início de cada experimento. Alguns resultados foram expressos como % da contração do agonista na ausência de 1,8-cineol. A distância percorrida pelo marcador na traquéia foi expressa em cm. Nas análises histopatológicas, os dados obtidos foram expressos como mediana acompanhada pelos respectivos valores extremos do rol de dados, e o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney foi aplicado. O número de células no lavado foi expresso por volume, os níveis de citocinas por suas concentrações e as comparações estatísticas foram feitas pelo teste t não pareado. A degranulação de mastócitos foi expressa como % do total de mastócitos degranulados na amostra. Parâmetros respiratórios foram expressos em valores absolutos em cmH₂O e irpm.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da Resposta do K⁺ em traquéias isoladas de cobaias

A responsividade inicial do tecido traqueal foi avaliada por meio da obtenção de resposta contráctil ao K⁺. Foi possível verificar que essa resposta contráctil captada nos experimentos foi de $0,33 \pm 0,02$ g (n = 44). Ao final dos protocolos experimentais, a responsividade ao K⁺ foi novamente testada e a resposta contráctil foi de $0,25 \pm 0,01$ g (n = 44). Esses valores não apresentaram diferença significativa (p = 0,066, teste Mann-Whitney).

5.2 Efeito do 1,8-cineol no tônus basal em traquéias isoladas de cobaias

Na avaliação dos efeitos do 1,8-cineol sobre o tônus basal de traquéias isoladas de cobaias com epitélio íntegro de animais naive, foi verificado que o 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-6}$ a 2×10^{-2} M) induziu relaxamento concentração dependente (p < 0,001, ANOVA) no tônus basal com valor de pD₂ correspondente a 2.23 [2.10 – 2.37] (n = 14) (Tabela 1). A magnitude do relaxamento induzido pelo 1,8-cineol no tônus basal de traquéia alcançou o valor máximo (E_{max}) de $92,1 \pm 19,9$ % (n = 14) em relação à contração induzida por 60 mM do K⁺ (Figura 3A).

A análise dos efeitos do 1,8-cineol sobre o tônus basal também foi realizada em preparações com o epitélio removido (n = 17) ou ainda em tecidos com o epitélio íntegro, porém mantidos na presença de L-NAME (50 μM; n = 6), TEA (5 mM; n = 6), TTX (0,5 μM; n = 6) ou propranolol (5 μM; n = 6), as quais não apresentaram alteração significativa (p > 0,05) da potência (pD₂) ou do E_{max} induzido por 1,8-cineol (Tabela 1, Figura 3B). Por outro lado, o relaxamento do tônus basal foi revertido após sucessivas trocas de líquidos de solução tampão fisiológica para remoção do 1,8-cineol (Figura 3A).

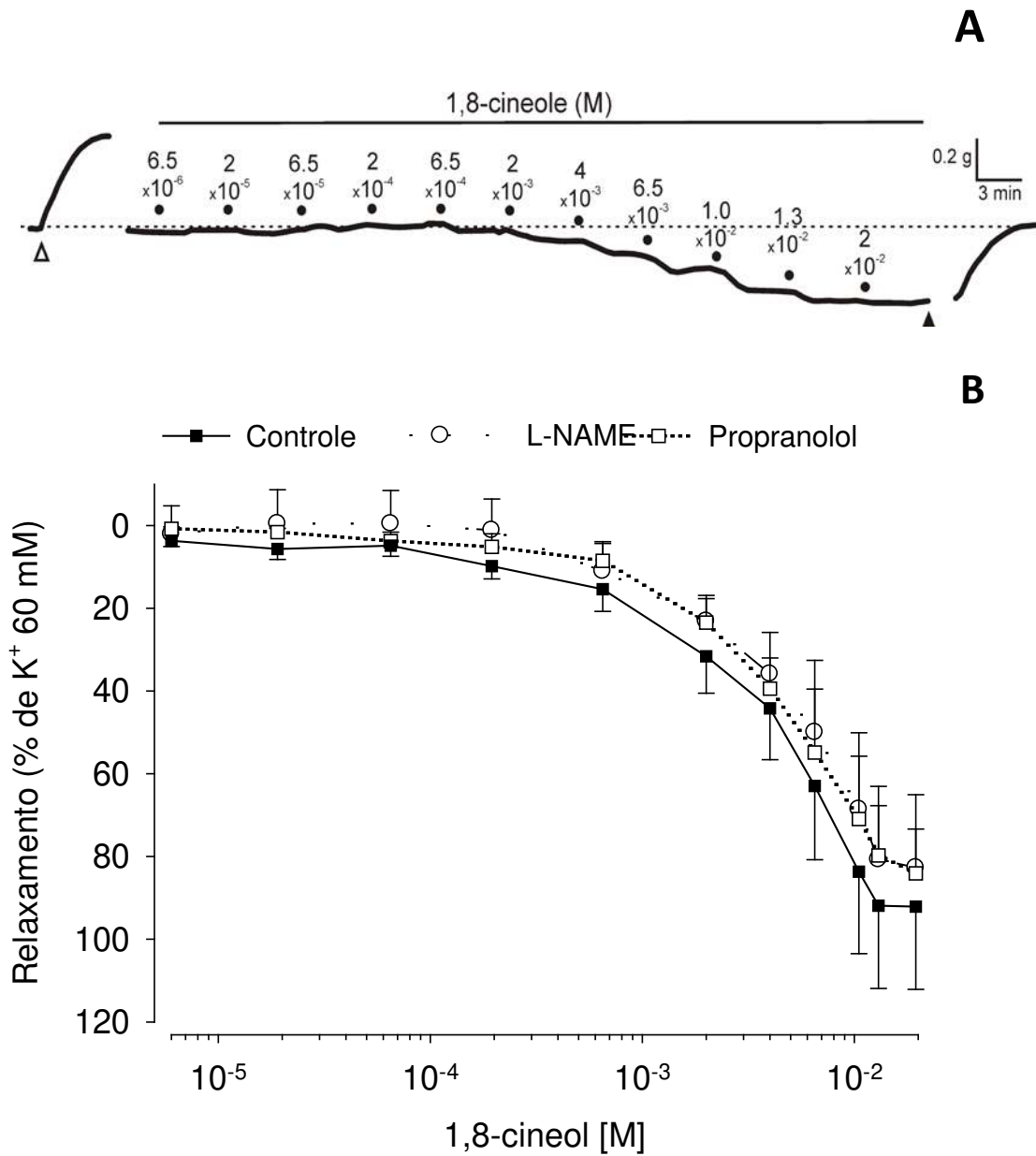


Figura 3 - Efeito miorreaxante do 1,8-cineol no tônus basal de traquéia de cobaia. Figura 3A evidencia um traçado típico experimental do efeito miorreaxante induzido por adição cumulativa do 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-6}$ M to 2×10^{-2} M; $n = 14$). Exposição por cinco minutos a cada concentração do 1,8-cineol, e recuperação completa após a troca sucessiva do líquido de incubação. Figura 3B representa em gráfico os valores do efeito miorreaxante induzido pelo 1,8-cineol na ausência (Controle, quadrado preto; $n = 14$), ou na presença de L-NAME ($50 \mu\text{M}$, círculo branco; $n = 6$) ou propranolol ($5 \mu\text{M}$, quadrado branco; $n = 6$). Dados são expressos em média \pm E.P.M.

Tabela 1 - Potência (pD₂) e valores de E_{max} do efeito relaxante induzido por 1,8-cineol no tônus basal de traquéia de cobaias naive.

	pD ₂ (n)	E _{max}
Epitélio +	2.23 [2.10 – 2.37] (14)	92.1 ± 19.9
Epitélio -	2.35 [2.25 – 2.45] (17)	99.2 ± 15.8
L-NAME	2.32 [2.09 – 2.55] (6)	82.7 ± 17.7
TTX	2.31 [1.87 – 2.76] (6)	83.3 ± 28.4
TEA	2.36 [2.28 – 2.45] (6)	73.7 ± 14.2
Propranolol	2.09 [1.81 – 2.36] (6)	84.1 ± 10.7

pD₂ expressa os valores do logaritmo negativo de 50% do efeito da concentração máxima (EC₅₀), em mol/l;

E_{max} valores de relaxamento do tônus basal expresso em % da contração inicial induzida por 60 mM K⁺.

Dados são expressos em média ± E.P.M.

5.3 Efeito do 1,8-cineol na resposta da histamina em traquéias isoladas de cobaias

A adição de histamina ($10 \mu\text{M}$) ao meio de incubação dos anéis de traquéias de cobaias naive produziu contração sustentada correspondente a $0,81 \pm 0,13 \text{ g}$ ($n = 7$). Adicionado após estabelecido o platô da contração, o 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-6}$ a $6,5 \times 10^{-3} \text{ M}$) reverteu significativamente a resposta contrátil histaminérgica cujo relaxamento correspondeu a $118 \pm 10,58 \%$ da resposta contrátil obtida antes da adição de 1,8-cineol ($p < 0,001$; $n = 7$, teste Mann-Whitney) (Figura 4).

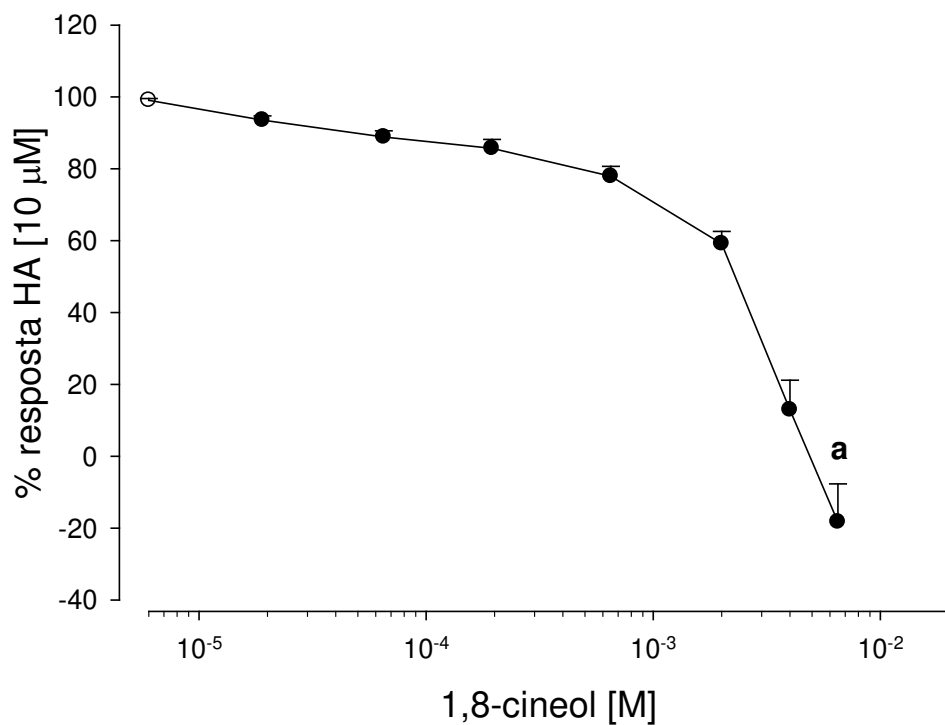


Figura 4 - Reversão pelo 1,8-cineol da resposta contrátil de anéis de traquéia de cobaias em resposta à adição de histamina. O 1,8-cineol foi adicionado cumulativamente ($6,5 \times 10^{-6}$ a $6,5 \times 10^{-3} \text{ M}$) ao ser atingido o platô da contração induzida por histamina ($10 \mu\text{M}$; $n = 7$). Dados são expressos em média \pm E.P.M. ^a $p < 0,01$, comparado com valor inicial da histamina (teste Mann-Whitney).

5.4 Efeito do 1,8-cineol e verapamil nas curvas concentração-efeito ao Ca^{2+} em traquéia isolada de cobaia mantida em meio sem Ca^{2+} na presença de acetilcolina

Em anéis de traquéia de cobaias naive mantidos em solução normal, a adição de ACh (100 μM) produziu contração cuja amplitude foi $0,62 \pm 0,05$ g ($n = 24$). Após a substituição da solução fisiológica por outra sem Ca^{2+} contendo EGTA (2 mM), a resposta contrátil da ACh foi reduzida para $0,04 \pm 0,01$ g ($n = 12$), sendo caracterizada por uma contração transitória, não sustentada com rápido retorno ao valor basal. Subsequentemente, a adição de concentrações cumulativas de Ca^{2+} (1×10^{-4} M a 2×10^{-2} M; $n = 12$) produziu contrações sustentadas de maneira concentração-dependente ($p < 0,001$, ANOVA) com valor máximo correspondente a $213,59 \pm 31,96$ % da contração de referência induzida por 60 mM de K^+ ($n = 12$), valor atingido na concentração de 2×10^{-2} M de Ca^{2+} (Figura 5). Uma nova curva concentração-efeito ao Ca^{2+} nas condições descritas acima, mas agora construída na presença de 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M; $n = 12$), mostrou não haver alteração significativa do valor máximo alcançado, que foi correspondente a $223,24 \pm 28,93$ % da contração de K^+ ($p > 0,05$). Em experimentos nos quais o verapamil (1×10^{-5} M; $n = 11$) foi usado ao invés de 1,8-cineol, a resposta máxima alcançada pela adição de Ca^{2+} (1×10^{-4} M a 2×10^{-2} M; $n = 12$) apresentou valores correspondentes a $236,28 \pm 36,75$ % da contração induzida por K^+ , sem diferença estatística em relação ao controle ($p > 0,05$) (Figura 5).

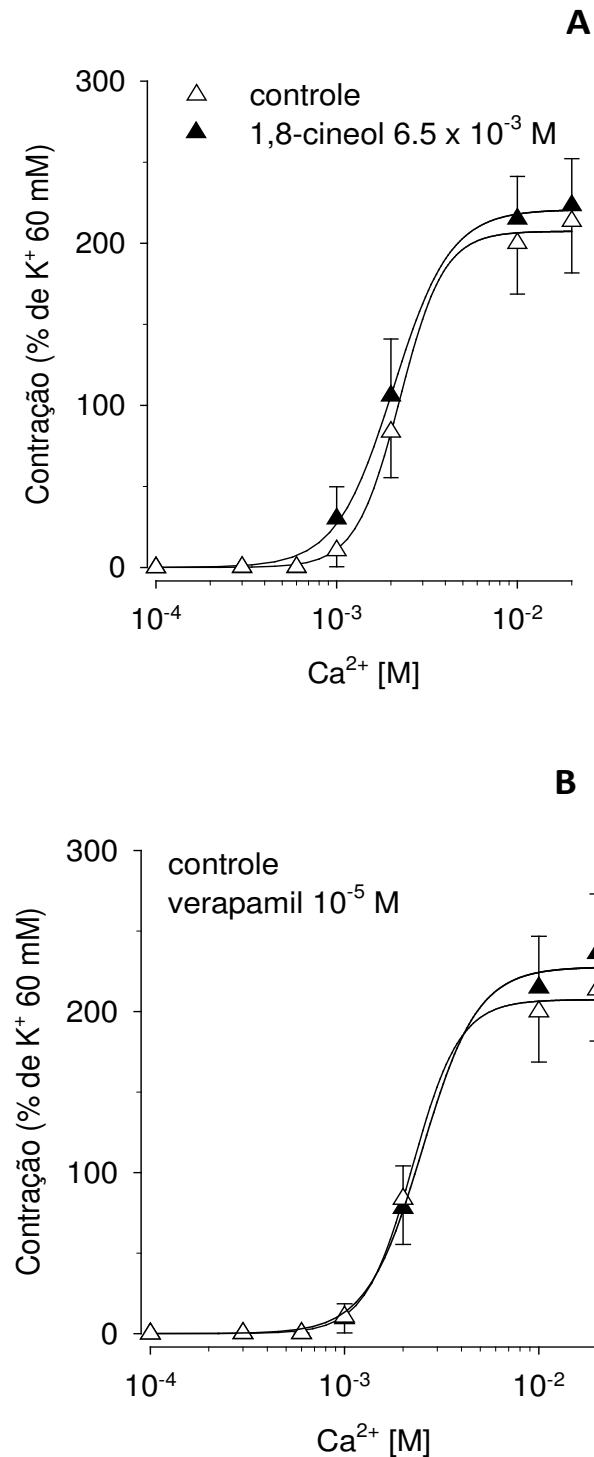


Figura 5 – Efeito do 1,8-cineol e verapamil na curva concentração efeito induzida pelo Ca^{2+} em traquéias de cobaias. O 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M; $n = 12$) e verapamil (1×10^{-5} M; $n = 11$) foram adicionados antes da confecção da curva concentração efeito induzida pelo Ca^{2+} (Figura 5A e B, respectivamente) em traquéia isolada de cobraia mantida na presença da ACh em meio sem Ca^{2+} . As traquéias isoladas foram provenientes de cobaias naive. O tempo de exposição do 1,8-cineol ou verapamil antes da adição do Ca^{2+} foi de cinco minutos. Dados são expressos em média \pm E.P.M.

5.5 Efeito do 1,8-cineol e verapamil nas curvas concentração-efeito ao Ba²⁺ em traquéia isolada de cobaia mantida em meio sem Ca²⁺ na presença de acetilcolina

Em anéis de traquéia mantidos nas mesmas condições descritas no item 5.4, a adição de concentrações cumulativas de Ba²⁺ (1×10^{-4} M a 2×10^{-2} M; $n = 4$) produziu contrações crescentes e sustentadas de maneira concentração-dependente ($p < 0,001$, ANOVA) com valor máximo correspondente a $176,32 \pm 23,76$ % da contração de referência induzida por 60 mM de K⁺ ($n = 4$), valor atingido na concentração de 2×10^{-2} M de Ba²⁺ (Figura 6). Na presença de 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M; $n = 4$), o valor máximo alcançado pela adição de Ba²⁺ foi correspondente a $7,58 \pm 4,26$ % da contração de K⁺, valor significativamente menor que aquele obtido na ausência de 1,8-cineol ($p < 0,05$, teste Holm-Sidak). Em experimentos nos quais o verapamil (1×10^{-5} M; $n = 6$) foi usado ao invés de 1,8-cineol, a resposta máxima alcançada pela adição de Ba²⁺ (1×10^{-4} M a 2×10^{-2} M) apresentou valores correspondentes a $7,73 \pm 2,06$ % da contração induzida por K⁺, valores significativamente menores que os valores observados na ausência de verapamil ($p < 0,05$, teste Holm-Sidak, $n = 6$) (Figura 6).

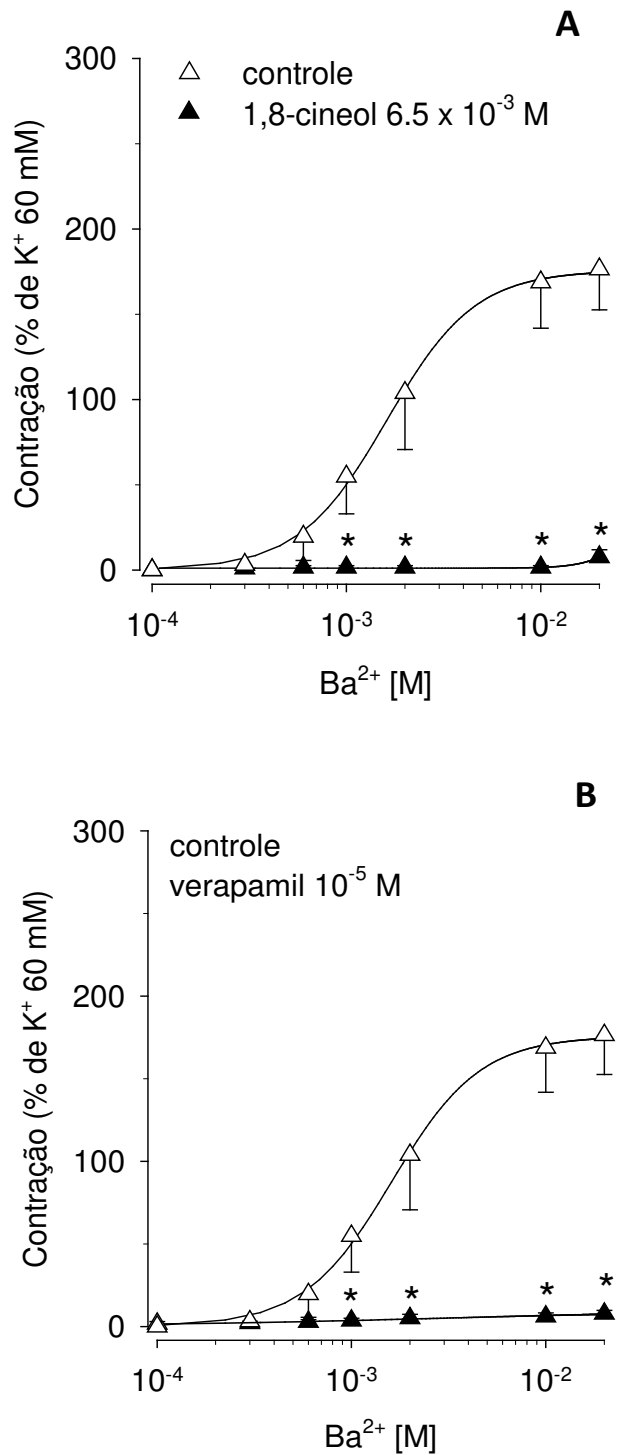


Figura 6 - Efeito do 1,8-cineol e verapamil na curva concentração efeito induzida pelo Ba^{2+} em traquéias de cobaias. O 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M; $n = 4$) e verapamil (1×10^{-5} M; $n = 6$) foram adicionados antes da confecção da curva concentração efeito induzida pelo Ba^{2+} (Figura 6A e B, respectivamente) em traquéia isolada de cobraia mantida na presença da ACh em meio sem Ca^{2+} . As traquéias isoladas foram provenientes de cobaias naive. O tempo de exposição do 1,8-cineol ou verapamil antes da adição do Ba^{2+} foi de cinco minutos. Dados são expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ em relação ao controle, teste Holm-Sidak.

5.6 Efeito do 1,8-cineol na resposta à Ovalbumina (OVA) em traquéias isoladas de cobaias sensibilizadas e desafiadas ao antígeno sensibilizante

A análise da resposta contrátil induzida por OVA foi feita em anéis de traquéia obtidos de animais sensibilizados à OVA, sacrificados 24 horas após terem sido submetidos ao desafio antigênico por inalação de solução com OVA ou apenas de solução salina. Nessas condições, a adição de OVA (10 µg/mL) produziu contrações correspondentes a $0,95 \pm 0,15$ g (n = 6) e $0,56 \pm 0,07$ g (n = 10) em tecidos obtidos de cobaias sensibilizadas desafiadas com OVA ou salina, respectivamente. A comparação estatística desses valores apresenta diferença significativa ($p < 0,05$, teste *t* de Student não pareado).

Na presença do 1,8-cineol (2×10^{-3} M ou $6,5 \times 10^{-3}$ M), a contração induzida pela OVA foi reduzida significativamente ($p < 0,05$, teste *t* de Student não pareado) apenas nas preparações obtidas de animais sensibilizados e desafiados com OVA, cujas respostas corresponderam a $0,29 \pm 0,09$ g (n = 6) e $0,24 \pm 0,04$ g (n = 5), respectivamente. Nos tecidos obtidos de animais desafiados apenas com salina, os valores da contração induzida pela OVA obtidos na presença de $6,5 \times 10^{-3}$ M de 1,8-cineol ($0,34 \pm 0,08$ g; n = 6) apresentaram tendência de serem numericamente menores, mas ainda sem diferença significativa ($p = 0,064$) (Figura 7).

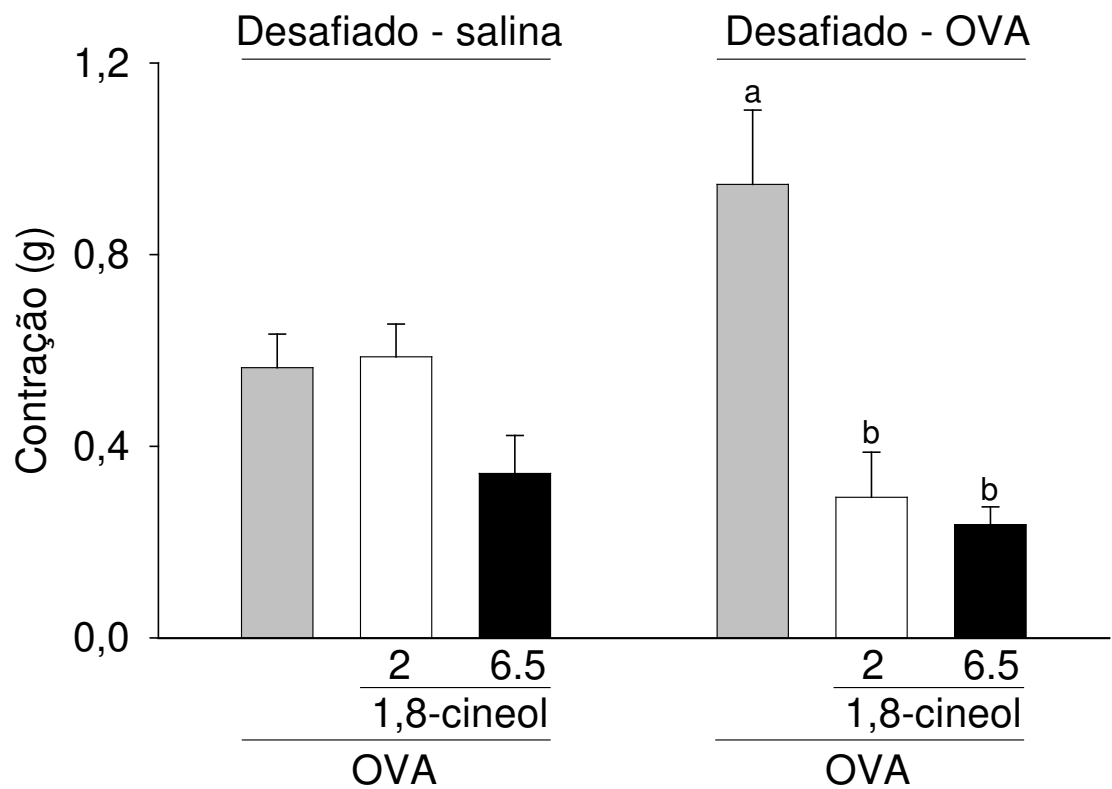


Figura 7 - Efeito do 1,8-cineol no músculo liso traqueal contraído *in vitro* com 10 µg/mL de ovalbumina (OVA). Os anéis de traquéia foram obtidos de cobaias sensibilizadas e que foram desafiadas 24 horas antes com inalação de aerossol com o antígeno sensibilizante ou com salina. Dados são expressos em média ± E.P.M. ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado com salina e ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo submetido ao desafiado com OVA (teste *t* de Student).

5.7 Análise dos efeitos do 1,8-cineol nas curvas concentração-efeito induzida por KCl em traquéias isoladas de cobaias ativamente sensibilizadas e desafiadas com salina ou com antígeno

Em anéis de traquéias de animais sensibilizados ao antígeno, as respostas contráteis traqueais foram avaliadas 24 h após o desafio com salina ou OVA. Curvas concentração-efeito foram construídas para KCl (10^{-5} a $1,2 \times 10^{-4}$ M) em anéis de traquéias dos animais sensibilizados ou desafiados na ausência de 1,8-cineol. As respostas contráteis ao KCl, em anéis de traquéias de cobaias desafiadas à OVA, foram superiores às obtidas em anéis de traquéias de cobaias desafiadas apenas com salina (controle) (Tabela 2, Figura 8A; $p < 0,01$, *two-way* ANOVA; $n = 5-8$), conforme evidenciado pela comparação de E_{\max} (Tabela 2).

Anéis traqueais de cobaias pré-tratados com 1,8-cineol (2×10^{-3} M ou $6,5 \times 10^{-3}$ M) não apresentaram hiperreatividade para KCl após o desafio com a OVA (Figura 8B-C; $n = 8-4$). Além disso, o efeito do 1,8-cineol (2×10^{-3} M) na inibição das contrações induzida por KCl foi maior no grupo de animais desafiados em relação ao sensibilizados (Figura 8B). Todavia, as contrações induzidas pelo KCl na presença do 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) em ambos os grupos, sensibilizados e desafiados, foram praticamente abolidas (Figura 8C), não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$; teste Holm-Sidak).

Curvas concentração-efeito induzidas pelo KCl (10^{-5} a $1,2 \times 10^{-4}$ M) na presença de solução com o veículo (Tween 80%), em anéis traqueais de animais controle, apresentaram resposta máxima (E_{\max}) de $132,83 \pm 14,26$ %, valor esse que não foi significativamente diferente ($p > 0,05$; teste *t* de Student; $n = 6$) dos valores com animais sensibilizados ($105,40 \pm 19,8$ %), essa ausência de significância foi também verificada pela comparação da potência [pD_2 : 1,24 (1,20 – 1,28) e 1,30 (1,15 – 1,45), respectivamente] (Tabela 2).

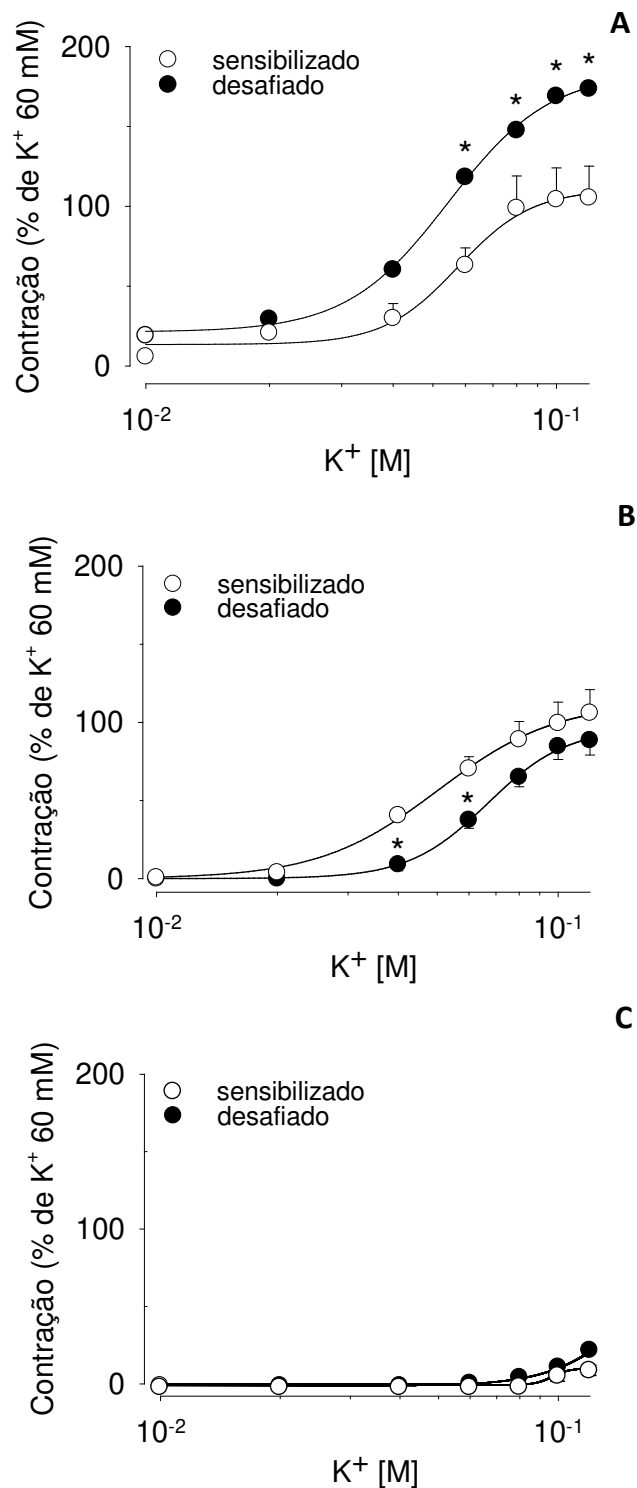


Figura 8 - Curvas concentração-efeito ao KCl (10^{-5} M a $1,2 \times 10^{-4}$ M) em traquéias isoladas de cobaias sensibilizadas e desafiadas. Figuras A-C em traquéia isolada de cobaia sensibilizada e desafiada a ovalbumina por inalação 24 h antes. Círculos brancos traquéias de animais sensibilizados e pretos de animais desafiados a ovalbumina. A figura A (n = 8-5) na ausência do 1,8-cineol, B (n = 11-8) na presença de 2×10^{-3} M e na C (n = 7-4) $6,5 \times 10^{-3}$ M. Dados são expressos em média \pm E.P.M. * p < 0,05 comparado com sensibilizado (teste Holm-Sidak).

Tabela 2 – Potência (pD₂) e valores de E_{max} das curvas concentração-efeito induzidas pelo K⁺ em traquéias obtidas de cobaias sensibilizadas ou sensibilizadas e desafiadas à ovalbumina.

	K ⁺	
	pD ₂ (n)	E _{max}
Controle		
Veículo	1,24 [1,20 - 1,28] (6)	132,8 ± 14,26
Sensibilizado	1,30 [1,15 - 1,45] (8)	105,4 ± 19,8
Desafiado	1,30 [1,17 - 1,43] (5)	173,3 ± 17,6 ^d
1,8-cineol (2 x 10⁻³ M)		
Sensibilizado	1,33 [1,24 - 1,41] (11)	106,0 ± 15,0
Desafiado	1,18 [1,13 - 1,22] ^b (8)	88,5 ± 9,3
1,8-cineol (6,5 x 10⁻³ M)		
Sensibilizado	1,02 [0,99 - 1,06] ^a (7)	10,8 ± 3,3 ^c
Desafiado	0,74 [-0,20 - 3,67] (4)	22,7 ± 9,3

^a p < 0,05, em relação ao controle sensibilizado, teste *t* de Student não-pareado;

^b p < 0,05, em relação ao sensibilizado submetidos ao mesmo tratamento, teste *t* de Student não-pareado;

^c p < 0,05, em relação ao controle sensibilizado, teste Holm-Sidak;

^d p < 0,05, em relação ao controle sensibilizado, teste Holm-Sidak;

pD₂ valores expressos como logaritmo negativo da metade da concentração molar efetiva máxima (CE₅₀), em mol/L; Dados são expressos em média e IC

E_{max} valores de contrações induzidas por K⁺ expressas como % da contração inicial induzida por K⁺ 60 mM. Dados são expressos em média ± E.P.M.

5.8 Análise dos efeitos do 1,8-cineol nas curvas concentração-efeito induzidas por CCh em traquéias isoladas de cobaias ativamente sensibilizadas e desafiadas com salina ou com antígeno

Em anéis de traquéias de animais sensibilizados ao antígeno, as respostas contráteis traqueais foram avaliadas 24 h após o desafio com salina ou OVA. Curvas concentração-efeito foram construídas para CCh (10^{-9} a 10^{-4} M) em anéis de traquéias dos animais sensibilizados ou desafiados na ausência de 1,8-cineol. As respostas contráteis ao CCh, nos anéis de traquéias de cobaias desafiadas à OVA, foram superiores às obtidas em anéis de traquéias de cobaias desafiadas apenas com salina (controle) (Figura 9A-B; $p < 0,001$, *two-way* ANOVA; $n = 7-11$), conforme evidenciado pela comparação de E_{max} (Tabela 3).

Anéis traqueais de cobaias pré-tratados com 1,8-cineol (2×10^{-3} M ou $6,5 \times 10^{-3}$ M) não apresentaram hiperreatividade para CCh após o desafio com a OVA (Figura 9B-C; $n = 7-8$). Além disso, o efeito do 1,8-cineol na inibição das contrações induzidas pelo CCh foi maior no grupo de animais desafiado do que no grupo sensibilizado, porque as curvas concentração-efeito nos anéis de traquéias de animais desafiados foram significativamente deslocadas para a direita ($p < 0,05$, teste Holm-Sidak).

O efeito do 1,8-cineol na inibição das contrações induzida por CCh foi significativamente maior no grupo de animais desafiados em relação ao sensibilizados (Figura 9B-C; $p < 0,05$, teste Holm-Sidak, $n = 7-11$). Todavia, as contrações induzidas pelo CCh foram apenas ligeiramente reduzidas (Tabela 3; $p > 0,05$; teste Holm-Sidak), mesmo na presença de $6,5 \times 10^{-3}$ M de 1,8-cineol, concentração capaz de praticamente abolir a resposta contrátil induzida por KCl em ambos os grupos, sensibilizados e desafiados. Vale destacar aqui a significativa maior resposta máxima obtida pelo CCh nos tecidos provenientes de animais sensibilizados na presença do 1,8-cineol (2×10^{-3} M) (Tabela 3).

Curvas concentração-efeito induzidas pelo CCh (10^{-9} a 10^{-4} M) na presença de solução com o veículo (Tween 80%), em anéis de traqueais de animais controle, apresentaram resposta máxima (E_{max}) de $173,15 \pm 34,06$ %, valor esse que não foi diferente significativa ($p > 0,05$; teste *t* de Student; $n = 6$) nos animais sensibilizados ($170,40 \pm 16,80$ %), essa ausência de significância foi também verificada no [pD₂: 6,31 (5,79 – 6,83) e 6,07 (5,85 – 6,30), respectivamente] (Tabela 3).

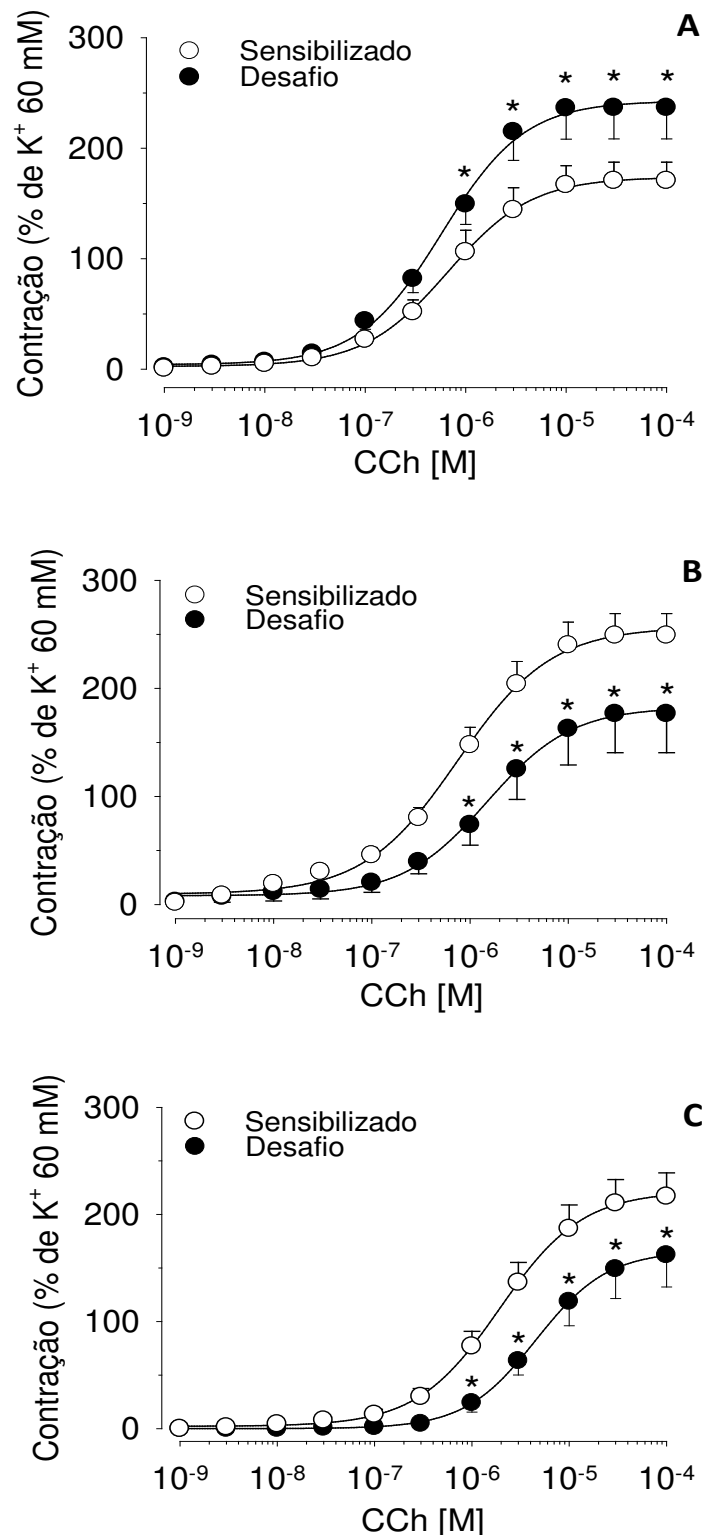


Figura 9 - Curvas concentração-efeito ao CCh (10^{-9} a 10^{-4} M) em traquéias isoladas de cobaias sensibilizadas e desafiadas. Figuras A-C em traquéia isolada de cobraia sensibilizada e desafiada a ovalbumina por inalação 24 h antes. Círculos brancos traquéias de animais sensibilizados e pretos de animais desafiados a ovalbumina. A figura A ($n = 11-7$) na ausência do 1,8-cineol, B ($n = 11-7$) na presença de 2×10^{-3} M e na C ($n = 112-8$) $6,5 \times 10^{-3}$ M. Dados são expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ comparado com sensibilizado (teste Holm-Sidak).

Tabela 3 - Potência (pD₂) e valores de E_{max} das curvas concentração-efeito induzidas pelo CCh em traquéias obtidas de cobaias sensibilizadas ou sensibilizadas e desafiadas à ovalbumina.

	CCh	
	pD ₂ (n)	E _{max}
Controle		
Veículo	6,31 [5,79 – 6,83] (5)	173,1 ± 34,1
Sensibilizado	6,07 [5,85 – 6,30] (11)	170,4 ± 16,8
Desafiado	6,22 [6,10 – 6,35] (7)	236,6 ± 28,3 ^d
1,8-cineol (2 x 10⁻³ M)		
Sensibilizado	6,12 [5,97 – 6,23] (11)	249,1 ± 20,1 ^c
Desafiado	5,73 [5,52 – 5,94] ^b (7)	175,5 ± 35,9 ^d
1,8-cineol (6,5 x 10⁻³ M)		
Sensibilizado	5,67 [5,52 – 5,82] ^a (12)	216,9 ± 22,0
Desafiado	5,34 [5,19 – 5,49] ^b (8)	162,0 ± 29,8 ^d

^a p < 0,05, em relação ao controle sensibilizado, teste *t* de Student não-pareado;

^b p < 0,05, em relação ao sensibilizado submetidos ao mesmo tratamento, teste *t* de Student não-pareado;

^c p < 0,05, em relação ao controle sensibilizado, teste Holm-Sidak;

^d p < 0,05, em relação ao sensibilizado submetido ao mesmo tratamento, teste Holm-Sidak;

pD₂ valores expressos como logaritmo negativo da metade da concentração molar efetiva máxima (CE₅₀), em mol/L; Dados são expressos em média e IC

E_{max} valores de contrações induzidas por CCh expressas como % da contração inicial induzida por K⁺ 60 mM. Dados são expressos em média ± E.P.M.

5.9 Análise da Curva concentração-efeito ao CCh em cobaias sensibilizadas e desafiadas ao antígeno, após inalação de solução contendo 1,8-cineol

Na tentativa de verificar a interferência do 1,8-cineol in vivo, os animais foram submetidos à inalação de solução contendo 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) por 15 min. Após breve período de repouso (~ 3min), nova sessão de inalação foi realizada, dessa vez com os animais sendo submetidos, conforme procedimento já descrito, ao desafio antigênico ou à solução salina. Após 24 h, os animais foram eutanizados e CCE foram confeccionadas ao CCh, usado nas mesmas concentrações anteriores (10^{-9} a 10^{-4} M). Verificamos um padrão de respostas ao CCh semelhante ao encontrado em tecidos de animais sensibilizados ou desafiados, nos quais o 1,8-cineol foi adicionado apenas diretamente na cuba na ocasião da realização dos experimentos. Na figura 10, podemos verificar que em tecidos de animais desafiados que apenas inalaram 1,8-cineol, o CCh produziu efeito máximo ($125,37 \pm 21,22$ % da contração K^+ ; $n = 7$) significativamente reduzido ($p < 0,05$, teste Holm-Sidak) em relação ao efeito máximo do animal sensibilizado ($244,73 \pm 47,78$ % da contração K^+ ; $n = 7$). Os valores de pD_2 no grupo sensibilizado foi de 6,66 [6,33 – 6,99] e no desafiado de 6,21[5,80 – 6,62], valores esses significativamente diferentes ($p < 0,05$, teste Holm-Sidak).

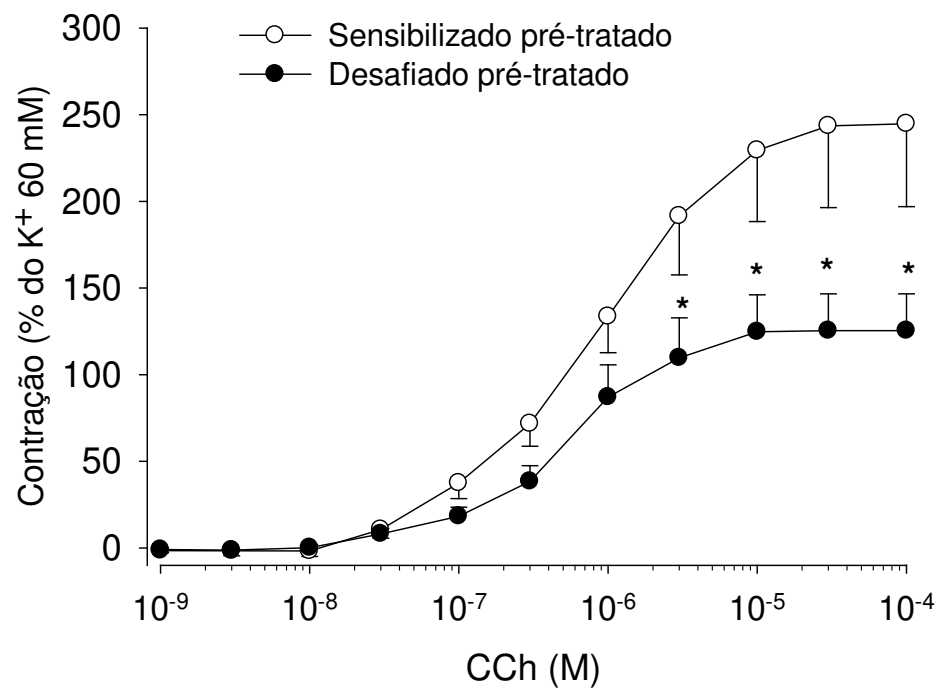


Figura 10 – Curva concentração efeito ao CCh (10^{-9} a 10^{-4} M) em traquéia isolada de cobaias sensibilizadas e desafiadas submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol. Os animais sensibilizados ($n = 7$) ou sensibilizados e desafiados ($n = 7$) foram pré-tratados com 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) por inalação 24 h antes da eutanização. Dados são expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ comparado com sensibilizado pré-tratado (test Holm-Sidak).

5.10 Análise dos efeitos do 1,8-cineol no Transporte Mucociliar (TMC) de cobaias anestesiadas ativamente sensibilizadas e desafiadas ao antígeno

Avaliado pela distância percorrida pelo marcador adicionado à luz traqueal de animal anestesiado, o transporte mucociliar (TMC) no grupo de animais naive correspondeu a $0,68 \pm 0,07$ cm ($n = 6$), enquanto que em cobaias sensibilizadas esse parâmetro foi de $0,72 \pm 0,12$ cm ($n = 7$). Esses valores não apresentaram diferença significativa ($p = 0,769$, teste Holm-Sidak).

A um grupo separado de cobaias foi realizada a inalação de solução contendo 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M; por 15 min) seguida de inalação de solução salina ou de solução com o antígeno sensibilizante (OVA). Após 24h da inalação, esses animais foram submetidos ao procedimento para avaliação do TMC, que correspondeu a $0,88 \pm 0,09$ cm em animais controle (naive que inalaram 1,8-cineol; $n = 6$) e $0,83 \pm 0,07$ cm em animais sensibilizados ($n = 6$). Esses valores também não apresentaram diferença significativa ($p = 0,689$, teste Holm-Sidak).

No grupo de animais sensibilizados e submetidos ao desafio antigênico, o TMC foi reduzido para $0,26 \pm 0,06$ cm ($n = 6$), valor significativamente menor que o observado nos animais sensibilizados ($p < 0,01$, teste Holm-Sidak). A prévia inalação ao 1,8-cineol, seguida do desafio antigênico, aumentou o TMC para $0,50 \pm 0,08$ cm ($n = 4$), sendo esse resultado significativo em relação aos animais desafiados que não inalaram o 1,8-cineol ($p < 0,05$, teste Holm-Sidak). Importante notar que o TMC obtido nas cobaias desafiadas submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol não foi diferente estatisticamente do obtido com os animais naive sem o pré-tratamento ($0,68 \pm 0,07$ cm, $n = 6$) (Figura 11).

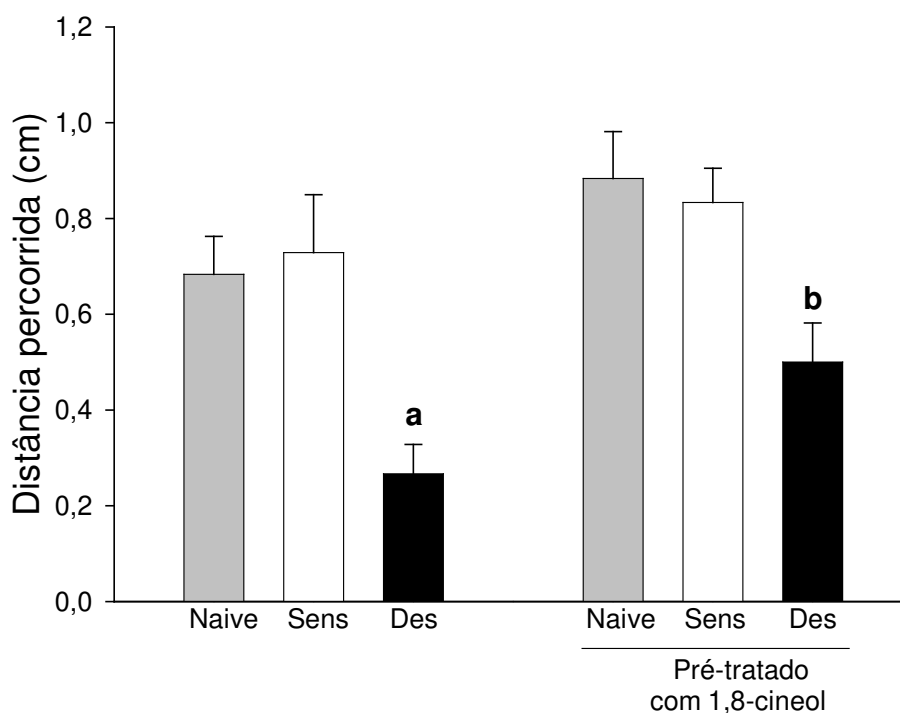


Figura 11 - Efeito do pré-tratamento com 1,8-cineol no transporte mucociliar em cobaias naive, sensibilizadas ou desafiadas à ovalbumina (OVA). Gráfico da distância percorrida pelo marcador (azul de metileno) instilado na luz da traquéia de cobaias anestesiadas naive ($n = 6-6$), sensibilizadas ($n = 7-6$) ou sensibilizadas e desafiadas ($n = 6-4$) ao antígeno sensibilizante (OVA), submetidas ou não à inalação de solução contendo 1,8-cineol, respectivamente. Os animais desafiados foram submetidos à inalação de OVA. Os animais naive inalaram solução salina. A inalação de 1,8-cineol por 15 min sempre foi feita antes do desafio antigênico. Dados são expressos em média \pm E.P.M. ^a $p < 0,01$ em relação ao grupo naive e sensibilizado e ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo submetido ao pré-tratamento (naive e sensibilizado) e desafio sem pré-tratamento, teste Holm-Sidak.

5.11 Efeito do 1,8-cineol sobre o dano epitelial provocado pelo desafio antigênico por inalação em traquéias de cobaias ativamente sensibilizadas ao antígeno

A análise microscópica do tecido epitelial da traquéia de cobaias sensibilizadas à OVA mostrou que o desafio antigênico por inalação de ovalbumina causa dano epitelial moderado. Nesses animais foram evidentes os sinais de dano epitelial, como: ingurgitamento vascular moderado; áreas de descamação moderada do epitélio; infiltrado celular moderado, com predomínio de eosinófilos; presença de edema e de eventuais alterações da mucosa, cujo o valor mediano dos escores correspondeu a 3 ([3 - 4]; n = 9; Tabela 4, Figura 12). Esses valores foram significativamente aumentados ($p < 0,001$, teste Mann-Whitney) em relação aos atribuídos para os animais naive ou animais sensibilizados, que corresponderam a 0 [0 - 1] (n = 8) e 0 [0 - 2] (n = 5), respectivamente. Não foi evidenciada diferença significativa entre os grupos de animais naive e sensibilizados.

No grupo de animais naive e sensibilizados que foram submetidos ao pré-tratamento com 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) não ocorreu diferença significativa entre esses grupos no dano epitelial. A mediana dos escores atribuídos corresponderam a 0 [0 - 1] (n = 8) em animais naive e 0 [0 - 2] (n = 8), em animais sensibilizados. Apesar de não terem sido diferentes entre si ($p > 0,05$, teste *t* de Student), esses valores não diferiram significativamente ($p > 0,05$, teste Mann-Whitney) daqueles valores vistos em animais naive e sensibilizados, mas que não inalaram o 1,8-cineol. Por outro lado, a prévia inalação do 1,8-cineol reduziu significativamente o dano epitelial observado em animais desafiados ao antígeno, cujos escores corresponderam a 2 [2 - 3] (n = 9), significativamente diferentes dos observados em animais que não inalaram 1,8-cineol (Figura 12).

Tabela 4 - Efeito do pré-tratamento por inalação de 1,8-cineol no dano epitelial traqueal provocado pelo desafio antigênico em cobaias sensibilizadas à ovalbumina.

	Pré-tratamento com 1,8-cineol	
Naive	0 [0 - 1] (8)	0 [0 - 1] (8)
Sensibilizado	0 [0 - 2] (5)	0 [0 - 2] (8)
Desafiado	3 [3 - 4] ^{a, b} (9)	2 [2 - 3] ^c (9)

Os animais desafiados foram submetidos à inalação de OVA. Os animais naive inalaram solução fisiológica, para o grupo pré-tratado com 1,8-cineol a inalação foi feita antes do antígeno. Dados apresentados em mediana valores extremos do rol de dados. ^a p<0,01 em relação ao grupo sensibilizado, ^b p<0,001 em relação ao grupo naive e ^c p < 0,05 em relação ao grupo submetido ao pré-tratado (naive e sensibilizado) e desafiado (teste *t* de Student e Mann-Whitney).

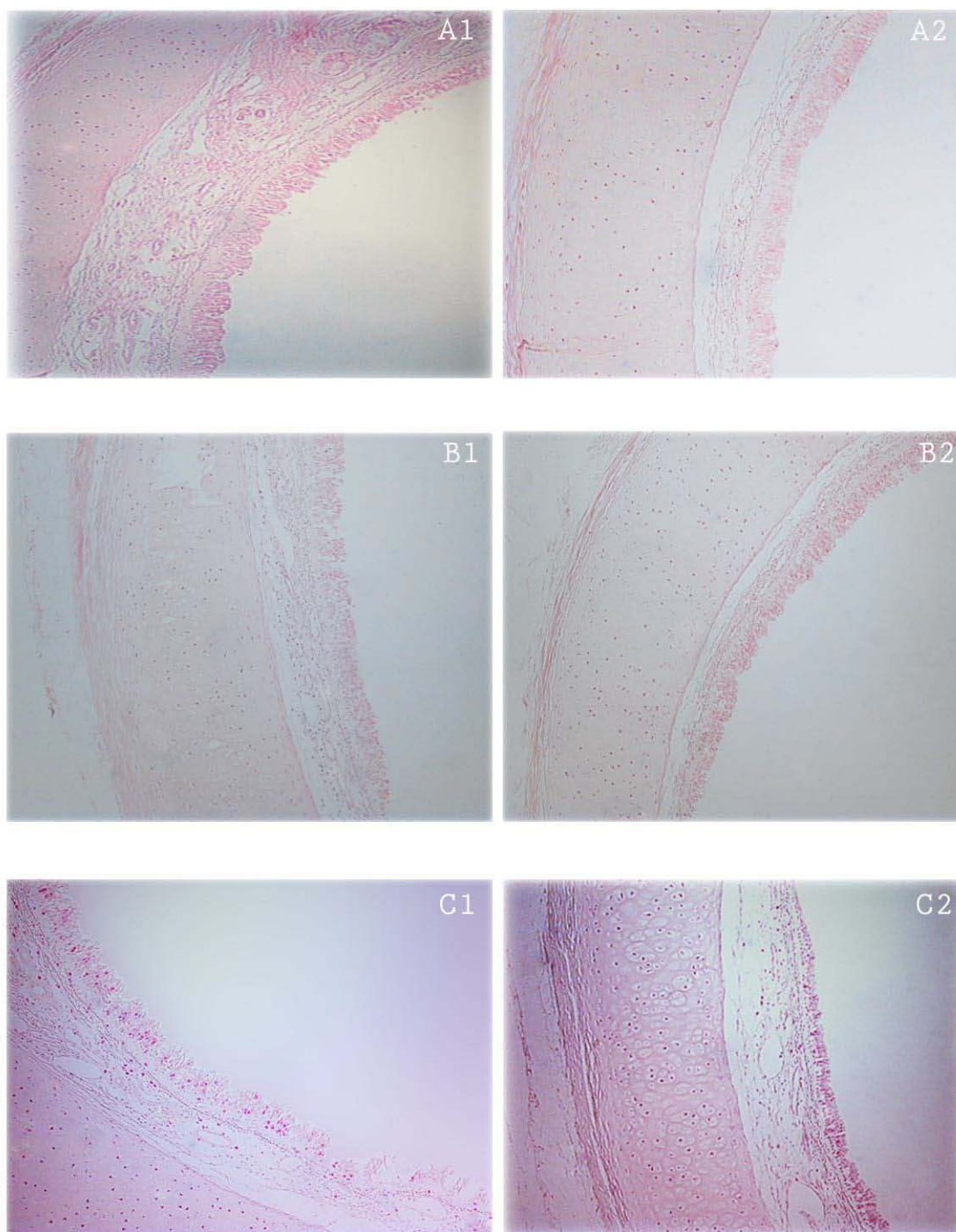


Figura 12: Fotomicrografia de segmentos do tecido traqueal de cobaias naive, sensibilizadas ou desafiadas à ovalbumina (OVA) submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol. A figura A ilustra o tecido de traquéia de cobaias naive com escore 0 antes (A1) e depois do pré-tratamento com 1,8-cineol (A2). A figura B de tecido traqueal de cobaias sensibilizadas antes (B1) e após o pré-tratamento com 1,8-cineol (B2) com escore 0 em ambas. A figura C ilustra o tecido de traquéia do grupo de animais desafiados antes (C1) e após o pré-tratamento com 1,8-cineol (C2) com escore 3 e 2 respectivamente.

5.12 Efeito do 1,8-cineol na migração de células inflamatórias no lavado bronco-alveolar de cobaias desafiadas à ovalbumina

Na análise dos efeitos do 1,8-cineol na migração de células inflamatórias nas vias aéreas de cobaias, evidenciamos que não houve diferença significativa ($p < 0,703$, ANOVA) entre o grupo de animais naive e o grupo de animais sensibilizados em relação à contagem total [Naive: $3,44 \pm 0,43$ ($\times 10^3$ células/mm³; $n = 9$); SENS: $3,23 \pm 0,34$ ($\times 10^3$ células/mm³; $n = 12$)] das células inflamatórias (Figura 13), ou na contagem diferencial (Tabela 5). No grupo de animais desafiados observamos aumento significativo ($p < 0,05$) na quantidade de células totais [DES: $10,94 \pm 1,45$ ($\times 10^3$ células/mm³, $n = 8$)] presentes no lavado bronco-alveolar (LBA), que foi produzido principalmente pela maior presença de neutrófilos e eosinófilos cujos incrementos no lavado bronco-alveolar foram da ordem de 925% e 621% dos valores encontrados nos animais sensibilizados (DES: $1,85 \pm 0,38$ e $4,35 \pm 0,42$; $n = 8$, respectivamente) (Tabela 5). Esses valores foram significativamente maiores ($p < 0,001$) do que os valores do grupo de animais sensibilizados.

O pré-tratamento dos animais com 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) por via inalatória, reduziu significativamente ($p < 0,05$, teste Holm-Sidak) o número de células inflamatórias no LBA de $10,94 \pm 1,45$ ($\times 10^3$ células/mm³; $n = 8$) para $6,82 \pm 0,65$ ($\times 10^3$ células/mm³; $n = 8$) nos animais submetidos ao desafio antigênico. Embora essa redução tenha sido significativa, a contagem total de células inflamatórias no LBA de animais tratados com 1,8-cineol e desafiados foi significativamente maior ($p < 0,05$ teste Dunn's) do que os valores observados nos animais naive ou sensibilizados pré-tratados [$2,93 \pm 0,18$ ($\times 10^3$ células /mm³; $n = 6$) e $4,11 \pm 0,29$ ($\times 10^3$ células /mm³; $n = 6$, respectivamente)] (Tabela 5). Na contagem diferencial no LBA do material proveniente de animais desafiados previamente submetidos ao tratamento com 1,8-cineol evidenciamos redução significativa do número de eosinófilos [$2,30 \pm 0,31$ ($\times 10^3$ células /mm³, $n = 8$); $p < 0,01$; teste Holm-Sidak; Tabela 5] e do número de neutrófilos [$0,91 \pm 0,14$ ($\times 10^3$ células /mm³; $n = 8$); $p < 0,05$; teste Dunn's; Tabela 5] com relação ao grupo desafiado não tratado pelo 1,8-cineol ($4,35 \pm 0,42$ e $1,85 \pm 0,38$; $n = 8$, respectivamente).

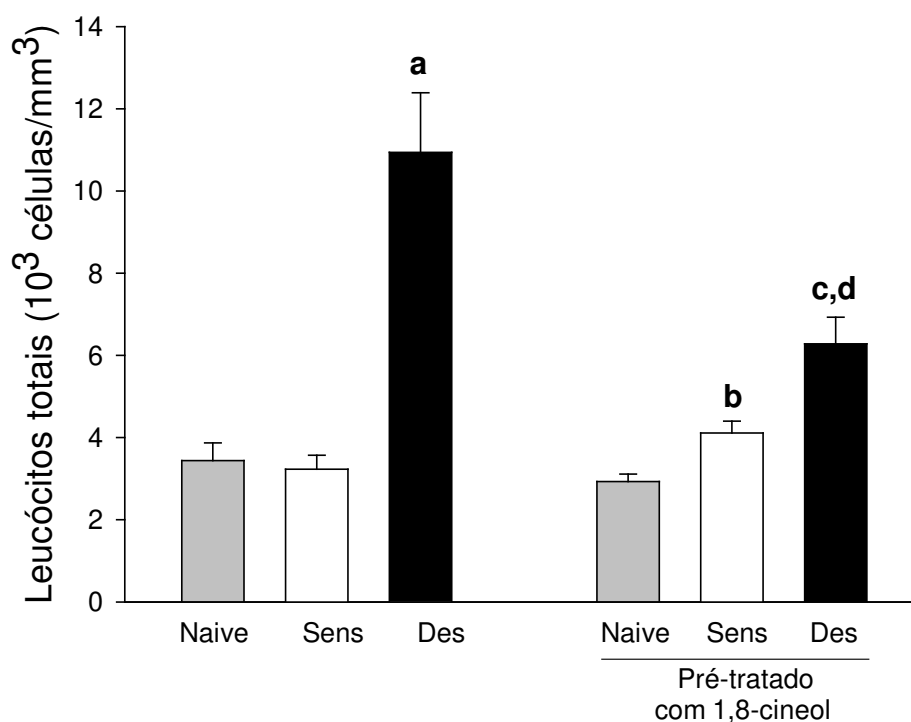


Figura 13 - Efeito do pré-tratamento com 1,8-cineol na resposta migratória de células inflamatórias em cobaias desafiadas à ovalbumina (OVA). Os grupos foram formados por animais naive (n = 9-6), sensibilizados (n = 12-6) e desafiados (n = 8-6) sem ou com pré-tratamento com 1,8-cineol, respectivamente. Os animais desafiados foram submetidos à inalação de OVA. Os animais naive inalaram solução fisiológica, para o grupo pré-tratado com 1,8-cineol a inalação foi feita antes do antígeno. Dados são expressos em média \pm E.P.M. ^a p < 0,05 em relação ao grupo naive e sensibilizado (teste Dunn's). ^b p < 0,01 em relação ao grupo ao naive pré-tratado (teste Holm-Sidak) ^c p < 0,05 em relação ao grupo naive e sensibilizado submetido ao pré-tratamento (teste Dunn's) e ^d p < 0,05 em relação ao grupo ao desafiado (teste Holm-Sidak).

Tabela 5 - Efeito do pré-tratamento com 1,8-cineol em animais desafiados antígenicamente sobre a contagem diferencial de células (macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos) presentes no lavado broncoalveolar de cobaias.

GRUPO	Células totais	Eosinófilo	Macrófagos	Neutrófilos	Linfócitos	N
Naive	3,44 (0,43)	1,01 (0,18)	1,22 (0,16)	0,22 (0,04)	0,92 (0,16)	9
Sensib	3,23 (0,34)	0,70 (0,18)	1,53 (0,17)	0,20 (0,05)	0,82 (0,12)	12
Desafiado	10,94 ^a (1,45)	4,35 ^a (0,42)	3,38 ^a (0,69)	1,85 ^a (0,38)	1,37 ^b (0,22)	8
Naive Pré-tratado	2,93 (0,18)	0,54 (0,11)	1,50 (0,19)	0,20 (0,03)	0,67 (0,10)	6
Sensib Pré-tratado	4,11 (0,29)	1,00 (0,29)	1,63 (0,08)	0,58 (0,11)	0,91 (0,09)	6
Desafiado Pré-tratado	6,82 ^{d, f, g} (0,65)	2,30 ^{c, e, f} (0,31)	2,42 ^c (0,33)	0,91 ^{d, f} (0,14)	1,18 ^h (0,15)	8

Os animais desafiados foram submetidos à inalação de OVA. Os animais naive inalaram solução fisiológica, para o grupo pré-tratado com 1,8-cineol a inalação foi feita antes do antígeno. Dados são expressos em média \pm E.P.M. ($\times 10^3$ leucócitos /mm³). ^a p < 0,05 em relação ao grupo naive e sensibilizado, ^b p < 0,05 em relação ao grupo sensibilizado ^c p < 0,05 em relação ao grupo naive e sensibilizado submetido ao pré-tratamento ^d p < 0,05 em relação ao grupo ao desafiado, ^e p < 0,01 com relação ao desafiado, ^f p < 0,001 com relação ao naive pré-tratado, ^g p < 0,01 com relação ao sensibilizado pré-tratado e ^h p < 0,05 com relação ao naive pré-tratado (teste Dunn's, Holm-Sidak e Mann-Whitney).

5.13 Efeito do 1,8-cineol sobre os níveis de IL-1, IL-10 e TNF- α no lavado broncoalveolar de cobaias ativamente desafiadas ao antígeno

Os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α no LBA, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$, teste Holm-Sidak) entre os grupos de animais naive ($n = 8$) e sensibilizados ($n = 6$), essa ausência de significância nos níveis dessas citocinas também foi evidenciada quando submetidos, os animais naive ($n = 7$) e sensibilizados ($n = 8$), ao pré-tratamento com 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M).

O grupo de animais desafiados apresentou aumento significativo dos níveis de IL-1 (pg/mL: $540,73 \pm 55,07$, $n = 6$; $p < 0,01$, teste Holm-Sidak) e de TNF- α (pg/mL: $324,13 \pm 11,75$, $n = 6$; $p < 0,001$, teste Holm-Sidak) com relação ao grupo de animais sensibilizados (pg/mL: IL-1 $280,30 \pm 50,31$; TNF- α $188,06 \pm 19,69$, $n = 6$) (Figura 14 e 15).

Quando esse grupo de animais desafiados foi submetido ao pré-tratamento com 1,8-cineol apresentou redução significativa das concentrações de IL-1 (pg/mL: $338,64 \pm 46,69$, $n = 10$; $p < 0,05$, teste Holm-Sidak) e TNF- α (pg/mL: $223,27 \pm 17,61$, $n = 10$; $p < 0,01$, teste Holm-Sidak), com relação ao grupo de animais desafiados que não recebeu o pré-tratamento com 1,8-cineol (pg/mL: IL-1 $540,73 \pm 55,07$, $n = 6$; TNF- α : $324,13 \pm 11,75$, $n = 6$). Os valores obtidos dos animais desafiados e sensibilizados pré-tratados ($n = 8$) com 1,8-cineol não diferiram entre si.

Os níveis da interleucina anti-inflamatória IL-10 não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$, ANOVA) entre os grupos de animais naive ($n = 4$) e sensibilizados ($n = 4$). A concentração dessa interleucina foi significativamente menor (pg/mL: $665,07 \pm 189,51$; $n = 7$; $p < 0,001$, teste Holm-Sidak) no grupo de animais desafiados do que nos animais sensibilizados. Essa diferença estatística não foi evidenciada ($p > 0,05$, ANOVA) quando realizado o pré-tratamento com 1,8-cineol nos grupos de animais sensibilizado ($n = 5$) e desafiado ($n = 11$). Porém, o grupo de animais naive e sensibilizado submetidos ao pré-tratamento apresentaram diferença significativa (pg/mL: $1842,88 \pm 72,28$, $n = 6$; $1507,66 \pm 70,45$, $n = 5$; $p < 0,05$, teste Holm-Sidak, respectivamente).

O pré-tratamento com 1,8-cineol nos animais desafiados ($n = 11$) foi capaz de aumentar significativamente ($p < 0,05$, teste Dunn's) a concentração da IL-10 para $1314,04 \pm 59,54$ pg/mL, com relação ao grupo de animais desafiados não submetidos ao

tratamento prévio com 1,8-cineol, porém com ausência de significância em relação ao grupo sensibilizado pré-tratado ($p > 0,05$, ANOVA) (Gráfico 16).

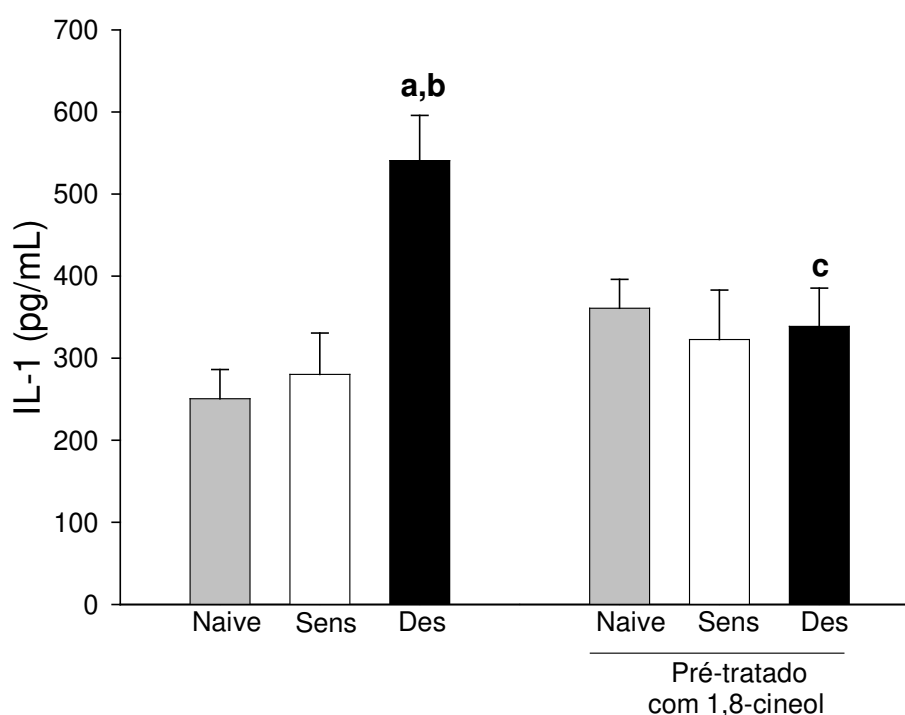


Figura 14 - Efeito do pré-tratamento com 1,8-cineol nos níveis de IL-1 (pg/mL) no lavado bronco-alveolar de cobaias desafiadas à ovalbumina (OVA). Os grupos foram formados por animais naive ($n = 8-7$), sensibilizados ($n = 6-8$) e desafiados ($n = 6-6$) sem ou com pré-tratamento com 1,8-cineol, respectivamente. Os animais desafiados foram submetidos à inalação de OVA. Os animais naive inalaram solução fisiológica, para o grupo pré-tratado com 1,8-cineol a inalação foi feita antes do antígeno. Dados são expressos em média \pm E.P.M. ^a $p < 0,01$ em relação ao grupo sensibilizado ^b $p < 0,001$ em relação ao grupo naive ^c $p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado sem pré-tratamento (teste Holm-Sidak).

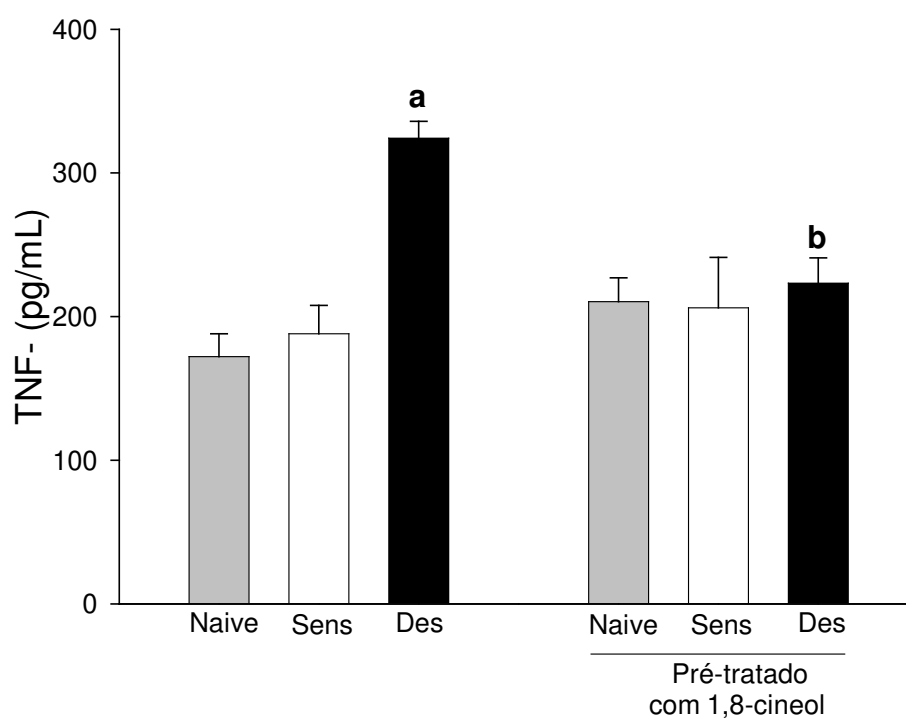


Figura 15 - Efeito do pré-tratamento com 1,8-cineol no níveis de TNF- α (pg/mL) no lavado bronco-alveolar de cobaias desafiadas à ovalbumina (OVA). Os grupos foram formados por animais naive (n = 8-7), sensibilizados (n = 6-8) e desafiados (n = 6-6) sem ou com pré-tratamento com 1,8-cineol, respectivamente. Os animais desafiados foram submetidos à inalação de OVA. Os animais naive inalaram solução fisiológica, para o grupo pré-tratado com 1,8-cineol a inalação foi feita antes do antígeno. Dados são expressos em média \pm E.P.M. ^a p < 0,001 em relação ao grupo naive e sensibilizado ^b p < 0,05 em relação ao grupo desafiado sem pré-tratamento (teste Holm-Sidak).

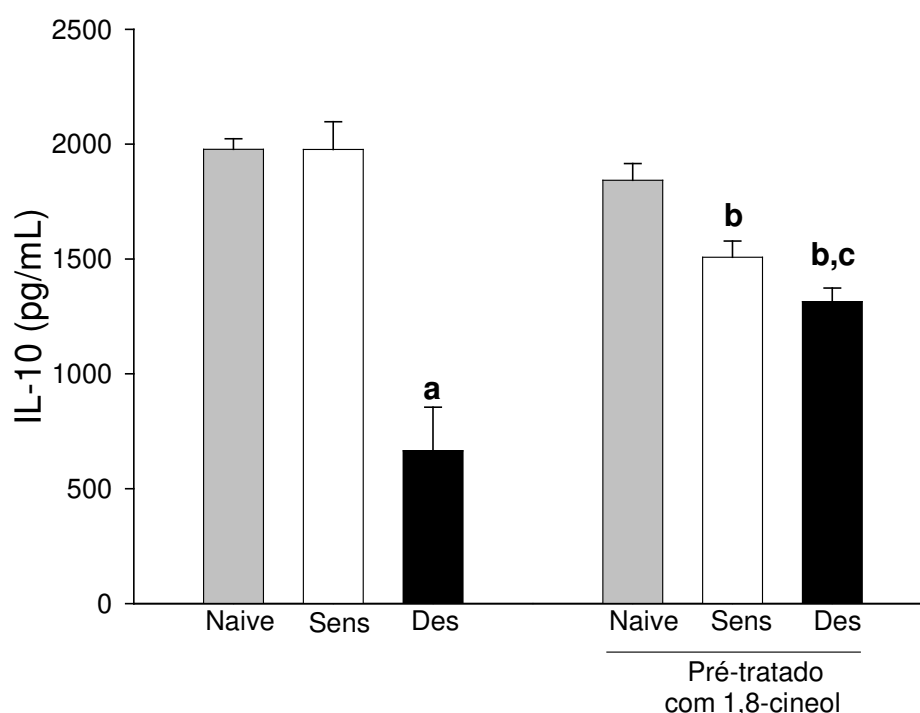


Figura 16 - Efeito do pré-tratamento com 1,8-cineol nos níveis de IL-10 (pg/mL) no lavado bronco-alveolar de cobaias desafiadas à ovalbumina (OVA). Os grupos foram formados por animais naive (n = 4-6), sensibilizados (n = 4-5) e desafiados (n = 7-11) sem ou com pré-tratamento com 1,8-cineol, respectivamente. Os animais desafiados (Des) foram submetidos à inalação de OVA, enquanto que os animais naive e sensibilizados (Sens) inalaram apenas solução fisiológica. Para o grupo pré-tratado com 1,8-cineol, a inalação de OVA (Des) ou salina foi precedida por período de 15 min com inalação de solução com $6,5 \times 10^{-3}$ M de 1,8-cineol. Dados são expressos em média \pm E.P.M. ^a p < 0,001 em relação ao grupo sensibilizado, teste t de Student; ^b p < 0,05 em relação ao grupo naive pré-tratado, teste t de Student; ^c p < 0,05 em relação ao grupo desafiado sem pré-tratamento (teste Holm-Sidak e Dunn's).

5.14 Efeito do 1,8-cineol sobre a atividade da enzima mieloperoxidase no lavado bronco-alveolar de cobaias ativamente desafiadas ao antígeno

A atividade da mieloperoxidase no LBA do grupo de animais naive ($n = 3$) e sensibilizados ($n = 4$) não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$, teste t de Student). No grupo de animais desafiados (U/mL: $6,27 \pm 0,97$, $n = 3$) a atividade da mieloperoxidase foi significativamente aumentada ($p < 0,05$, teste Mann-Whitney) com relação ao grupo sensibilizado (U/mL: $0,55 \pm 0,22$). Após o pré-tratamento por via inalatória com 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M), a atividade da mieloperoxidase foi estatisticamente reduzida ($p < 0,05$, teste Holm-Sidak) no grupo de animais desafiados submetido ao pré-tratamento (U/mL: $3,38 \pm 0,55$, $n = 8$) em relação ao grupo de animais desafiados não pré-tratados, mas com valor ainda significativamente maior ($p < 0,05$, teste Holm-Sidak) do que nos animais sensibilizados pré-tratados com 1,8-cineol (U/mL: $1,38 \pm 0,51$, $n = 5$) (Figura 17).

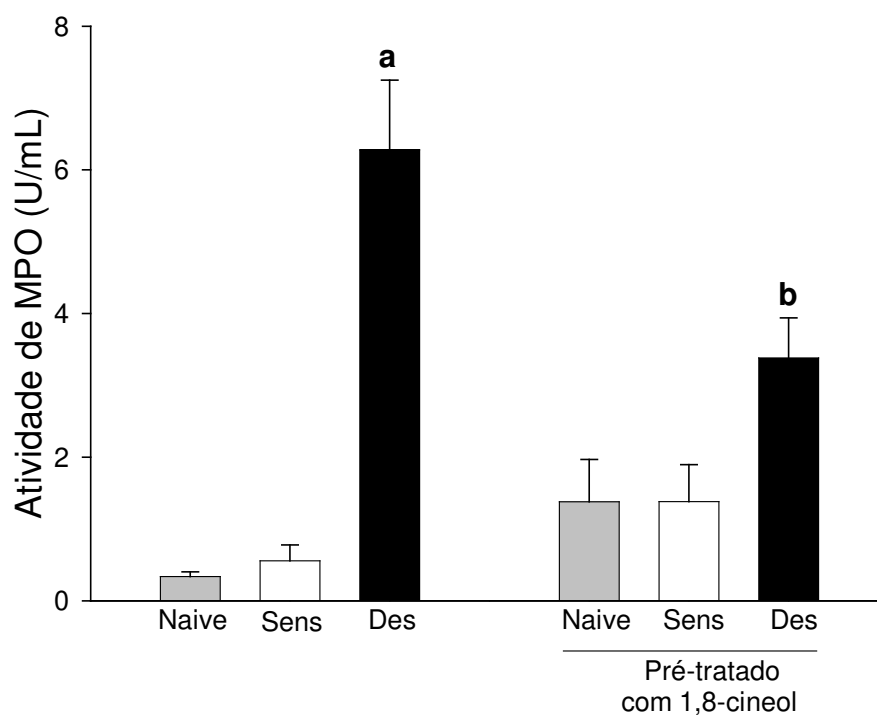


Figura 17 - Efeito do pré-tratamento com 1,8-cineol na Atividade de MPO (U/mL) no lavado bronco-alveolar de cobaias desafiadas à ovalbumina (OVA). Os grupos foram formados por animais naive (n = 3-6), sensibilizados (n = 4-5) e desafiados (n = 3-8) sem ou com pré-tratamento com 1,8-cineol, respectivamente. Os animais desafiados foram submetidos à inalação de OVA. Os animais naive inalaram solução fisiológica, para o grupo pré-tratado com 1,8-cineol a inalação foi feita antes do antígeno. □ Dados são expressos em média \pm E.P.M. ^a $p < 0.05$ em relação ao grupo naive e sensibilizado (teste Mann-Whitney) ^b $p < 0.05$ em relação ao grupo naive e sensibilizado pré-tratado e desafiado sem pré-tratamento (teste Holm-Sidak).

5.15 Efeito do 1,8-cineol na degranulação de mastócitos em mesentério de cobaias

A degranulação de mastócitos em mesentério de cobaias naive *in vitro* foi de $19,75 \pm 3,77 \%$ ($n = 5$). A incubação desse tecido com solução contendo o composto 48/80 ($n = 5$) revelou aumento significativo ($p < 0,001$, teste Holm-Sidak) do percentual de mastócitos degranulados ($51,12 \pm 2,10 \%$). Esse efeito também foi evidenciado nas preparações mantidas em solução contendo 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) ($33,76 \pm 1,73 \%$; $n = 5$), valor significativamente maior ($p < 0,01$, teste Holm-Sidak) que na preparação controle. Essa concentração de 1,8-cineol não impediu degranulação de mastócitos quando o composto 48/80 foi adicionado à preparação, ainda na presença de 1,8-cineol. Nessas condições o percentual de mastócitos degranulados foi de $47,44 \pm 1,99 \%$ ($n = 5$), valor significativamente maior ($p < 0,001$, teste Holm-Sidak) do que a degranulação nas preparações contendo apenas 1,8-cineol, mas que não foram diferentes ($p > 0,05$, ANOVA) do percentual observado nas preparações tratadas apenas com 48/80 (Figura 18A).

Em grupos separados de animais, o 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) ou o cromoglicato dissódico ($4,03 \times 10^{-3}$ M) foram administrados previamente por via inalatória. No mesentério desses animais, o percentual de degranulação de mastócitos foi correspondente a $27,24 \pm 2,35 \%$ ($n = 5$) e $32,71 \pm 1,66 \%$ ($n = 5$), respectivamente, sem diferença significativa entre esses valores ($p > 0,05$, ANOVA). A adição do composto 48/80 às preparações de mesentério *in vitro* obtidas de animais tratados previamente com 1,8-cineol ou cromoglicato dissódico, não foi capaz de produzir aumento no percentual de degranulação de mastócitos, que correspondeu a $30,51 \pm 1,43 \%$ ($n = 5$) e $37,18 \pm 2,89 \%$ ($n = 5$), respectivamente. Esses valores não foram significativamente diferentes aos observados nas preparações de animais tratados com 1,8-cineol ou cromoglicato mantidas na ausência do composto 48/80 (Figura 18B).

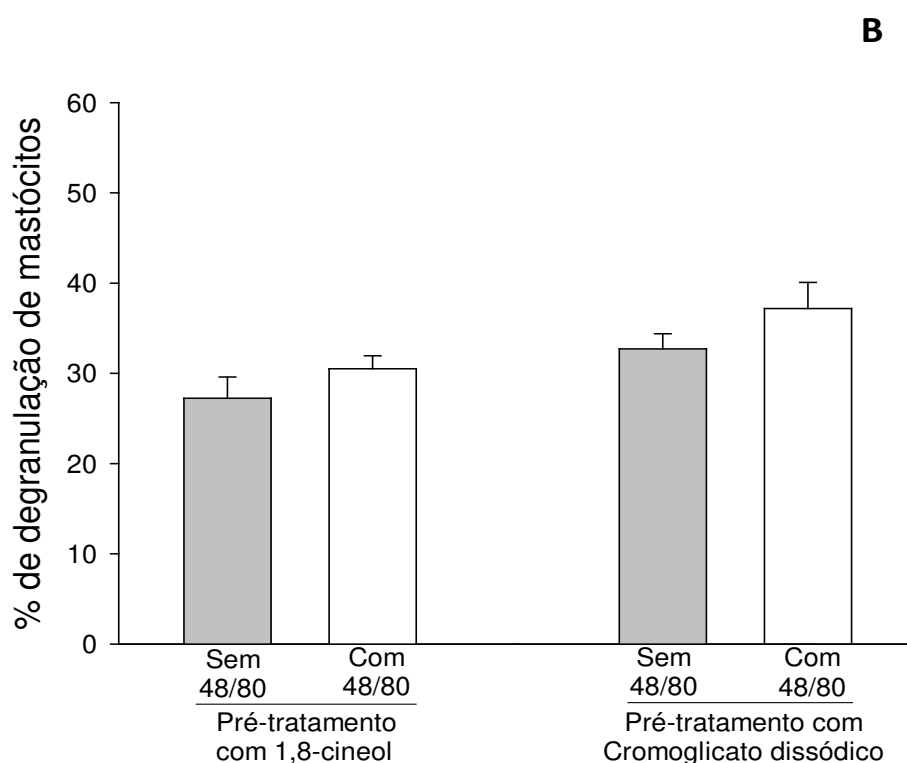
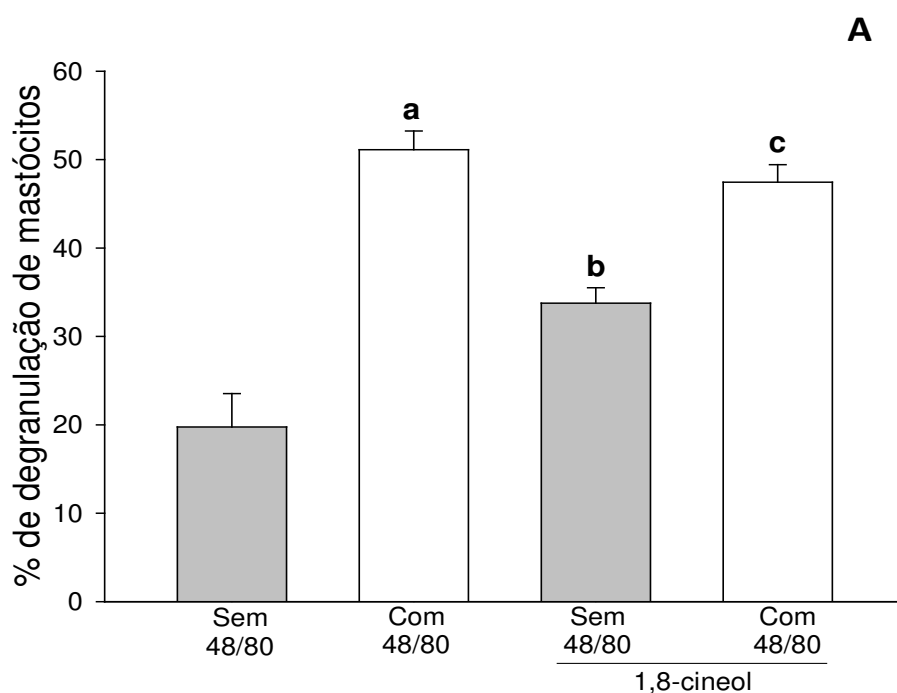


Figura 18 - Efeito do 1,8-cineol na degranulação de mastócitos em cobaias naive. O 1,8-cineol foi administrado localmente (Figura 18A) ou sistemicamente (Figura 18B) por via inalatória na presença ou ausência do composto 48/80. Todos os grupos foram formados por $n = 5$. Figura A: ^a $p < 0,001$ em relação ao grupo de animais sem o composto 48/80, ^b $p < 0,01$ em relação ao grupo de animais sem o composto 48/80 e sem 1,8-cineol ^c $p < 0,001$ em relação aos grupo de animais com apenas 1,8-cineol (teste Holm-Sidak). Figura B: Não houve diferença significativa entre os grupos. Valores expressos em percentual do total de mastócitos (média \pm E.P.M.).

5.16 Efeito do 1,8-cineol nas medidas das pressões pulmonares e frequência respiratória de cobaias

Ao mensurar a pressão expiratória média nos animais naive e sensibilizados *in vivo* foi detectado ausência de significância ($p > 0,05$, ANOVA) entre esses grupos (cmH_2O : $0,55 \pm 0,05$; $n = 5$ e $0,59 \pm 0,16$; $n = 5$, respectivamente) (Figura 19), porém o grupo de animais desafiados apresentou um aumento significativo ($p < 0,001$, teste Holm-Sidak) da pressão média expiratória em relação ao grupo sensibilizado, passando para $2,34 \pm 0,20 \text{ cmH}_2\text{O}$ ($n = 5$). Porém esse valor foi reduzido significativamente ($p < 0,001$, teste Holm-Sidak) no grupo de animais desafiados a ovalbumina submetidos previamente a inalação de 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3} \text{ M}$) para $1,03 \pm 0,12 \text{ cmH}_2\text{O}$ ($n = 5$).

A média das pressões inspiratórias verificada no grupo de animais naive ($n = 5$) foi de $-9,93 \pm 0,94 \text{ cmH}_2\text{O}$ e no grupo sensibilizado ($n = 5$) de $-8,43 \pm 0,49 \text{ cmH}_2\text{O}$, não apresentado diferença significativa entre essas pressões ($p > 0,05$, ANOVA). A pressão inspiratória foi aumentada significativamente ($p < 0,05$, teste Holm-Sidak) no grupo de animais submetidos ao desafio para $-6,65 \pm 0,49 \text{ cmH}_2\text{O}$ ($n = 5$), porém no grupo de animais que foram submetidos ao desafio e pré-tratados com 1,8-cineol a pressão inspiratória foi para $-9,48 \pm 0,71$ ($n = 5$), essa reduzida na pressão foi significativa ($p < 0,05$; teste Holm-Sidak) com relação ao grupo desafiado não pré-tratado (Figura 20).

A frequência respiratória média no grupo de animais naive ($n = 5$) foi de $20,33 \pm 1,40 \text{ irpm}$, valor esse que não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$, ANOVA) com relação ao grupo sensibilizado ($21,04 \pm 0,90 \text{ irpm}$; $n = 5$). No grupo de animais desafiado à ovalbumina ($n = 5$) ocorreu um aumento significativo ($p < 0,01$, teste Dunn's) na frequência respiratória, passando para $34,64 \pm 3,43 \text{ irpm}$ em relação ao grupo sensibilizado, porém esse aumento foi reduzido significativamente ($p < 0,05$, teste Dunn's) quando esses animais desafiados foram submetidos ao pré-tratamento com 1,8-cineol ($23,99 \pm 1,74 \text{ irpm}$, $n = 5$) (Figura 21).

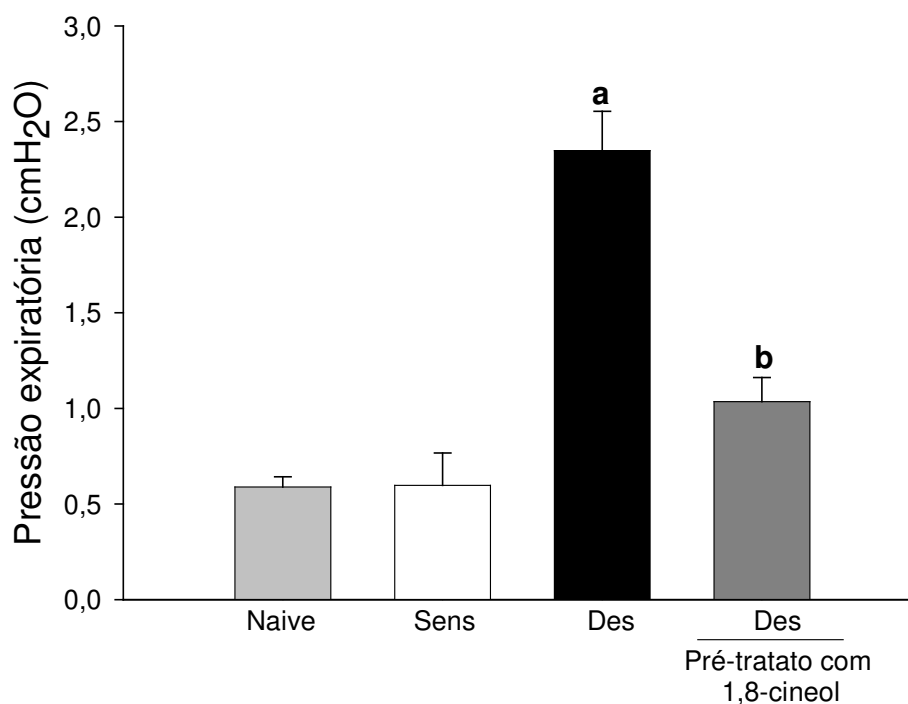


Figura 19 - Análise das pressões expiratórias de cobaias sensibilizadas e desafiadas à ovalbumina submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol. Os animais desafiados foram submetidos à inalação de OVA. Os animais pré-tratado com 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) a inalação foi feita antes do antígeno. Todos os grupos foram formados por $n = 5$. Dados são expressos em média \pm E.P.M. ^a $p < 0,001$ em relação ao grupo naive e sensibilizado, ^b $p < 0,001$ em relação ao grupo desafiado sem pré-tratamento (teste Holm-Sidak).

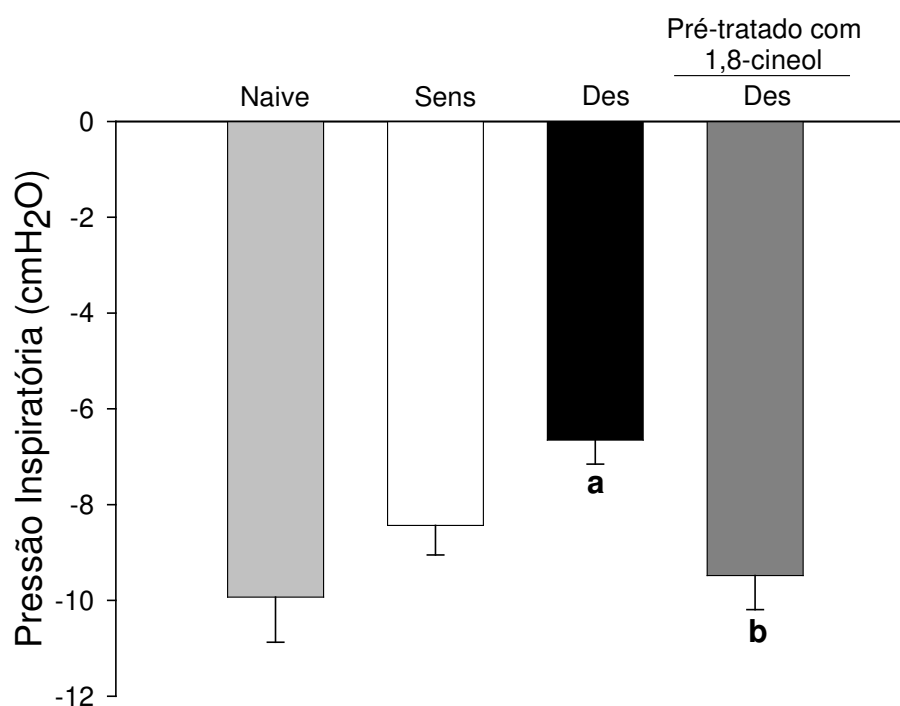


Figura 20 - Análise das pressões inspiratórias de cobaias sensibilizadas e desafiadas à ovalbumina submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol. Os animais desafiados foram submetidos à inalação de OVA. Os animais pré-tratado com 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) a inalação foi feita antes do antígeno. Todos os grupos foram formados por $n = 5$. Dados são expressos em média \pm E.P.M. ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo naive e sensibilizado, ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado sem pré-tratamento (teste Holm-Sidak).

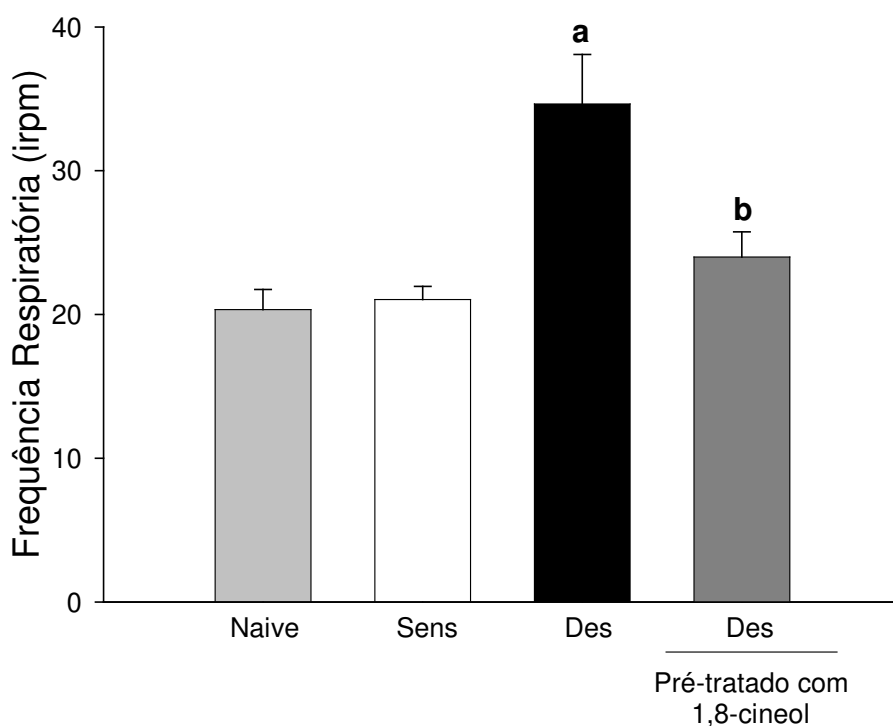


Figura 21 - Análise das frequências respiratórias de cobaias sensibilizadas e desafiadas à ovalbumina submetidas ao pré-tratamento com 1,8-cineol. Os animais desafiados foram submetidos à inalação de OVA. Os animais pré-tratado com 1,8-cineol ($6,5 \times 10^{-3}$ M) a inalação foi feita antes do antígeno. Todos os grupos foram formados por $n = 5$. Dados são expressos em média \pm E.P.M. ^a $p < 0,01$ em relação ao grupo naive (teste t de Student) e sensibilizado, ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo desafiado sem pré-tratamento (teste Dunn's).

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho utilizamos diferentes metodologias para a análise dos efeitos farmacológicos do 1,8-cineol, mais conhecido como eucaliptol, constituinte terpênico encontrado comumente como constituinte de óleos essenciais de plantas mundialmente conhecidas, dentre elas o *Eucalyptus globulus*. Apesar de estar presente em compêndios clássicos como a Farmacopéia Britânica ou a Farmacopéia Brasileira, estudos de sua eficácia farmacológica ainda podem ser considerados escassos. Nos estudos *in vitro* apresentados neste trabalho, verificamos que o 1,8-cineol possui vários efeitos importantes farmacologicamente: ele relaxa a musculatura lisa da traquéia de cobaias mantida sob tônus basal, diminui a contração induzida pelo antígeno em tecidos provenientes de animais sensibilizados, inibe o desenvolvimento de hiperreatividade em tecidos submetidos ao desafio antigênico e mostra efeitos antiespasmódicos contra estímulos contrácteis induzidos eletromecanicamente. Além disso, apresenta importantes propriedades anti-inflamatórias, por meio da sua capacidade em reduzir os níveis de marcadores do processo inflamatório nas vias aéreas.

Em nosso estudo, a eficácia do processo de sensibilização antigênica por via intraperitoneal foi confirmada pelos experimentos com anéis de traquéia obtidos de animais previamente sensibilizados. Neles, a adição de OVA à cuba produziu contração vigorosa e imediata. Estudos anteriores mostram que a resposta contráctil obtida pela apresentação *in vitro* do antígeno, de acordo com a reação de *Schultz-Dale*, é semelhante à mediada pela histamina, leucotrienos e prostanóides (NARAHASHI; MOORE; SCOTT, 1964). Além disso, em tecido de cobaias desafiadas à ovalbumina pela via inalatória, a resposta contráctil da traquéia isolada de cobaias a agentes contraturantes clássicos como KCl e CCh foi significativamente maior em relação à resposta produzida por esses agentes em traquéias de animais sensibilizados e desafiados por salina. Dessa forma, também se configura o desenvolvimento de hiperreatividade das vias aéreas, característica importante encontrada em modelos que buscam simular a asma, e que pode ser mediada por processo inflamatório. Clinicamente, a hiperreatividade também é encontrada em pacientes com asma, doença broncoconstrictiva inflamatória crônica, mas reversível, na qual muitas células e

elementos celulares, especialmente mastócitos, eosinófilos, linfócitos T, neutrófilos e células epiteliais desempenham importante papel (BUIST, 2002).

A presença de 1,8-cineol, adicionado antes da reação de *Schultz-Dale*, foi capaz de reduzir ligeiramente a resposta do antígeno nos tecidos provenientes de cobaias sensibilizadas e desafiadas com salina, mas sem efeito significativo. Por outro lado, no grupo que foi submetido ao desafio antigênico com ovalbumina, o 1,8-cineol foi capaz de reduzir significativamente a resposta à adição de OVA. Esse resultado aponta para uma maior eficácia do 1,8-cineol em tecidos obtidos de animais desafiados.

Já foi relatado que o 1,8-cineol tem propriedades miorrelaxantes, especialmente na musculatura lisa vascular e gastrointestinal (MAGALHÃES et al., 1998; LAHLOU et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2008). O presente estudo confirma que o 1,8-cineol tem essas propriedades também em músculo liso traqueal de cobaia. Sua ação relaxante (corresponde a aproximadamente 95% da contração induzida pelo K^+) foi significativamente menor do que as evocadas por aminofilina (cuja magnitude de efeito foi da ordem de 209 ± 34 % da concentração de referência induzida por K^+), sob condições semelhantes (COELHO-DE-SOUZA et al., 2005).

Nas preparações com epitélio íntegro ou mesmo removido, uma suposta ação agonista de 1,8-cineol em receptor β -adrenérgico não foi evidenciada, pois o seu efeito relaxante sobre o tônus basal não foi alterado em tecidos submetidos previamente ao tratamento com propanolol, um bloqueador não-seletivo de receptores β -adrenérgicos (SHAND, 1975). O pré-tratamento com L-NAME também não alterou o tônus basal no relaxamento induzido por 1,8-cineol, indicando que suas ações miorrelaxantes nas vias aéreas não são influenciadas pelo óxido nítrico (NO) (FOLKERTS; NIJKAMP, 2006). Atuando principalmente como um neurotransmissor inibitório de neurônios não-adrenérgicos e não colinérgicos (NANC), a função fisiológica do NO pode ser na dilatação da musculatura lisa brônquica pelo aumento dos níveis intracelulares de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) e ativação dos canais de K^+ dependente de Ca^{2+} ($K_{Ca^{2+}}$) de células musculares lisas das vias aéreas. A estimulação de proteínas quinases dependentes de GMPc podem, por sua vez, diretamente fosforilar e, assim, ativar $K_{Ca^{2+}}$ (SARAIVA et al., 1992; ARCHER et al., 1994).

No presente estudo, o relaxamento traqueal produzido pelo 1,8-cineol não foi alterado pelo pré-tratamento com TEA, um bloqueador não seletivo $K_{Ca^{2+}}$ (NELSON; QUAYLE, 1995), ou pela presença de TTX, um bloqueador de canais de Na^+ (NARAHASHI; MOORE; SCOTT, 1964). Assim, o relaxamento induzido por esse

monoterpenóide não é devido ao aumento da condutância ao K^+ , o que poderia causar hiperpolarização da membrana plasmática, com conseqüente redução da excitabilidade celular, deslocando o potencial transmembrana (E_m), afastando-o do limiar de excitação (QUAST, 1993). Neste sentido, já foi registrado que o óleo essencial de *C. nepetaefolius*, cujo principal constituinte é o 1,8-cineol, não provocou alteração do potencial transmembrana na musculatura lisa traqueal de cobaia seja em concentrações de K^+ extracelular de 5 mM ou de 80 mM (MAGALHÃES et al., 2003). Além disso, o efeito inibitório induzido por 1,8-cineol sobre o tônus basal traqueal foi independente da atividade neuronal sensível à TTX em vias aéreas isoladas de cobaias.

Em traquéias isoladas de cobaias sensibilizadas previamente por OVA e desafiadas com antígeno por inalação, foi evidenciado um aumento da capacidade de resposta contrátil ao CCh ou a soluções com alta concentração de K^+ , bem como para a reação de *Schultz-Dale*. Curiosamente, a eficácia do 1,8-cineol foi maior em inibir as contrações traqueais estimuladas pelo K^+ do que aquelas induzidas pelo CCh, uma vez que praticamente aboliu a força desenvolvida na primeira condição, mas apenas reduziu ligeiramente a curva concentração-efeito obtida com CCh. Este efeito pode ser contrastante devido à ação do 1,8-cineol nas diferentes vias intracelulares ativadas pela contração induzida por alta concentração de K^+ ou CCh no músculo liso das vias aéreas. Está bem estabelecido que o K^+ pode conduzir a um acoplamento excitação-contração através do influxo transmembrana de Ca^{2+} promovido pela ativação de canais para Ca^{2+} operados por voltagem (VOCC) (KIRKPATRICK, 1975). Por outro lado, apesar da acetilcolina (ACh) agir em receptores muscarínicos em muitos músculos lisos para causar despolarização e contração (BOLTON, 1979), a excitação da musculatura lisa das vias aéreas em resposta a ativação dos receptores muscarínicos depende mais do acoplamento farmacomecânico, ou seja, um fenômeno independente do E_m (SOMLYO; SOMLYO, 1968; COBURN; BARON, 1990). Sob estimulação muscarínica, o encurtamento do músculo liso traqueal consiste em dois componentes: um caracterizado por uma contração inicial resultante da formação intracelular de IP_3 , capaz de promover liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (ABDEL-LATIF, 1986) e um segundo, caracterizado por contração sustentada resultante de um influxo de Ca^{2+} através de canais para Ca^{2+} operados por receptor (ROCCs) (CUTHBERT et al., 1994). Neste sentido, foi relatada inibição, induzida por ACh, do canal para Ca^{2+} tipo-L em células musculares lisas em traquéia de cobaias por meio de via de sinalização citossólica (WADE; BARBERA; SIMS, 1996).

Pudemos detectar em nosso estudo que o 1,8-cineol, não inibiu a curva concentração-efeito do CCh em traquéias obtidas de animais sensibilizados. Contrariamente, o efeito máximo induzido pelo CCh foi aumentado na presença de 2×10^{-3} M de 1,8-cineol. Tendência similar para a potencialização dessa resposta também foi observada na presença de $6,5 \times 10^{-3}$ M de 1,8-cineol, embora sem significância estatística, talvez devida à redução da força máxima induzida pelo CCh. Recentemente, foi relatado que as contrações induzidas tanto pela acetilcolina como por estimulação elétrica de campo foram significativamente aumentadas por 1,8-cineol (COELHO-DE-SOUZA et al., 2005) por mecanismos ainda não identificados. Merece destaque o fato de que, enquanto 1,8-cineol não inibiu as contrações induzidas pelo CCh em animais sensibilizados, a diminuição desta resposta contrátil em tecidos obtidos de animais desafiados pela OVA foi significativa, o que amenizou o fenômeno da hiperreatividade traqueal. As curvas concentração-efeito do CCh foram significativamente deslocadas para a direita na presença de 1,8-cineol. Por outro lado, usando K^+ como estímulo contrátil, tecidos de animais desafiados com OVA mostraram uma menor resposta contrátil em presença de 2×10^{-3} M de 1,8-cineol, embora o efeito máximo da contração potássica tenha sido semelhante aos observados em preparações de animais sensibilizados. Na presença de $6,5 \times 10^{-3}$ M de 1,8-cineol, a contração induzida pelo K^+ foi quase totalmente bloqueada, fornecendo provas para uma ação preferencial de 1,8-cineol sobre contrações induzidas eletromecanicamente em traquéias.

Assim, podemos supor que a maior eficácia para inibir a CCE ao K^+ , em vez de contrações induzidas pelo CCh em tecidos desafiados por OVA, envolvem uma ação preferencial do 1,8-cineol sobre VOCCs, os quais parecem ser mais ativados pelo desafio antigênico em tecidos submetidos ao processo inflamatório. Já foi relatado que o 1,8-cineol deprime o desenvolvimento ventricular em músculos papilares de ratos, provavelmente atuando como um bloqueador canal de cálcio (SOARES et al., 2005). Trabalhos anteriores também dão suporte à idéia de que maior entrada de cálcio pode ser o mecanismo subjacente à hiperreatividade para espasmógenos em tecidos sensibilizados submetidos à provocação antigênica (PERPINA et al., 1989; PERPINA et al., 1991; CHIBA; MISAWA, 1995). Além disso, em traquéias de ratos desafiadas por OVA tratadas com nifedipina, que bloqueia os canais de Ca^{2+} Tipo-L, ou com ácido niflúmico, que bloqueia os canais de Cl^- ativados pelo Ca^{2+} (TEIXEIRA et al., 2000), foi observada hiperreatividade na contração induzida pela 5-hidroxitriptamina, indicando que o aumento da resposta contrátil em traquéia isolada de rato pode estar

relacionado à maior permeabilidade de canais iônicos (Ca^{2+} e Cl^-) (MOURA et al., 2005). Nas células musculares lisas brônquicas obtidas de cobaias sob modelo de indução de asma, o aumento da atividade dos canais de cálcio pode ser um dos mais importantes fatores responsáveis para o surgimento de hiperresponsividade nas vias aéreas (WANG; MA; ZHOU, 2001).

Para aprofundar o estudo sobre esses efeitos, o 1,8-cineol foi incapaz de alterar as contrações induzidas por Ca^{2+} , aplicado em concentrações cumulativas, em tecido traqueal de cobaias naive mantido na presença de ACh em meio sem Ca^{2+} . Inversamente, quando o Ba^{2+} , um íon pouco permeável em ROCCs mas com fluxo através VOCCs (CUTHBERT et al., 1994; MURRAY; KOTLIKOFF, 1991), substituiu o Ca^{2+} na solução fisiológica, 1,8-cineol aboliu a resposta contrátil em preparações de traquéias estimuladas com ACh em meio sem Ca^{2+} . Comparativamente, o verapamil, um bloqueador de canais de Ca^{2+} Tipo-L, também inibiu a curva concentração-efeito para Ba^{2+} em preparações com ACh em meio sem Ca^{2+} , apesar de sua ineficácia para bloquear contrações induzidas pelo Ca^{2+} em condições semelhantes.

Portanto, o presente estudo demonstra que o 1,8-cineol possui propriedades miorrelaxantes em tecido muscular liso traqueal obtido de cobaias, e que o seu mecanismo envolve uma ação preferencial nas respostas contráteis iniciadas eletromecanicamente. Entretanto, essa conclusão foi alcançada utilizando-se metodologia indireta, fato que requer estudos adicionais para a demonstração de que o 1,8-cineol é capaz de diretamente ser um bloqueador de canais lentos de cálcio. Uma segunda informação importante desse estudo está relacionada ao fato de que sua eficácia é maior antes do desencadeamento de eventos inflamatórios, revelando-se como substância potencialmente interessante em situações nas quais seria importante uma ação com esse perfil, principalmente durante o desenvolvimento de hiperreatividade.

Está bem descrito na literatura que o processo de desafio antigênico envolve eventos inflamatórios nas vias aéreas, inclusive com maior recrutamento de células como eosinófilos, linfócitos e mastócitos (ZHOU et al., 2007). Em virtude disso, tornou-se imperativo o estudo das atividades do 1,8-cineol nos eventos inflamatórios evocados pela provocação antigênica. Por um lado, a resposta broncoconstritora é característica da fase inicial do processo inflamatório das vias aéreas e é mediada pela liberação de autacóides dos mastócitos, dentre eles a histamina. Ao ser confeccionada resposta contrátil para histamina em traquéia isolada de cobaias, o 1,8-cineol foi capaz

de relaxar essa contração indicando que seu efeito miorrelaxante também pode estar presente na fase inicial broncoconstritora.

Em animais desafiados, a quantidade de células inflamatórias no lavado broncoalveolar foi maior em relação ao grupo de animais sensibilizados. Esse efeito foi observado tanto no número total de células, como na contagem diferencial, especialmente para os eosinófilos e neutrófilos, que tiveram de forma destacada os maiores incrementos em suas populações no lavado. Yu et al. (2008) reportaram que o desafio antigênico com ovalbumina induz a degranulação de mastócitos e resposta inflamatória com eosinófilos. Essa migração de eosinófilos estaria relacionada com um quadro de hiperreatividade inespecífica, pois essas células possuem várias substâncias que podem alterar a responsividade das vias aéreas de cobaias (MATSUSE et al., 1991). Potter et al. (2004) e Onbasi et al. (2005) também evidenciaram que o aumento no número de eosinófilos estaria ligado à resposta alérgica, bem como à asma.

A utilização prévia do 1,8-cineol, por via inalatória, no grupo de animais desafiados reduziu significativamente a quantidade de células totais e diferenciais, indicando que, além dos efeitos miorrelaxantes, o 1,8-cineol também inibe a migração de células inflamatórias nas vias aéreas. A presença de células inflamatórias está relacionada à liberação de substâncias que podem provocar danos epiteliais. Sabe-se que essas células possuem proteases, oxidantes e moléculas tóxicas às células epiteliais. Bousquet et al. (1990) relataram que o processo asmático leva à migração de eosinófilos com conseqüente dano epitelial. Os eosinófilos possuem várias substâncias, tais como proteína catiônica eosinofílica e proteína básica principal que podem causar uma disfunção no epitélio traqueal (AIZAWAZ et al., 1990; MAUAD et al., 2000).

Nesse estudo, a análise histológica do epitélio traqueal de animais desafiados evidenciou dano epitelial considerável com diminuição do transporte mucociliar. O epitélio traqueal apresentou de forma moderada o ingurgitamento vascular, vasodilatação, infiltrado celular com maior número de eosinófilos, presença de edema e alterações na mucosa. Dortch-Carnes et al. (1999) ressaltaram que o epitélio tem ação de proteção, funcionando como barreira seletiva, bem como, liberando substâncias que modulam a atividade do músculo. Porém, em um quadro específico de asma ocorre descamação intensa de células para dentro do lúmen da via aérea, levando a um prejuízo na ciliogênese, com redução da quantidade de cílios no tecido epitelial da traqueal (MAUAD et al., 2000). A utilização prévia do 1,8-cineol favoreceu uma melhora no transporte mucociliar e, na análise histológica do tecido traqueal de animais desafiados

à ovalbumina, provavelmente isso decorreu de uma diminuição no processo inflamatório, especialmente da migração de eosinófilos, pois Juergens et al. (1998) haviam destacado o uso do 1,8-cineol como anti-inflamatório. Podemos assim inferir, que o 1,8-cineol administrado previamente ao desafio antigênico proporciona uma proteção ao epitélio, amenizando as disfunções epiteliais provocadas pelos eosinófilos, conforme destacado por Worth; Schacher; Dethlefsen (2009) quando reportaram que o 1,8-cineol teria um efeito positivo na frequência de batimentos dos cílios da mucosa das vias aéreas, pois a disfunção mucociliar tem implicações diretas no processo inflamatório.

Conforme destacam Juergens; Stober; Vetter (1998) o 1,8-cineol pode atuar suprimindo os metabólitos do ácido araquidônico, IL-1 e TNF α em humanos. Zhou et al. (2006) ressaltam que essas citocinas são pró-inflamatórias, dados esses confirmados nesse estudo, pois foi evidente a presença dessas citocinas no grupo de animais desafiados e que a expressão delas foi reduzida significativamente após o pré-tratamento com 1,8-cineol no grupo de animais desafiados. Essa mudança na expressão das citocinas com o uso do 1,8-cineol foi também evidenciada para a IL-10, uma citocina anti-inflamatória (BELLENGHAUSEN; KNOP; SALOGA, 2001). Porém, esses níveis de interleucinas encontraram-se reduzidos no nosso estudo no grupo de animais desafiados não tratados com 1,8-cineol quando comparado com o grupo de animais sensibilizados. Embora o pré-tratamento com 1,8-cineol tenha reduzido os níveis de IL-10 em relação aos naive não foi observado redução significativa dos níveis dessa interleucinas no grupo de animais desafiados pré-tratados, indicando o efeito preventivo do processo inflamatório.

A redução da IL-10 no grupo de animais sensibilizados pré-tratados poderiam estar relacionados a uma suposta ação pró-inflamatória do 1,8-cineol ao ser aplicado localmente. Nesse estudo usamos uma concentração na solução inalatória equivalente a $6,5 \times 10^{-3}$ M, que poderia levantar a hipótese de que o 1,8-cineol pudesse provocar degranulação de mastócitos. Santos; Rao (1997) demonstraram que a aplicação direta do 1,8-cineol induz degranulação de mastócitos e formação de edema em pata de ratos, o qual foi inibido por agentes antihistamínicos e antiserotoninérgicos. Em nosso estudo, evidenciamos aumento significativo da degranulação de mastócitos do leito mesentérico pela adição *in vitro* do 1,8-cineol, e também nos tecidos obtidos dos animais pré-tratados com 1,8-cineol, corroborando, portanto, os achados desses autores. Também observamos aumento do número total de células inflamatórias no lavado bronco-

alveolar de animais sensibilizados pré-tratados com 1,8-cineol. Entretanto essa hipótese é pouco provável visto que não ocorreram aumentos nos níveis de citocinas e dos parâmetros histológicos indicativos de injúria tecidual nos animais pré-tratados com 1,8-cineol, indicando que o perfil pró-inflamatório do 1,8-cineol aplicado nessa concentração foi apenas discreto. Não utilizamos administração inalatória desse constituinte por meio de soluções com menores concentrações, mas a informação desses efeitos com a solução de $6,5 \times 10^{-3}$ M torna-se importante em virtude da comercialização dessa substância em preparações farmacêuticas no Brasil que são utilizadas por via inalatória. O efeito direto do 1,8-cineol parece ser pouco provável também pelo fato de que os animais naive não apresentaram diferença em relação aos animais naive não tratados com 1,8-cineol.

Embora tenha provocado degranulação de mastócitos localmente, o uso do 1,8-cineol, de forma sistêmica, impediu a ação estimulatória do composto 48/80 na degranulação de mastócitos em mesentério de cobaias. Essa redução apresentou significância estatística semelhante à desenvolvida pelo cromoglicato dissódico, fármaco usado amplamente como estabilizador de membrana de mastócitos. Essas células são importantes na liberação de mediadores inflamatórios tais como: histamina, leucotrienos e prostaglandinas, que favorecem ao surgimento da inflamação e da broncoconstrição (BRIGHTING et al., 2002).

Os estudos de Juergens et al. (2004) mostraram evidências que 1,8-cineol inibiu a produção de citocinas em indivíduos normais, suprimindo a produção de TNF α e IL-1, inibindo o processo inflamatório. Com a presença de neutrofilia no grupo de animais desafiados pudemos detectar um aumento significativo na ativação da mieloperoxidase. A mieloperoxidase é liberada por neutrófilos no processo inflamatório (BORREGAARD; COWLAND, 1997), todavia essa ativação foi reduzida de maneira significativa após o tratamento com 1,8-cineol, mostrando mais uma vez a ação desse constituinte na inibição do processo inflamatório. Provavelmente, a redução na quantidade de neutrófilos está envolvida na redução da atividade da enzima mieloperoxidase no grupo de animais desafiados à OVA e submetidos ao pré-tratamento.

Quanto analisada a resposta apresentada por cobaias *in vivo* nas pressões expiratórias e inspiratórias e na frequência respiratória, foi possível verificar a ação do 1,8-cineol no quadro de hiperreatividade brônquica, pois estava envolvida tanto a contração da musculatura lisa traqueal com a inflamação do tecido. O quadro de

hiperreatividade evidenciado no processo asmático é mediado tanto pela ação direta da inflamação como da alteração muscular (broncoconstrição), os quais foram evidenciados na pressão expiratória no grupo de animais sensibilizados e desafiados a OVA, deixando-a mais positiva e a pressão inspiratória estava menos negativa, favorecendo um aumento na frequência respiratória.

Porém, esse quadro foi melhorado ou revertido com o uso do 1,8-cineol previamente por via inalatória proporcionando uma redução significativa do ritmo respiratório e das pressões expiratórias e inspiratórias durante os ciclos respiratórios. Esses resultados apresentados foram semelhantes os destacados por Aggarwal et al. (2006) quando estudando o uso de agonista β_2 -adrenérgico, por via inalatória, apresentou efeito na melhora e no ritmo respiratório e por Worth; Schacher; Dethlefsen (2009) que destacaram que o 1,8-cineol, associados a outras terapias broncodilatadoras e anti-inflamatórias, na dose de 600 mg/dia teria um benefício na redução da frequência, duração e severidade da exacerbação da dispnéia quando comparado com outras terapias, por outro lado, o propranolol não alterou o efeito miorelaxante do 1,8-cineol indicando que suas ações não são mediadas via receptores β -adrenérgicos.

7 CONCLUSÕES

- O 1,8-cineol (*eucalyptol*) funciona como substância miorrelaxante e anti-inflamatória nas vias áreas de cobaias;
- Mecanismo envolvido no efeito relaxante seja, preferencialmente, devido sua ação nas respostas contrácteis mediadas eletromecanicamente, provocando interferência sobre eventos eletromecânicos de maneira direta ou indireta sobre VOCCs.
- O uso prévio do 1,8-cineol em animais desafiados a ovalbumina foi capaz de reduzir o processo inflamatório, com diminuição da eosinofilia/neutrofilia, proporcionando uma melhora na atividade do transporte mucociliar;
- Funciona como protetor para o epitélio traqueal, reduzindo as citocinas pró-inflamatórias e a atividade da mieloperoxidase e favorecendo o aumento da interleucina anti-inflamatória (IL-10). Esses eventos contribuem para a melhora do quadro de hiperreatividade semelhante à asma.
- Pode ser inferido que o uso do 1,8-cineol por via inalatória funciona como um adjuvante da terapia anti-inflamatório e miorrelaxante de doenças das vias respiratórias, como asma.

REFERÊNCIAS

ABDEL-LATIF, A. A. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. **Pharmacol Rev.**, v. 38, n. 3, p. 227-272, 1986.

AGGARWAL, P.; SHARAD, S.; HANDA, R.; DWIWEDI, S. N. AND M IRSHAD. Comparison of nebulised magnesium sulphate and salbutamol combined with salbutamol alone in the treatment of acute bronchial asthma: a randomised study **Emerg. Med. J.**, v. 23, n. 5, p. 358-362, 2006

AHMED, F.; FOSTER, R. W.; SMALL, R. C. Some effects of nifedipine in guinea-pig isolated trachealis. **Br. J. Pharmac.**, v. 84, p. 861-869, 1985.

AIZAWAZ, T.; SEKIZAWA, K.; AIKAWA, T.; MARUYAMA, N.; ITABASHI, S.; TAMURA, G.; SASAKI, H.; TAKISHIMA, T. Eosinophil supernatant causes hyperresponsiveness of airway smooth muscle in guinea-pig trachea. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 142, n. 1, p. 133-137, 1990.

AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca^{2+} concentration and the Ca^{2+} -dependent regulation of vascular tone. **J. Anesth.**, v. 21, p. 220-231, 2007.

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

AMAYASU, H.; NAKABAYASHI, M.; AKAHORI, K.; ISHIZAKI, Y.; SHOJI, T.; NAKAGAWA, H.; HASEGAWA, H.; YOSHIDA, S. Cromolyn sodium suppresses eosinophilic inflammation in patients with aspirin-intolerant asthma. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 87, p. 146-150, 2001.

AN, S. S. et al. Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma. **Eur. Respir. J.**, v. 29, p. 834-860, 2007.

ANON, Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. The Childhood Asthma Management Program Research Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, p. 1054-1063, 2000.

ARCHER, S. L.; HUANG, J. M.C.; HAMPL, V.; NELSON, D. P.; SHULTZ, P. J.; WEIR, E. K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 7583-7587, 1994.

BAI, Y.; ZHANG, M.; SANDERSON, M. J. Contractility and Ca^{2+} signaling of smooth muscle cells in different generations of mouse airways. **Am J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 36, p. 122-130, 2007.

BALACS, T. Cineole-rich eucalyptus. **International Journal of Aromatherapy**, v. 8, n. 2, 1997.

BANNER, K. H.; PAGE, C. P. Theophylline and selective phosphodiesterase inhibitors as anti-inflammatory drugs in the treatment of bronchial asthma. **Eur. Respir. J.**, v. 8, p. 996-1000, 1995.

BARNES, P. J. Airway neuropeptides and asthma. In: VANE, E. et al. (Eds). **Asthma: basic mechanisms and therapeutic perspectives**. Roma: Pythagora Press, 1989. cap. 7, p. 127-139.

_____. Cholinergic control of airway smooth muscle. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 136, p. S42-S45, 1987.

_____. Cytokines as mediators of chronic asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 150, p. S42-S49, 1994.

_____. Cytokine modulators as novel therapies for asthma. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 42, p. 81-98, 2002.

_____. Effect of corticosteroids on airway hyperresponsiveness. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 141, p. S70-S76, 1990.

_____. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature**, v. 8, p. 183192, 2008.

_____. Inhaled glucocorticoids for asthma. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 868-875, 1995.

_____. Mechanisms in COPD differences from asthma. **Chest**, v. 117, p. 105-145, 2000.

_____. Neuropeptides in human airways smooth muscle. **Pharmac. Ther.**, v. 36, p. 119-129, 1988

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

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

BARNES, P. J.; CHUNG, K. F.; PAGE, C. P. Inflammatory mediators of asthma: an update. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, p. 515-596, 1998.

BEASLEY, R.; ROCHE, W. R.; ROBERTS, J. A.; HOLGATE, S. T. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 139, p. 806-817, 1989.

BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiol Rev.**, v. 75, n. 4, p. 725-748, 1995.

BEL, E. H.; TIMMERS, M. C.; ZWINDERMAN, A. H.; DIJKMAN, J. H.; STERK, P. J. The effect of inhaled corticosteroids on the maximal degree of airway narrowing to methacoline in asthmatic subjects. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 143, p. 109-113, 1991.

BELLENGHAUSEN, I.; KNOP, J.; SALOGA, J. The role of inter-leukin 10 in the regulation of allergic immune responses. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 126, p. 97-101, 2001.

BELVISI, M. G.; MIURA, M.; STRETTON, D.; BARNES, P.J. Endogenous vasoactive intestinal peptide and nitric oxide modulate cholinergic neurotransmission in guinea pig trachea. **European Journal of Pharmacology**, v. 231, p. 97-102, 1993.

BENAFF, S. Voltage dependent calcium channels in mammalian spermatozoa. **Frontiers in Bioscience**, v. 31, p. 433-437, 1998.

BERNAREGGI, M. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; GIEMBYCZ, M. A. Anti-spasmogenic activity of isoenzyme-selective phosphodiesterase inhibitors in guinea-pig trachealis. **Br. J. of Pharmacol.**, v. 128, p. 327-336, 1999.

BEZERRA, M. A. C. **Estudo farmacológico do óleo essencial de *Alpinia zerum bet* (Pers) B. L. Burt ET R. M. e seus principais constituintes químicos, 4-terpineol e 1,8-cineol, em músculo liso respiratório de rato.** 2004 (237f). Tese (Doutorado em Farmacologia). Faculdade de Medicina., Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

BHARADWAJ, A.; AGRAWAL, D. K. Immunomodulation in asthma: a distant dream or a close reality? **International Immunopharmacol.**, V. 4, p. 495-511, 2004.

BOERS J. E.; AMBERGEN A. W.; THUNNISSEN F. B. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 157(6), p. 2000-20006, 1998.

BOLTON, T. B. Cholinergic mechanisms in smooth muscle. **Br Med Bull.**, v. 35, n. 3, p. 275-283, 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.

BOOTMAN, M. D. et al. Calcium signaling-an overview. **Seminars in Cell and Development Biology**, v. 12, p. 3-10, 2001

BORREGAARD, N.; COWLAND, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v. 89, p. 3503-3521, 1997.

BOUSQUET, J.; CHANEZ, P.; LACOSTE, J. Y. Eosinophilic inflammation in asthma. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 1033-1039, 1990.

BOWLER, R. P.; CRAPO, J. D. Oxidants stress in allergic respiratory diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, p. 349-356, 2002.

BRADDING, P.; HOLGATE, S. T. The mast cell as a source of cytokines in asthma. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 796, p. 272-281, 1996.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BRASIL, Presidência da República – Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Decreto Nº 5.459**, de 7 de janeiro de 2005.

BRASIL, Presidência da República – Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Medida Provisória Nº 2.186-16**, de 23 de agosto de 2001.

BRIGHTING, C. E. et al. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. **N. Engl. J. Med.**, v. 346, p. 1699-1705, 2002.

BUIST, A. S. Guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease. **Respir Med.**, v. 96 (Suppl C), p. S11-S16, 2002.

BUSSE, W. W.; LEMANSKE, R. F. Asthma. **N Engl. J Méd.**, v. 344, p. 350-362, 2001.

CAMPOS, H.; XISTO, D.; ZIN, W. A.; ROCCO, P. R. M. Inibidores de fosfodiesterases: novas perspectivas de uma antiga terapia na asma? **J. Pneumologia**, v. 29, n. 6, p. 405-412, 2003.

CANNING, B. J.; FISCHER, A. Neural regulation of airway smooth muscle tone. **Respir Physiol.**, v. 125, p. 113–127, 2001.

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.

CARAMORI, G; ADCOCK, I. Pharmacology of airway inflammation in asthma and COPD. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 16, p. 247-277, 2003.

CARAMORI, G.; PAPI, A. Oxidants and asthma. **Thorax**, v. 59, p. 170-173, 2004.

CARL, A.; LEE, H. K.; SANDERS, K. M. Regulation of ion channels in smooth muscle by calcium. **Am. J. Physiological**, v. 271, p. C9-C34, 1996.

CARRIERE, V. et al. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 282-287, 2007.

CARTIER, A.; THOMSON, N. C.; FRITH P. A.; ROBERTS, R.; HARGREAVE F. E. Allergen-induced increase in bronchial responsiveness to histamine: relationship to the late asthmatic response and change in airway calibre. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 70, p. 170-177, 1982.

CEYHAN, B. B.; ENC, F. Y.; SAHIN, S. IL-2 and IL-10 levels in induced sputum and serum samples of asthmatics. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, v. 14, p. 80-85, 2004.

CHEN, C.; WAGONER, P. K. Endothelin induces a nonselective cation current in vascular smooth muscle cells. **Circ. Res.**, v. 69, p. 447-454, 1991.

CHIBA, Y.; MISAWA, M. Alteration in Ca^{2+} availability involved in antigen-induced airway hyperresponsiveness in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 278, p. 79-82, 1995.

CHINEN, J.; SHEARER, W. T. Advances in Asthma, Allergy and Immunology Serie 2004: Basic and clinical immunology. **J Allergy Clin. Immunol.**, v. 114, n° 2, p. 398-405, 2004.

CHUNG, K. F. Role of inflammation in the hyperreactivity of the airways in asthma. Editorial. **Thorax**, v. 41, p. 557-662, 1986.

CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. Cytokines in asthma. **Thorax**, v. 54, p. 825-857, 1999.

CHUNG, K. F.; ROGERS, D. F.; BARNES, P. J.; EVANS, T. W. The role of increased airway microvascular permeability and plasma exudation in asthma. **Eur. Respir. J.**, v. 3, p. 329-337, 1990.

CIEUTAT, A. M.; LOBEL, P.; AUGUST, J. T.; KJELDSEN, L.; SENGELOV, H.; BORREGAARD, N.; BAINTON, D. F. Azurophilic granules of human neutrophilic leukocytes are deficient in lysosome-associated membrane proteins but retain the mannose 6-phosphate recognition marker. **Blood**, v. 91, n. 3, p. 1044-1058, 1998.

COBURN, R. F.; BARON, C. B. Coupling mechanisms in airway smooth muscle. **Am J Physiol.**, v. 258(4 Pt 1), p. L119-33, 1990.

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

COCKCROFT, D. W.; MURDOCK, K. Y. Comparative effects of salbutamol, sodium cromoglycate and beclomethasone dipropionate on allergen-induced early asthmatic responses, late esthmatic responses, and increased bronchial responsiveness to histamine. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 79, p. 734-740, 1987.

COELHO-DE-SOUZA, L. N., LEAL-CARDOSO, J. H., MATOS, F. J. A., LAHLOU, S., MAGALHÃES, P. J. C. Relaxant Effects of the Essential Oil of *Eucalyptus tereticornis* and its Main Constituent 1,8-cineole on Guinea-Pig Tracheal Smooth Muscle. **Planta Med.** 71:1173-1175, 2005.

COLERIDGE, H. M.; COLERIDGER, J. C. Airway axon reflexes-where now? **Physiology Science**, v. 10, p. 91-96, 1995.

- COLERIDGE, J. C.; COLERIDGER, H. M. Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 99, p. 1-110, 1984.
- COOKSON W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. **Nature**, v. 420, p. B5-B11, 1999.
- CORDELL, G. A. Biodiversidade and drug discovery – a simbiotic relationship. **Phytochemistry**, v. 55, p. 463-480, 2000.
- CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste do Brasil**, Edições UFC, Fortaleza, CE, 1981.
- CUTHBERT, N. J.; GARDINER, P. J.; NASH, K.; POLL, C. T. Roles of Ca^{2+} influx and intracellular and Ca^{2+} release in agonist-induced contractions in guinea pig tracheal. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. L620-627, 1994.
- DALMEIER, K.; CARLINI, E. A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. **Pharmacol.**, v. 22, p. 113-127, 1981.
- DAVIES, B.; BROOKS, G.; DEVOY, M. The efficacy and safety of salmeterol compared to theophylline: meta-analysis of nine controlled studies. **Respi. Med.**, v. 92, p. 256-263, 1998.
- DeMONCHY, 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.
- DEMPSEY, O. J.; KENNEDY, G.; LIPWORTH, B. J. Comparative efficacy and anti-inflammatory profile of once-daily therapy with leukotriene antagonist or low-dose inhaled corticosteroid in patients with mild persistent asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 109, p. 68-74, 2002.
- DEWHIRST, F. E. Structure-activity relationships for inhibition of prostaglandin cyclooxygenase by phenolic compounds. **Prostaglandins**, v. 20, p. 209-222, 1980.
- DIAZ, P.; GONZALEZ, 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. (abstract). **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 77, p. 244, 1986.
- DIÓGENES-BASTOS, V.P. **Sensibilização Antigênica e Resposta Contráctil Taquicininérgica em traquéias Isoladas de Cobaias**. 2001. 168f. Dissertação (mestrado em farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.
- DOIDGE, J. M.; SATCHELL, D. G. Adrenergic and non-adrenergic inhibitory nerves in mammalian airways. **J. Auto. Nerv. Syst.**, v. 5, n. 2, p. 83-99, 1982.

DORAN, J. C. Commercial sources, uses, formation, and biology. In: BOLAND, D. J.; BROPHY, J. J.; HOUSE, A. P. N. **Euaclyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing**. Melbourne: Inkata, 1991, p. 11-18

DORTCH-CARNES, J.; SCOTT, M. R.; FEDAN, J. S. Changes in smooth muscle tone during osmotic challenge in Relation to epithelial bioelectric events in guinea pig isolated tracheal. **J. of Pharmacol. And Exper. Therapeutic.**, v. 289, n. 2, p. 911-917, 1999.

DUCHARME, F. M.; HICKS, G. C. Anti-leukotriene agents compared to inhaled corticosteroids in the management of recurrent and/or chronic asthma in adults and children. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 3, p. CD002314, 2002

DUISKEN, M.; SANDNER, F.; BLOMEKE, B.; HOLLENDER, J. Metabolism of 1,8-cineole by human cytochrome P450 enzymes: identification of a new hydroxylated metabolite. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1722, p. 304-311, 2005.

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.

DUSSER, D. J. ; JACOBY, D. B.; DJOKIC, T. D.; RUBINSTEIN, I.; BORSON, D. B.; NADEL, J. A. Virus induces airway hyperresponsiveness to tachykinins: role of neutral endopeptidase. **J. Appl. Physiol.**, v. 67, n. 4, p. 1504-1511, 1989.

ELIAS, J. A.; LEE, C. G.; ZHENG, T.; MA, B.; HOMER, R. J.; ZHU, Z. New insights into the pathogenesis of asthma. **J. Clin. Invest.**, v. 111, n. 3, p. 291-297, 2003.

EPSTEIN, M. M. DO mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 133, p. 84-100, 2004.

EVANGELISTA, G. L.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SANTOS, C. F.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LOPES, E. A.; DOS SANTOS, M. V.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **J Ethnopharmacol.**, v, 109, n. 3, p. 515-522, 2006.

EVANS MJ, VAN WINKLE LS, FANUCCHI MV, PLOPPER CG. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. **Exp Lung Res.**, v. 27, p. 401-415, 2001.

FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bull World Health Organ**, v. 63, n. 6, p. 965-981, 1985.

FERNANDES, D. J.; RICHARD, W. M.; LAKSER, O.; DOWELL, M.; STEWART, A. G.; SOLMAY, J. Airway hyperresponsiveness: from molecules to bedside. Invited Review: Do inflammatory mediators influence the contribution of airway smooth muscle contraction to airway hyperresponsiveness in asthma? **Journal of Applied Physiology**, v. 95, p. 844-853, 2003.

FINNERTY, J. P.; LEE, C.; WILSON, S.; MADDEN, J.; DJUKANOVIC, R.; HOLGATE, S. T. Effects of theophylline on inflammatory cells and cytokines in asthmatic subjects: a placebo-controlled parallel group study. **Eur. Respir. J.**, v. 9, p. 1672-1677, 1996.

FISH, J. E.; ISHAEL, E.; MURRAY, J. J.; EMMETT, A.; BOONE, R.; YANCEY, S. W.; RICKARD, K. A. Salmeterol powder provides significantly better benefit than montelukast in asthmatic patients receiving concomitant inhaled corticosteroid therapy. **Chest**, v. 120, p. 423-430, 2001.

FOLKERTS, G.; NIJKAMP, F. P. Airway epithelium: more than just a barrier! **Trends Pharmacol Sci.**, v. 19, n. 8, p. 334-341, 1998.

FOLKERTS, G.; NIJKAMP, F. P. Nitric oxide in asthma therapy. **Curr Pharm Des.**, v. 12, n. 25, p. 3221-3232, 2006.

FONTENELE, J. B. **Estudo farmacológico da fração hexânica de *Lonchocarpus sericeus* (Poir.) Kunth e seus constituintes químicos, lonchocarpia e derricina.** 2004. 262f. Tese (doutorado em farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

FOSTER, R. W.; SMALL, R. C.; WESTON, A. H. The spasmogenic action of potassium chloride in guinea-pig trachealis. **Br. J. Pharmac.**, v. 80, p. 553-559, 1983.

FOSTER, R. W.; OKPALUGO, B. I.; SMALL, R. C. Antagonism of Ca²⁺ and other actions of potassium chloride in guinea-pig trachealis. **Br. J. Pharmac.**, v. 81, n. 3, p. 499-507, 1984.

FRYER, A. D.; ADAMKO, D. J.; YOST, B. L.; JACOBY, D. B. Effects of inflammatory cells on neuronal M2 muscarinic receptor function in the lung. **Life Sci.**, v. 64, p. 449-455, 1999.

GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, p. 445-454, 2008.

GONZALEZ-AMARO, R.; SANCHEZ-MADRID, F. Cell adhesion molecules: selectins and integrins. **Critical Reviews in Immunology**, v. 19, p. 389-429, 1999.

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

GRUNDSTROM, M.; ANDERSSON, R. G. G.; WIKBERG, J. E. S. Pharmacological characterization of the autonomous innervation of the guinea pig tracheobronchial smooth muscle. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v. 49, p. 150-157, 1981.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Pallazo-de-Mello, J. C.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis, 2ª ed., Ed. Universidade-UFRGS, Ed. UFSC, 2000, cap. 1, p. 11-14.

HAAHTELA, T.; JÄRVINEN, M.; KAVA, T.; KIVIRANTA, K.; KOSKINEN, S.; LEHTONEN, K.; NIKANDER, K.; PERSSON, T.; REINIKAINEN, K.; SELROOS, O. Comparison of a β_2 -agonist, terbutaline, with an inhaled corticosteroid, budesonide, in newly detected asthma. **N Engl J Med.**, v. 325, p. 388-392, 1991.

HAAHTELA, T.; JÄRVINEN, M.; KAVA, T.; KIVIRANTA, K.; KOSKINEN, S.; LEHTONEN, K.; NIKANDER, K.; PERSSON, T.; SELROOS, O. et al. Effects of reducing or discontinuing inhaled budesonide in patients with mild asthma. **N Engl J Med.**, v. 331, p. 700-705, 1994.

HARAGUCHI M, SHIMURA S, SHIRATO K. Morphometric analysis of bronchial cartilage in chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 159, p. 1005-1013, 1999.

HARGREAVE, F. E.; RAMSDALE, E. H.; KIRBY, J. G.; O'BYRNE, P. M. Asthma and the role of inflammation. **Eur. J. Respir. Dis.**, v. 69, suppl. 147, p. 16-21, 1986.

HARKEMA, J. R.; WAGNER, J. G. Epithelial and inflammatory responses in the airway of laboratory rats coexposed to ozone and biogenic substances: Enhancement of toxicant-induced airway injury, **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 57, p. 129-141, 2005.

HENRICKS, P. A.; NIJKAMP, F. P. Reactive oxygen species as mediators in asthma. **Pulmonary Pharmacol. & Therapeutics**, v. 14, p. 409-420, 2001.

HESS, P. Calcium channels in vertebrate cells. **Ann. Rev. Neurosci.**, v. 13, p. 1337-1356, 1990.

HIBBS, M. S.; BAINTON, D. F. Human neutrophil gelatinase is a component of specific granules. **Journal of Clinical Investigation**, p. 1395-1402, 1989

HIROTA, K; HASHIBA, E.; YOSHIOKA, H.; KABARA, S.; MATSUKI, A. Effects of three different L-type Ca^{2+} entry blockers on airway constriction induced by muscarinic receptor stimulation. **Br. J. Anaesth.**, v. 90, n. 5, p. 671-675, 2003.

HOLGATE, S. T. Inflammatory and structural changes in the airway of patients with asthma. **Respir. Med.**, v. 94, p. S3-S6, 2000.

HOLGATE, S. T.; BRADDING, P.; SAMPSON, A. P. Leukotriene antagonists and synthesis inhibitors: new directions in asthma therapy. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 98, p. 1-13, 1996.

HOLGATE, S. T.; PETERS-GOLDEN, M.; PANETTIERI, R. A.; HENDERSON, W. R. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation smooth muscle function and remodeling. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. S18-S34, 2003.

HOLZER, P. Local effector function of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v. 24, p. 739-768, 1988.

HOWARTH, P. H. et al. Tumour necrosis factor (TNF α) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. **Thorax**, v. 60, p. 1012-1018, 2005.

HUTSON, P. A. **Investigations into the mechanisms of late phase responses in guinea pig airways**. 1989. 282 f. Thesis (Doctor of Philosophy) – Faculty of Medicine, University of Southampton.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, p. 673-687, 2002.

INOUE, R.; KURIYAMA, H. Dual regulation of cation-selective channels by muscarinic and α 1-adrenergic receptors in the rabbit portal vein. **J. Physiol. Lond**, v. 465, p. 427-448, 1993.

JAGER, W. et al. Pharmacokinetic studies of the fragrance compound 1,8-cineol in humans during unhalation. **Chemical Senses.**, v. 21, n. 4, p. 4577-480, 1996.

JACOBY, D. B.; FRYER, A. D. Anticholinergic therapy for airway diseases. **Life Sci.**, v. 68, p. 2565-2572, 2001.

JAMES, A. L.; CARROLL, N. Theoretic effects of mucus gland discharge on airway resistance in asthma. **Chest**, v. 107, p. 110S, 1995.

JEFFERY, P. K. Comparison of the structural and inflammatory features COPD and asthma. **Chest**, v. 117, p. 2515-2605, 2000.

JEFFERY, P. K.; VENGE, P.; GIZYCKI, M. J.; EGEROD, I.; DAHL, R.; FAURSCHOU, P. Effects of salmeterol on mucosal inflammation in asthma: a placebo-controlled study. **Eur. Respir. J.**, v. 20, p. 1378-1385, 2002.

JEFFERY, P. K.; WARDLAW, S. G.; NELSON, J. C.; COLLINS, J. V.; KAY, A. B. Bronchial biopsies in asthma: An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. **Am Rev. Respir. Dis.**, v. 140, p. 1745-1753, 1989.

JOHN, M.; LIM, S.; SEYBOLD, J.; JOSE, P.; ROBICHAUD, A.; O'CONNOR, B.; BARNES, P. J.; CHUNG, K. F. Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein- α , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon- γ release from alveolar macrophages in asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 157, p. 256-262, 1998.

JOHNSON, M.; RENNARD, S. Alternative mechanisms for long-acting beta(2)-adrenergic agonists in COPD. **Chest**, v. 120, p. 258-270, 2001.

JONES, G. E. Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 68, p. 593-602, 2000.

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

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

JOSEPH, M.; TONNEL, A. B.; CAPRON, A.; DESSAINT, J. P. The interaction of IgE-antibody with human alveolar macrophages and its participation in the inflammatory processes of the lung allergy. **Agents Actions**, v. 11, p. 619-622, 1981.

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.

JUCÁ, D. M. **Propriedades farmacológicas dos monoterpenos α - e β - Pinenos no músculo liso gastrintestinal de ratos: efeito miorelaxante e pró-cinético.** 2007. 87f. Dissertação (mestrado em farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

JUERGENS, U. R.; STOBER, M.; SCHMIDT-SCHILLING, L.; KLEUVER, T.; VETTER, H. Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. **Eur. J. Med. Res.**, v. 3, n. 9, p. 407-412, 1998.

JUERGENS, U. R.; STOBER, M.; VETTER, H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes in vitro. **Eur. J. Med. Res.**, v. 3, n. 11, p. 508-510, 1998.

JUERGENS, U.R., DETHLEFSEN, U., STEINKAMP, G., GILLISSEN, A., REPGES, R., VETTER, H. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respiratory Medicine**, v. 97, p. 250-256, 2003.

JUERGENS, U. R.; ENGELEN, T.; RACKÉ, K.; STOBER, M.; GILLISSEN, A.; VETTER, H. Inhibitory activity of 1,8-cineole (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 17, p. 281-287, 2004.

JUPITER, E. F.; KLINE, P. A.; VANZIELEGHEM, M. A.; HARGREAVE, F. E. Reduction of budesonide after a year of increased use: a randomized controlled trial to evaluate whether improvements in airway responsiveness and clinical asthma are maintained. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 87, p. 483-489, 1991.

KALINER, M. Allergic diseases in the new millennium. **Postgrad Med.**, v. 106, p. 5-6, 1999.

KEINAN, E.; ALT, A.; AMIR, G.; BENTUR, L.; BIBI, H.; SHOSEYVOV, D. Natural ozone scavenger prevents asthma in sensitized rats. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 557-562, 2005.

KELLY, K.; SPOONER, C. H.; ROWE, B. H. Nedocromil sodium vs. sodium cromoglycate for preventing exercise-induced bronchoconstriction in asthmatics. **Cochrane Database Syst Rev.**, 2000; CD002731.

KERSTJENS, H. A.; BRAND, P. L.; HUGHES, M. D.; ROBINSON, N. J.; POSTMA, D. S.; SLUITER, H. J.; BLEECKER, E. R. A comparison of bronchodilator therapy with or without inhaled corticosteroid therapy for obstructive airway disease. **N Engl J Med.**, v. 327, p. 1423-1429, 1992.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **J. Phamacol. Sci.**, v. 96, p. 229-245, 2004.

KIM, H. R.; HOQUE, M.; HAI, C. M. Cholinergic receptor-mediated differential cytoskeletal recruitment of action- and integrin-binding proteins in intact airway smooth muscle. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 287, p. 1375-1383, 2004

KIMOTO, A.; SAITOU, M.; HIRANO, Y.; IWAI, T.; TOMIOKA, K.; MIYATA, K.; YAMADA, T. A new, simple method for measuring mucociliary clearance in guinea-pig. **Pulmonary Pharmacol. & Therapeutics**, v. 12, p. 49-54, 1999.

KIPS, I. C. et al. Murine models of asthma. **Eur. Respir. J.**, v. 22, p. 374-382, 2003.

KIRKPATRICK, C. T. Excitation and contraction in bovine tracheal smooth muscle. **J Physiol.**, v. 244, n. 2, p. 263-281, 1975.

KITA, H.; ABU-GHAZALEH, R. I.; GLEICH, G. J.; ABRAHAM, R. T. Regulation of Ig-induced eosinophil degranulation by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. **J. Immunol.**, v. 146, p. 2712-2718, 1991.

KLOCKE, J.A.; DARLINGTON, M.V.; BALANDRIN, M.F. 1,8 cineole (eucalyptol), a mosquito feeding and ovipositional repellent from volatile oil of *Hemizonia fitchii* (Asteraceae). **Journal of Chemical Ecology**, v.13, p.2131-2141, 1987.

KOHYAMA, T.; LIU, X.; WEN, F-Q.; ZHU, Y. K.; WANG, H.; KIM, H. J. et al. PDE4 inhibitors attenuate fibroblast chemotaxis and contraction of native collagen gels. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v. 26, p. 694-701, 2002.

KOLSET, S. O.; GALLAGHER, J. T. Proteoglycans in haemopoietic cells. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1032, p. 191-211, 1990

KOMORI, S.; KAWAI, M.; TAKEWAKI, T.; OHASHI, H. GTP-binding protein involvement in membrane currents evoked by carbachol and histamine in guinea-pig ileal muscle. **J. Physiol. Lond.**, v. 450, p. 105-126, 1992.

KRANEVELD, A. D.; JAMES, D. E.; VRIES, A.; NIJKAMP, F. P. Excitatory non-adrenergic-non-cholinergic neuropeptides: key players in asthma. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, p. 113-129, 2000.

KUMAR, R. K. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 91, p. 93-104, 2001.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia – Bases Patológicas da Doença**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUNG, T. T. et al. Mast cells modulate allergic pulmonary eosinophilia in mice. **Am. J. of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 12, n. 4, p. 404-409, 1995.

LAHLOU, S.; FIGUEIREDO, A. F.; MAGALHÃES, P. J.; LEAL-CARDOSO, J. H.; Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 80, n. 12, p. 1125-1131, 2002.

LAITINEN, L. A.; LAITINEN, A. Innervation of airway smooth muscle. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 136, p. S38-S42, 1987

LAITINEN, L. A.; HEINO, M.; LAITINEN, A.; KAVA, T.; HAAHTELA, T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 131, p. 599-606, 1988.

LAU, D. et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 431-436, 2005.

LAUDE, E. A.; MORICE, A. H.; GRATTAN, T. J. The Antitussive effects of menthol, camphor and cineole in conscious guinea-pig. **Pulmonary Pharmacology**, v. 7, p. 179-184, 1994

LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**. 2 ed. Rio de Janeiro: Record, 1993.

LAZARUS, S. C.; BOUSHEY, H. A.; FAHY, J. V.; CHINCHILLI, V. M.; LEMANSKE, R. F. Jr.; SORKNESS, C. A.; KRAFT, M.; FISH, J.E.; PETERS, S. P.; CRAIG, T.; DRAZEN, J. M.; FORD, J. G.; ISRAEL, E.; MARTIN, R. J.; MAUGER, E. A.; NACHMAN, S. A.; SPAHN, J. D.; SZEFLER, S. J. Long-acting beta2-agonist monotherapy vs continued therapy with inhaled corticosteroids in patients with persistent asthma: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 285, p. 2583-2593, 2001.

LEAL, L. K. A. M. **Contribuição para a validação do uso medicinal de *Amburana cearensis* (CUMARU): estudos farmacológicos com o isocampferídio e o amburosídeo**. 2006. 178f. Tese (doutorado em farmacologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

LEE, H. K.; SHUTTLEWORTH, C. W.; SANDERS, K. M. Tachykinins active nonselective cation currents in canine colonic myocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. C1463-C1471, 1995.

LEE, L. Y.; PISARRI, T. E. Afferent properties and reflex functions of bronchopulmonary c-fibers. **Respiration Physiology**, v. 125, p. 47-65

LEI, M.; GHEZZO, H.; CHEN, M. F.; EIDELMAN, D. H. Airway smooth muscle orientation in intraparenchymal airway. **Am. Appl. Physiol.**, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1997.

LEMANSKE, R. F. Jr.; SORKNESS, C. A.; MAUGER, E. A.; LAZRUS, S. C.; BOUSHEY, H. A.; FAHY, J. V.; DRAZEN, J. M.; CHINCHILLI, V. M.; CRAIG, T.; FISH, J.E.; FORD, J. G.; ISRAEL, E.; KRAFT, M.; MARTIN, R. J.; NACHMAN, S. A.; PETERS, S. P.; SPAHN, J. D.; SZEFLER, S. J. inhaled corticosteroid reduction and elimination in patients with persistent asthma receiving salmeterol: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 285, p. 2594-2603, 2001.

LEUNG, K. B.; FLINT, K. C.; BROSTOFF, J.; HUDSPITH, B. N.; JOHNSON, N. M.; LAU, H. Y.; LIU, W. L.; PEARCE, F. L. Effects of sodium cromoglycate and nedocromil sodium on histamine secretion from human lung mast cells. **Thorax**, v. 43, p. 756-761, 1988.

LIMA, V. **Evidências da participação de TNF- α e COX-2 nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5-Fluorouracil e Metotrexato em animais.** 2004. 197f. Tese (doutorado em farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

LIN, C. H.; LAI, Y. L. Mast cell mediators in citric acid-induced airway constriction of guinea pigs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 206, p. 343-350, 2005.

LIN, H.; CASALE, T. B.; Treatment of allergic asthma. **Am. Rev. of Respir. Disease**, v. 16 (113 suppl. 9A), p. S8-S16, 2002.

LIPWORTH, B. J.; AZIZ, I. A high dose of albuterol does not overcome bronchoprotective subsensitivity in asthmatic subjects receiving regular salmeterol or formoterol. **J. Allergy Clin Immunol.**, v. 103, p. 88-92, 1999.

LIPWORTH, B. J.; JACKSON, C. Lack of subsensitivity to albuterol after treatment with salmeterol in patients with asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 160, p. 2125-2126, 1999.

LONG, A. A. Immunomodulators in the treatment of asthma. **Allergy Asthma**, v. 30, p. 109-119, 2009.

LOUGHRIN, J. H.; KASPERBAUER, M. J. Aroma content of fresh basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves is affected by light reflected from colored mulches. **A. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 8, p. 2272-2276, 2003.

LUNDBERG, J. M.; SARIA, A. Bronchial smooth muscle contraction induced stimulation of capsaicin-sensitive sensory neurons. **Acta. Physiol. Scand.**, v. 116, p. 473-476, 1982.

LUNDBERG, J. M.; SARIA, A. Capsaicin-induced desensitization of the airway mucosa to cigarette smoke, mechanical and chemical irritants. **Nature**, v. 302, p. 251-253, 1983.

LUNDGREN, J. D., SHELHAMMER, J. H. Pathogenesis of airway mucus hypersecretion. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 85, p. 399-419, 1990.

LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L.S.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L. Essential oils of some Amazonian Zingiberaceae, 3 genera *Alpinia* and *Rengalmia*. **J. Nat Prod.**, v. 47, n. 5, p. 907-908, 1984.

LYON, H.; LANGE, C.; LAKE, S.; SILVERMAN, E. K.; RANDOLPH, A. G.; KWIATKOWSKI, D. IL-10 gene polymorphisms are associated with asthma phenotypes in children. **Genet. Epidemiol.**, v. 26, p. 155-165, 2004.

MAARSINGH, H.; TIO, M. A.; ZAAGSMA, J.; MEURS, H. Arginase attenuates inhibitory nonadrenergic noncholinergic nerve-induced nitric oxide generation and airway smooth muscle relaxation. **Respiratory Research**, v. 6, p. 23, 2005.

MADGER, L. A.; PROBER, J. S. TNF signaling in vascular endothelial cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 70, p. 317-325, 2001.

MADYASTHA, K. M.; CHADHA, A. Metabolismo of 1,8-cineole in rat: its effects on liver and lung microsomal cytochrome P-450 systems. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 37, p. 759-766, 1986.

MAFFEIS, A. R.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; BRITO, J. O. Macronutrients and boron deficiencies reflexes on plant growth, production and essential oil in *Eucalyptus citriodora*. **Scientia Forestalis**, v. 57, p. 87-98, 2000.

MAGALHÃES PJ, CRIDDLE DN, TAVARES RA, MELO EM, MOTA TL, LEAL-CARDOSO JH. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytotherapy Res.**, v. 12, n. 3, p. 172-177, 1998.

MAGALHÃES PJ, LAHLOU S, JUCÁ DM, COELHO-DE-SOUZA LN, DA FROTA PT, DA COSTA AM, LEAL-CARDOSO JH. Vasorelaxation induced by the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. **Fundam Clin Pharmacol.**, v. 22, n. 2, p. 169-177, 2008.

MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; SANTOS, M. A. V.; PRADINES, T. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Myorelaxant effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on the contractile activity of the guinea-pig tracheal smooth muscle. **Planta Medica**, v. 69, p. 874-877, 2003.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; INTRONA, M. Endothelium activation by cytokines. **Annals of the New York Academy of Sciences**, V. 832, P. 93-116, 1997.

MAROM, Z., SHELHAMMER, J.H., BACH, M.K., MORTON, D.R., KALINER, M. Slow-reacting substances, leukotrienes C4 and D4, increase the release of mucus from human airways *in vitro*. **Am. Rev. Respir. Dis.** V. 126, p. 449-451, 1982.

MARTINEZ, F. D. Role of respiratory infection in onset of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Clin. Exp. Allergy**, v. 29 (Suppl 2), p. 53-81, 1999.

MARUYAMA, Y.; LINDHOLM, B.; STENVINKEL, P. Inflammation and oxidative stress in ESRD--the role of myeloperoxidase. **J Nephrol.**, v. 17, suppl. 8, p. S72-S76, 2004.

MASINI, E. et al. Effect of a plant histaminase on asthmalike reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pig. **European Journal of Phamacology**, v. 502, p. 253-264, 2004.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil.** 2 ed. Fortaleza: Imprensa Universitária-UFC, 2000, 344p.

MATOS, F. J. A.; FERNANDES, A. **Relatórios de excursões do programa estudo químico de óleos essenciais de plantas nativas e cultivadas no nordeste.** Convênio BNB-CNPq-UFC, 1975-1978.

MATSAS, R. A.; THOMSON, A. H. New asthma guidelines. **Current Paediatrics**, v. 14, p. 329-335, 2004.

MATSUSE, T.; THOMSON, R. J.; CHEN, X. R.; SALARI, H.; SCHELLENBERG, R. R. Capsaicin inhibits airway hyperresponsiveness but not lipoxygenase activity or eosinophilia after repeated aerosolized antigen in guinea pig. **Am. Ver. Respir. Dis.**, v. 144, p. 368-372, 1991.

MAUAD, T.; SOUZA, A. S. L.; SALDIVA, P. H. N.; DOLHNIKOFF, M. Remodelamento brônquico na asma. **J. Pneumologia**, V. 26, N.2, 2000.

MAZZONE, S. B.; CANNING, B. J. Evidence for differential reflex regulation of cholinergic and noncholinergic parasympathetic nerves innervating the airways. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 165, n. 8, p. 1076-1083, 2002.

MCEVER, R. P. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, p. 581-586, 2002

McFADDEN, E. R. Jr., GILBERT, I. A. Asthma. **N. Engl. J. Med.**, v. 327, n. 27, p. 1928-1937, 1992.

METZGER, W. J.; RICHERSON, H. B.; WORDEN, K.; MONICK, M.; HUNNINGHATE, G. W. Bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic patients following allergen provocation. **Chest**, v. 89, p. 477-483, 1986.

METZGER, W. J.; ZAVALA, D.; RICHERSON, 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.

MIYAZAWA, M.; NAKAMURA, Y.; ISHIKAWA, Insecticidal sesquiterpene from *Alpinia oxyphylla* againsts *Drosophila melanogaster*. **J. Agric. Food Chem.** V. 48, n. 8, p. 3639-3641, 2000.

- MIYAZAWA, M.; SHINDO, M.; SHIMADA, T. Oxidation of 1,8-cineol, the monoterpene cyclic ether originated from *Eucalyptus polybractea*, by cytochrome P450 3A enzymes in rat and human liver microsomes. **Drug. Metab. Dispos.**, v. 29, p. 200-205, 2001.
- MONTEFORT, S.; ROBERTS, J. A.; BEASLEY, R.; HOLGATE, S. T.; ROCHE, W. R. The site of disruption of the bronchial epithelium in asthmatic and non-asthmatic subjects. **Thorax**, v. 47, p. 499-503, 1992.
- MORENO, R. H.; HOGG, J. C.; PARE, P. D. Mechanics of airway narrowing. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 133, p. 1171-1180, 1986.
- MOURA, C. T.; BEZERRA, F. C.; DE MORAES, I. M.; MAGALHÃES, P. J.; CAPAZ, F. R. Increased responsiveness to 5-hydroxytryptamine after antigenic challenge is inhibited by nifedipine and niflumic acid in rat trachea in vitro. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 32, n. 12, p. 1119-23, 2005.
- MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Laboratory Investigation**, v. 82, p. 521-534, 2002.
- MURRAY, R.K.; KOTLIKOFF, M. I. Receptor-activated calcium influx in human airway smooth muscle cells. **J. Physiol.**, v. 435, p. 123-144, 1991.
- NABOKINA, S. M. Intracellular localization of VAMP-1 protein in human neutrophils. **Bull Exp Biol Med.**, v. 131, n. 2, p. 130-131, 2001.
- NADEL, J. A. Autonomic regulation of airway smooth muscle. **Physiology and Pharmacology of the airways**, p. 217-257, 1980.
- NAKAJIMA M, et al. Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, Clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways. **Pathol Int.**, v. 48, p. 944-953, 1998.
- NAKAZAWA, K.; INOUE, K.; FUJIMORI, K.; TAKANAKA, A. Difference between substance P- and acetylcholine-induced currents in mammalian smooth muscle cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 179, p. 453-456, 1990.
- NARAHASHI T, MOORE JW, SCOTT WR. Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. **J Gen Physiol.**, v. 47, p. 965-974, 1964.
- NASCIMENTO, N. R. F.; REFOSCO, R. M. C.; VASCONCELOS, E. C. F.; KERNTOPF, M. R.; SANTOS, C. F.; BATISTA, F. J. A.; SOUSA, C. M.; FONTELES, M. C. 1,8-cineole induces relaxation in rat and guinea-pig airway smooth muscle. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 61: 361-366, 2009.
- NELSON, H. S.; BUSSE, W. W.; KERWIN, E.; CHURCH, N.; EMMETT, A.; RICKARD, K.; KNOBI, K. Fluticasone propionate/salmeterol combination provides more effective asthma control than low-dose inhaled corticosteroid plus montelukas. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 106, p. 1088-1095, 2000.

NELSON, J. A.; STRAUUSS, L.; SKOWRONSKI, M.; CIUFO, R.; NOVAK, R.; MCFADDEN, E. R. Effects of long-term salmeterol treatment on exercise-induced asthma. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, p. 141-146, 1998.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am J Physiol.**, v. 268 (4 Pt 1), p. C799-C822, 1995.

NISHIO, N.; OKAWA, Y.; SAKURAI, H.; ISOBE, K. Neutrophil depletion delays wound repair in aged mice. **Age (Dordr)**, v. 30, n. 1, p. 11-19, 2008.

NORRIS, A. A. Pharmacology of sodium cromoglycate. **Clin. Exp. Allergy**, v. 26 (suplemento 4), p. 5-7, 1996.

NOUAILHETAS, V. L.; ABOULAFIA, J.; FREDIANI-NETO, E.; FERREIRA, A. T.; PAIVA, A. C. M. A Na⁺-sensitive cation channel modulated by angiotensin II in cultured intestinal myocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. C1538-C1543, 1994.

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.

O'DONNELL, S. R.; SAAR, N.; WOOD, L. J. The density of adrenergic nerves et various levels in the guinea pig lung. **Clin. Exp. Pharmacolo. Physiol.**, v. 5, p. 325-332, 1978

OH, E. J.; MAZZONE, S. B.; CANNING, B. J.; WEINREICH, D. Reflex regulation of airway sympathetic nerves in guinea-pigs. **J Physiol.**, v. 573, n. 2, p. 549-564, 2006.

ONBASI, K.; SIN, A. Z.; DOGANAVSARGIL, B.; ONDER, G. F.; BOR, S.; SEBIK, F. Eosinophil infiltration of the oesophageal mucosa in patients with pollen allergy during the season. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 35, n. 11, p. 1423-1431, 2005.

OTTE, S. Los aceites esenciales: medicina redescubierta. **Dragaco**, v. 39, p. 91-109, 1994.

PAGE, S.; AMMIT, A. J.; BLACK, J. L.; AMOUR, C. L. Human mast cell and airway smooth muscle cell interactions: implications for asthma. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 281, p. L1313-L1323, 2001.

PAIVA, L. F. A.; RAO, V. S.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* óleo-resin on experimental gastric ulcer in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 62 p. 73-78, 1998.

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

PANETTIERI, R. A. et al. Effects of LTD4 on human airway smooth muscle cell proliferation, matrix expression and contraction in vitro: differential sensitivity to cysteinyl

leukotriene receptor antagonists. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 19, p. 453-461, 1998.

PASCUAL, R. M.; PETERS, S. P. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 116, p. 477-486, 2005.

PATTEMORE, P. K.; ASHER, H. I.; HARRISON, A. C.; MITCHELL, E. A.; REA, H. H.; STEWARD, A. W. The interrelationship among bronchial hyperresponsiveness, the diagnosis of asthma and asthma symptoms. **The American Rev. of Respir. Dis.**, v. 142, p. 549-554, 1990.

PATTMAICK, S.; SUBRAMANYAM, V. R.; BAPAJI, M.; KOLE, C. R. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, v. 89, p. 39-46, 1997

PAUWELS, R.A., BUIST, A.S., Ma P, JENKINS, C.R., HURD, S.S. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): executive summary. **Respire Care**, v. 46, p. 798-825, 2001.

PEARLMAN, D. S.; CHERVINSKY, P.; LAFORCE, C.; SELTZER, J. M.; SOUTHERN, D. L.; KEMP, J. P. et AL. A comparison of salmeterol with albuterol in the treatment of mild-to-moderate asthma. **N. Engl. J. Med.**, v. 327, p. 1420-1425, 1992.

PENDRY, Y. D. Neuronal control of airways smooth muscle. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 57, p. 171-202, 1993.

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

PERPINA, M.; CORTIJO, J.; FORNAS, E.; PALAU, M.; ORTIZ, J. L.; MORCILLO, E. Hyperreactivity and ⁴⁵Ca movements in sensitized guinea-pig tracheal muscle. **Eur. Respir. J.**, v. 4, p. 450-457, 1991.

PERPINA, M.; PALAU, M.; CORTIJO, J.; FORNAS, E.; ORTIZ, J. L.; MORCILLO, E. Sources of calcium for the contraction induced by various agonists in trachealis muscle from normal and sensitized guinea pigs. **Respiration**, v. 55, p. 105-112, 1989.

PERSSON, C. G. A. On the medical history of xanthines and other remedies for asthma: a tribute to HH Salter. **Thorax**, v. 40, p. 881-886, 1985.

PLATTS-MILES, T. A. E.; MITCHELL, E. B.; NOCK, P.; TOVERY, E. R.; MOSZORO, H.; WILKINS, S. R. Reduction of bronchial hyperreactivity during prolonged allergen avoidance. **Lancet**, v. 2, p. 675-677, 1982.

POLOSA, R.; RENAUD, L.; CACCIOLA, PROSPERINI, G.; CRIMI, N.; DJUKANOVIC, R. Sputum eosinophilia is more closely associated with airway

responsiveness to bradykinin than methacholine in asthma. **Eur. Respir. J.**, v. 12, p. 551-556, 1998.

POTTER, J. W.; SAEIAN, K.; STAFF, D.; MASSEY, B. T.; KOMOROWSKI, R. A.; SHAKER, R.; HOGAN, W. J. Eosinophilic esophagitis in adults: na emerging problem with unique esophageal features. **Gastrointestinal Endocopy**, v. 59, n. 3, p. 355-361, 2004.

PRETOLANI, M.; RUFFIE, C.; JOSEPH, D.; CAMPOS, M. G.; CHURCH, M. K.; LEFORT, J.; VARGAFTIG, B. B. Role of eosinophil activation in the bronchial reativity of allergic guinea pig. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 149, p. 1167-1174, 1994

QUAST, U. The K⁺ channel openers relax smooth muscle by opening K⁺ channels? **Trends In Pharmacological Sciences**, v. 14 p. 332-337, 1993.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Sistema Respiratório._____. **Farmacologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. Cap. 17, p. 280-291.

RASTOGI, P.; WHITE, M. C.; RICKARD, A.; MCHOWAT J. Potential mechanism for recruitment and migration of CD133 positive cells to areas of vascular inflammation. **Thromb. Res.**, v. 123, n. 2, p. 258-266, 2008.

REBER, L.; DA SILVA, C. A.; FROSSARD, N. Stem cell factor and its receptor c-kit as targets for inflammatory diseases. **Eur J Phamacol.**, v. 533, p. 327-340, 2006.

RENNARD, S. I.; ROMBERGER, D. J.; ROBBINS, R. A.; SPURZEM, J. R. Is asthma a epithelial disease? **Chest**, v. 107, p. 127-131, 1995

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

ROBINSON, D. S.; CAMPBELL, D.; BARNES, P. J. Addition of leukotriene antagonists to therapy in chronic persistent asthma: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 357, p. 2007-2011, 2001.

ROSS, H. M.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. Sistema respiratório. In: _____. **Histologia**: texto e atlas. 2 ed. São Paulo: panamericana, 1993. Cap. 18, p. 501-525

ROSSI, G. L.; OLIVIERI, D. Dose the mast cell still have a key role in asthma? **Chest**, v. 112, p. 523-529, 1997.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptores. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 217-242, 2000.

SAETTA, M.; FINKELSTEIN, R.; COSIO, M. G. Morphological and cellular basis for airway limitation in smokers. **Eur. Respir. J.**, v. 7, p. 1506-1515, 1994.

SANDERSON, M. J.; DELMOTTE, P.; BAI, Y.; PEREZ-ZOGBHI, J. F. Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca²⁺ signaling and sensitivity. **Proc Am Thorac Soc.**, v. 5, n. 1, p. 23-31, 2008.

SANTOS, F. A. **Estudo farmacológico de 1,8-cineol, um óxido terpênico presente em óleos essenciais de plantas**. 1999. 223f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

SANTOS, F.A., RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineol a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytother. Res.**, v. 14, p. 240-244, 2000.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S.; SILVEIRA, E. R. Antiinflammatory and analgesic activities of the essential oil of *Psidium guyanensis*. **Fitoterapia** LXVIII (1): 65-68, 1997.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S.; SILVEIRA, E. R. The leaf essential oil of *Psidium guyanensis* offers protection against pentylentetrazole-induced seizures. **Planta Med.**, v. 63, p. 133-135, 1997.

SAVARIA, D.; LANOUE, C.; CADIEUX, A.; ROUSSEAU, E. Large conducting potassium channel reconstituted from airway smooth muscle. **Am J Physiol.**, v. 262, p. L327–L336, 1992.

SBPT – sociedade de Pneumologia e Tisiologia – III Consenso brasileiro no manejo da asma. **Jornal de Pneumologia**, v. 28 (Supl. 1), 2002.

SCHLEIMER, R. P.; SCHULMAN, E. S.; MacGLASHAN, D. W. Jr.; PETERS, S. P.; HAYES, E. C.; ADAMS, G. K.; LICHTENSTEIN, L. M.; ADKINSON, N. F. Effects of dexamethasone on mediator release from human lung fragments and purified human lung mast cells. **J. Clin. Invest.**, v. 71, p. 1830-1835, 1983.

SHAND, D. G. Drug therapy: Propranolol. **N Engl J Med.** v. 293, n. 6, p. 280-285, 1975.

SHAH, S.; PAGE, C. P.; SPINA, D. Nociceptin inhibits non-adrenergic non-cholinergic contraction in guinea-pig airway. **Br J Pharmacol.**, v. 125, n. 3, p. 510-516, 1998.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

SILVA, S. R.; BUITRÓN, X.; OLIVEIRA, L. H.; MARTINS, M. V. M. **Plantas medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio**. Pesquisa financiada pelo Ministério de Cooperação Econômica e desenvolvimento da Alemanha e pelo Ibama, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SPTIZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, 2ª ed., Ed. Universidade-UFRGS, Ed. UFSC, p. 387-416, 1999.

SIMÕES, R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Ed. Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

- SMALL, R. C.; FOSTER, R. W. **Electrophysiology of the airway smooth muscle**. In: *Asthma: basic mechanisms and clinical management*. Academic Press-London. 1990.
- SOARES, M. C.; DAMIANI, C. E.; MOREIRA, C. M.; STEFANON, I.; VASSALLO, D. V. Eucalyptol, an essential oil, reduces contractile activity in rat cardiac muscle. **Braz J Med Biol Res.**, v. 38, n. 3, P. 453-461, 2005.
- SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol.**, v. 51, p. 1-15, 1996.
- SOLLEY, G. O.; GLEICH, G. J.; JORDAN, R. E.; SCHROETER, 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.
- SOLWAY, J.; LEFF, A. R. Sensory neuropeptides and airway function. **Journal of Applied Physiology**, v. 71, p. 2077-2087, 1991.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 17, p. 231-236, 1994.
- SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **The J. of Pharmacol. And Experimental Therap.**, v. 159, p. 129-145, 1968.
- SOUZA, D. G.; CASSALI, G. D.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **Br J Pharmacol.**, v. 134, n. 5, p. 985-994, 2001.
- SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17, p.1, 1985.
- SPATAFORA, M.; CHIAPPARA, G.; MERENDINO, A. M.; D'AMICO, D.; BELLIA, V.; BONSIGNORE, G. Theophylline suppresses the release of tumour necrosis factor-alpha by blood monocytes and alveolar macrophages. **Eur. Respir. J.**, V. 7, p. 223-228, 1994.
- STELMACH, I.; JERZYNSKA, J.; BOBROWSKA, M.; BRZOZOWSKA, A.; MAJAK, P.; KUNA, P. IL-10 serum levels in children with moderate asthma. **Pneumonol. Alergol. Pol.**, v. 70, p. 25-33, 2002.
- STEPHENS, N. L. Airway smooth muscle. **Lung**, v. 179, p. 333-373, 2002
- STERK, P. J. Virus-induced airway hyperresponsiveness. **The European Respir. Journal**, v. 6, p. 894-902, 1993.
- STERK, P. J.; BEL, E. H. Bronchial hyperresponsiveness: the need for a distinction between hypersensitivity and excessive airway narrowing. **Eur Respir J.**, v. 2, n. 3, p. 267-274, 1989.

SUFFREDINI, A. F. New insight into the biology of the acute phase response. **Journal of Clinical Immunology**, v. 19, p. 203, 1999.

SULLIVAN, P.; BEKIR, S.; JAFFAR, Z.; PAGE, C.; JEFFERY, P.; COSTELLO, J. Antiinflammatory effects of low-dose oral theophylline in atopic asthma. **Lancet**, v. 147, p. 1006-1008, 1994.

SWINDLE, E. J.; COLLINS, J. E.; DAVIES, D. E. Breakdown in epithelial barrier function in patients with asthma: Identification of novel therapeutic approaches. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 124, p. 23-34, 2009.

SZCZEKLIK, A.; DWORSKI, R.; MASTALEZ, L.; PROKOP, A.; SHELLER, J. R.; NIZANKOWSKA, E.; CMILE, A.; OATES, J. A. Salmeterol prevents aspirin-induced attacks of asthma and interferes with eicosanoid metabolism. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 158, p. 1168-1172, 1998.

TASCHE, M.J.; UIJEN, J. H.; BERNSEN, R. M.; DE JONGSTE, J. C.; VAN DER WOUDE, J. C. Inhaled disodium cromoglycate (DSCG) as maintenance therapy in children with asthma: a systematic review. **Thorax**, v. 55, p. 913-920, 2000.

TEIXEIRA, M. C. L.; COELHO, R. R.; LEAL-CARDOSO, J. H.; CRIDDLE, D. N. Comparative effects of niflumico acid and nifedipina on 5-hydroxytryptamine and acetylcholine-induced contraction of the rat tracheal. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 394, p. 117-122, 2000.

TEMPLETON, W. An introduction of the chemistry of terpenoids and steroids. *In*: DUNKEL, F.V.; SEARS, L.J. Fumigant properties of physical preparations from mountain big sagebrush, *Artemisia tridentata* Nutt. Ssp. *vaseyana* (Rydb.) beetle for stored grain insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 34, n. 4, p. 307-321, 1998.

TISSERAND, A. F.; BALACS, T. **Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals**. New York, NY: Churchill Livingstone, 1995.

TORPHY, T. J. Phosphodiesterase isoenzymes. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 157, p. 351-370, 1998.

TSEIN, R. W.; ELLIOTT, P. T.; HORNE, W. A. Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 12, p. 349-354, 1991.

TURNER, C. R.; COHAN, V. L.; CHENG, J. B.; SHOWELL, H. J.; PAZOLES, C. J.; WATSON, J. W. The in vivo pharmacology of CP-80,633, a selective inhibitor of phosphodiesterase 4. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 278, p. 1349-1355, 1996.

TZAKOU, O.; PITAROKILI, D.; CHINO, I. B.; HARVALA, C. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia ringens*. **Planta Med.**, v. 67, n. 1, p. 81-83, 2001.

UNDERWOOD, D. C.; KOTZER, C.J.; BOCHNOWICZ, S.; OSBORN, R. R.; LUTTMANN, M. A.; HAY, D. W. et al. Comparison of phosphodiesterase III, IV and

dual III/IV inhibitors on bronchospasm and pulmonary eosinophil influx in guinea pigs. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 270, p. 250-259, 1994.

VAN DEN BERGE, M.; KERSTJENS, H. A.; MEIJER, R. J.; DE REUS, D. M.; KOËTER, G. H.; KAUFFMAN, H. F.; POSTMA, D. S. Corticosteroid-induced improvement in the PC20 of adenosine monophosphate is more closely associated with reduction in airway inflammation than improvement in the PC20 of methacholine. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 164, n. 7, p. 1127-1132, 2001.

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

VAN DER WOUDE, H. J.; AALBERS, R. Unaltered perception of dyspnoea during treatment with long-acting beta2-agonists. **Eur Respir J.**, v. 18, n. 2, p. 269-271, 2001.

VAN NIEUWSTADT, R. A.; HAJER, R.; BREUKINK, H. J. Autonomic innervation of the airways. **The Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 2, p. 110-114, 1994

VAN OOSTERHOUT, A. J. M.; LANDENIUS, A. R. C.; SAVELKOUL, H. F. J.; VAN ARK, I.; DELSMAN, K. C.; NIJKAMP, F. P. Effect of anti-IL-5 on airway hyperreactivity and eosinophils in guinea pig. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 147, p. 548-552, 1993.

VAN OOSTERHOUT, A. J. M.; VAN ARK, I.; HOFMAN, G.; VAN DER LINDE, H. J.; FATTAH, D.; NIJKAMP, F. P. Role of interleukin 5 and substance P in development of airway hyperreactivity to histamine in guinea pig. **Eur. Respir.**, v. 9, p. 493-499, 1996..

VAN RENSEN, E. L.; STRAATHOF, K. C.; VESELIC-CHARVAT, M. A.; ZWINDERMAN, A. H.; BEL, E. H.; STERK, P. J. Effect of inhaled steroids on airway hyperresponsiveness, sputum eosinophils, and exhaled nitric oxide levels in patients with asthma. **Thorax**, v. 54, p. 403-408, 1999.

VASSALLO, R.; LIPSKY, J. Theophylline: recent advances in the understanding of its mode of action and uses in clinical practice. **Mayo Clin Proc.**, v. 73, p. 346-354, 1998.

VATHENEN, A. S.; KNOX, A. J.; WISNIEWSKI, A.; TATTERSFIELD, A. E. Time course of change in bronchial reactivity with an inhaled corticosteroid in asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 143, p. 1317-1321, 1991.

VICENZI, M.; SILANO, M.; VINCENZI, A.; MAIALETTI, F.; SCAZZOCCHIO, B. Constituents of aromatic plants: eucalyptol. **Fitoterapia**, v. 73, p. 269-275, 2002.

VITTI, M. A. S.; BRITO, J. O. Óleo Essencial de Eucalipto. **Documentos Florestais**, n. 17, p. 1-26, Agosto de 2003

WADE, G. R.; BARBERA, J.; SIMS, S. M. Cholinergic inhibition of Ca²⁺ current in guinea pig gastric and tracheal smooth muscle cells. **J Physiol (Lond.)**, V. 491, P. 307-319, 1996.

WALKER, J. K. L.; GAINETDINOV, D. S.; FELDMAN, P. K.; McFAWN, P. K.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J.; PREMONT, R. T.; FISHER, J. T. G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 286, p. L312-L319, 2004.

WANG, Z.; MA, Z.; ZHOU, J. Changes of Ca²⁺ channel behaviors in bronchial smooth muscle cells of asthma guinea-pig model. **Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi**. V. 24, n. 9, p. 539-541, 2001.

WARNER, J. A.; JONES, C. A.; WILLIAMS, T. J.; WARNER, J. O. Maternal programming in asthma and allergy. **Clin. Exp. Allergy**. V. 28 (Suppl 5), p. 35-38, 1998.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**. V. 27, p. 201-206, 2003.

WEINREICH, D.; UNDEM, B. J. Immunological regulation of synaptic transmission in isolated guinea pig autonomic ganglia. **J. Clin. Invest.**, v. 79, n. 5, p. 1529-1532, 1987

WEISS, G. B.; PANG, I. H.; GOODMAN, F. R. Relationship between Ca²⁺ movements, different calcium components and responses to acetylcholine and potassium in tracheal smooth muscle. **J. Pharmac. Exp. Ther.**, v. 233, p. 389-394, 1985.

WEISSMAN, G. Inflammation: historia perspectives. In: Gallin J. L. et al. (Eds): **Inflammation: Basis principles and Clinical Corelates**. New York: raven Press, 1992, p. 5.

WILSON, A. M.; DEMPSEY, O. J.; SIMS, E. J.; LIPWORTH, B. J. Evaluation of salmeterol or montelukast as second-line therapy for asthma not controlled with inhaled corticosteroids. **Chest**, v. 119, p. 1021-1026, 2001.

WINDHOLZ, M. et al. The Merck Index. In: DUNKEL, F.V.; SEARS, L.J. Fumigant properties of physical preparatios from mountain big sagebrush, *Artemisia tridentata* Nutt. Ssp. *Vaseyana* (Rydb.) beetle for stored grain insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 34, n. 4, p. 307-321, 1998.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab Invest**, v. 80, n. 5, p. 617-653, 2000.

WITTMANN, M., PETRO, W., KASPAR, P., REPGES, R., DETHLEFSEN, U. [Therapy with expectorants: a double-blind randomized study comparing ambroxol and cineol.] **Atemw.-Lungenkrkh**, v. 24:67-74, 1998.

WORTH, H.; SCHACHER, C.; DETHLEFSEN, U. Concomitant therapy with Cineole (Eucalyptole) reduces exacerbations in COPD: A placebo-controlled double-blind trial. **Respiratory Research**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2009.

WU, Y.; ZHOU, C.; TAO, J.; LI, S. Montelukast prevents the decrease of interleukin-10 and inhibits NF-kappaB activation in inflammatory airway of asthmatic guinea pig. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 84, n.5, p. 531-537, 2006.

YAO, P. L. et al. Global expression profiling of theophylline response genes in macrophages: evidence of airway anti-inflammatory regulation. **Respir. Res.**, v. 6 p. 89, 2005.

YUKAWA, T.; KROEGEL, C.; CHANEZ, P.; DENT, G.; UKENA, D.; CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. Effect of theophylline and adenosine on eosinophil function. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 140, p. 327-333, 1989.

YU, S.; STAHL, E.; LI, Q.; OUYANG, A. Antigen inhalation induces mast cells and eosinophils infiltration in the guinea pig esophageal epithelium involving histamine-mediated pathway. **Life Sciences**, v. 82, p. 324-330, 2008.

YU, S. Y.; KOLLARIK, M.; OUYANG, A.; MYRES, A. C.; UNDEM, B. J. Mast cell mediated long-last increases in excitability of vagal C-fibres in guinea-pig esophageal. **Am. J. of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 293, p. G850-G856, 2007.

XIONG, Z.; KITAMURA, K.; KURIYAMA, H. ATP activates cationic currents and modulates the calcium current through GTP-binding protein in rabbit portal vein. **J. Physiol. Lond**, v. 440, p. 143-165, 1991.

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-S50, 1987.

ZHOU, J-Y.; WANG, X-F.; TANG, F-D.; ZHOU, J-Y.; LU, G-H.; WANG, Y.; BIAN, R-L. Inhibitory effect of 1,8-cineol (eucalyptol) on Egr-1 expression in lipopolysaccharide-stimulated THP-1 cells. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 28, n. 6, p. 908-912, 2007.

APÊNDICE

INHIBITORY EFFECT OF 1,8-CINEOLE ON GUINEA-PIG AIRWAY CHALLENGED WITH OVALBUMIN INVOLVES A PREFERENTIAL ACTION ON ELECTROMECHANICAL COUPLING

Vasco PD Bastos,^{*†} Teresinha S Brito,^{*} Francisco JB Lima,^{*} João PM Pinho,^{*} Saad Lahlou,[‡] Francisco J Abreu Matos,[§] Armênio A Santos^{*} and Pedro J Caldas Magalhães^{*}

^{*}Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceará, [†]Integrated Faculties of Ceará, [‡]Superior Institute of Biomedical Sciences, State University of Ceará and [§]Laboratory of Natural Products, Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

SUMMARY

1. 1,8-Cineole is a terpenoid constituent of essential oils with anti-inflammatory properties. It reduces the neural excitability, functions as an antinociceptive agent and has myorelaxant actions in guinea-pig airways. The aim of the present study was to investigate the mechanism underlying the myorelaxant effects of 1,8-cineole in guinea-pig isolated trachea from either naïve guinea-pigs or ovalbumin (OVA)-sensitized animals subjected to antigenic challenge.

2. Isometric recordings were made of the tone of isolated tracheal rings. Rings with an intact epithelium relaxed beyond basal tone in the presence of 1,8-cineole (6.5×10^{-6} to 2×10^{-2} mol/L) in a concentration-dependent manner ($P < 0.001$, ANOVA) with a pD_2 value of 2.23 (95% confidence interval 2.10–2.37). Removal of the epithelium or pretreatment of intact tissue for 15 min with 50 μ mol/L *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester, 5 mmol/L tetraethylammonium, 0.5 μ mol/L tetrodotoxin or 5 μ mol/L propranolol did not alter the potency (pD_2) or the maximal myorelaxant effect (E_{max}) of 1,8-cineole.

3. 1,8-Cineole also significantly decreased the Schultz-Dale contraction induced by OVA, mainly in preparations from OVA-sensitized animals submitted to antigen challenge. 1,8-Cineole decreased tracheal hyperresponsiveness to KCl and carbachol caused by antigen challenge and almost abolished the concentration–response curves to KCl, whereas it had little effect on the concentration–response curves to carbachol. Under Ca^{2+} -free conditions and in the presence of 10^{-4} mol/L acetylcholine, neither 1,8-cineole (6.5×10^{-3} mol/L) nor verapamil (1×10^{-5} mol/L) affected Ca^{2+} -induced contractions, but they almost abolished Ba^{2+} -induced contractions.

4. In conclusion, the findings of the present study show that 1,8-cineole is a tracheal myorelaxant that acts preferentially on contractile responses elicited electromechanically.

Key words: eucalyptol, guinea-pig trachea, ovalbumin.

Correspondence: Dr Pedro Jorge Caldas Magalhães, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, R Cel Nunes de Melo 1127, Fortaleza, CE, Brazil. Email: pjcmagal@ufc.br

Received 8 September 2008; revision 20 March 2009; accepted 2 April 2009.

© 2009 The Authors

Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Asia Pty Ltd

INTRODUCTION

Airway inflammation is a key factor in the pathogenesis of several lung diseases, including chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma and chronic bronchitis, and terpenes are widely used in the treatment of upper and lower airway diseases, such as chronic sinusitis and bronchitis.¹ 1,8-Cineole, also known as eucalyptol, is the main terpenoid constituent of various essential oils, mainly those extracted from *Eucalyptus* species, such as *E. globulus* Labill. and *E. tereticornis* Sm.,² plants traditionally used in the treatment of asthma and bronchitis.³ Eucalyptol is also found in essential oils of other plant species, such as *Croton nepetaefolius* Baill. (Euphorbiaceae) and *Alpinia zerumbet* or *speciosa* K. Schum (Zingiberaceae), which exhibit myorelaxant, antinociceptive and vasodilator actions that are attributable, in part, to the actions of 1,8-cineole.^{4–8}

As an isolated substance, 1,8-cineole has spinal and supraspinal antinociceptive activity comparable to morphine⁹ while decreasing the excitability of peripheral nerves.¹⁰ Moreover, 1,8-cineole has gastroprotective activity, an effect related to both its anti-oxidant and lipoygenase inhibitory effects.¹¹ Recently, anti-oxidant assays with the stable radical 2,2'-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) or β -carotene–linoleic acid showed that 1,8-cineole exhibited weak anti-oxidant activity that was potentiated in the presence of other monoterpenes.¹² 1,8-Cineole is a strong inhibitor of the production of tumour necrosis factor- α and interleukin (IL)-1 β by stimulated lymphocytes and monocytes and also shows chemotactic inhibitory activity against IL-8 and IL-5.¹ Such effects may account for the anti-inflammatory properties of 1,8-cineole, because it prevents some types of experimental inflammation in rats, such as paw oedema induced by carrageenan and cotton pellet-induced granuloma, as well as colon damage induced by the administration of 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS).^{13,14}

With regard to the anti-inflammatory properties of terpenoids in the respiratory system, Juergens *et al.*¹⁵ reported that 1,8-cineole showed a significant steroid-saving effect in glucocorticoid-dependent asthmatic patients. Moreover, patients with acute non-purulent rhinosinusitis were treated successfully without antibiotics by 1,8-cineole, revealing that it is clinically effective and safe.¹⁶

Because we have shown previously that the essential oils of *Eucalyptus tereticornis* and *Croton nepetaefolius* inhibit the *in vitro* contractility of guinea-pig trachea,^{17,18} we attempt to further investigate the mechanism underlying the inhibition of myorelaxation by

1,8-cineole in isolated trachea obtained from either naïve or ovalbumin (OVA)-sensitized guinea-pigs subjected to antigen challenge.

METHODS

Male guinea-pigs (400–500 g) were housed under standard conditions with free access to food and water in the Central Housing Station of the Federal University of Ceará. All animals were handled in accordance with the Ethical Principles for Care and Use of Laboratory Animals, published by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA; <http://www.cobea.org.br>). The study protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Ceará (protocol CEPA no. 34/06).

Experiments with isolated trachea obtained from sensitized animals

Guinea-pigs were actively sensitized to OVA on Days 1, 3 and 5 by an intraperitoneal (i.p.) injection of chicken egg albumin (Grade II; Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) diluted in saline (0.5 mL, 10 mg/kg). Untreated animals received saline only before antigen challenge. Guinea-pigs were killed at least 21 days after the last immunization. To verify that the guinea-pigs were properly immunized, some tracheal rings were exposed to OVA (10 µg/mL) in a Schultz-Dale reaction. If immediate contractions were evident after the addition of OVA, the tissue was considered to be OVA sensitized. As further confirmation of sensitization, no contractile responses were observed in negative controls (preparations from sensitized animals exposed to OVA at room temperature (22–25°C) or those from sensitized guinea-pigs (at 37°C)) following challenge with bovine serum albumin (BSA). Moreover, a second challenge with OVA at 37°C did not produce subsequent contractions. Because contractile responses to OVA were only obtained once, the effects of 1,8-cineole were tested in paired tissues. In some tissues, the epithelium was removed by gentle rubbing of the tracheal lumen with a moist cotton swab and complete removal was confirmed by optical microscopy.

Antigen challenge

Conscious guinea-pigs were placed in a plastic box (21 × 20 × 30 cm) and challenged by inhalation with OVA (first challenge 1 mg/mL; second challenge 5 mg/mL; 15 min each) or saline (for 30 min) via an ultrasonic nebulizer (RespiraMax; NS Indústria de Aparelhos Médicos, São Paulo, Brazil). Each guinea-pig was killed 24 h later under chloral hydrate (400 mg/kg, i.p.) anaesthesia to assess tracheal responsiveness to contractile agents *in vitro*.

In vitro determination of airway contractile responses

The trachea was dissected out and placed into a dish containing physiological salt solution (pH 7.4) so that adherent fat and connective tissue could be removed. Next, the trachea was cut transversely into cylindrical rings (with 3–4 cartilage rings in each section), which were suspended in 5 mL organ baths containing physiological solution at 37°C (pH 7.4) that was aerated continuously by bubbling air. Tracheal rings were stretched with a passive tension of 1 g. One end of the ring was attached to a fixed pin in the bath, whereas the other was connected to a force transducer (FT03; Grass, Quincy, MA, USA) that was connected, in turn, to a digital recording device (PM-1000; Dataq, Akron, OH, USA) to enable isometric recording of tension on a micro-computer. Tissues were allowed to equilibrate for 1 h.

In all experiments, to evaluate the viability of tissues after the equilibration period, 60 mmol/L K⁺-induced contractions were induced repeatedly and tissues without reproducible contractions were discarded. The results presented are expressed as percentages of the mean of at least two K⁺-induced contractions.

Cumulative concentration–response curves were constructed by exposing preparations to increasing concentrations of 1,8-cineole, KCl or carbachol (CCh), added to the bath and maintained at a given concentration for 5 min (or, if necessary, up to 10 min so that a plateau response was reached). The maximum response (E_{max}) was defined as the point at which increasing

concentrations of agonist did not produce a significant further response. The amplitude of contraction was measured at peak deflection. In some experiments performed to evaluate the tracheal contractile responses induced by either Ca²⁺ or Ba²⁺ in the presence of acetylcholine (ACh) in Ca²⁺-free medium, 1,8-cineole was added at concentrations of 2×10^{-3} and 6.5×10^{-3} mol/L, which were approximately 30 and 70% of the E_{max} determined in the concentration–response curves, respectively.

To measure the relaxation of muscle tone, isolated tracheal rings were exposed to 1,8-cineole (6.5×10^{-6} to 2×10^{-2} mol/L) and the relaxation was defined as the difference between baseline in the presence (experimental) and in the absence (control) of 1,8-cineole. This procedure was repeated in the presence of 5 µmol/L propranolol, a non-selective β-adrenoceptor antagonist,¹⁹ 0.5 µmol/L tetrodotoxin (TTX), a blocker of fast Na⁺ channels,²⁰ 5 mmol/L tetraethylammonium (TEA), a non-selective blocker of BK_{Ca} channels,²¹ or 50 µmol/L N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor.²² Recovery of baseline near to basal tone after washout of 1,8-cineole was considered indicative of reliable relaxation. To quantify inhibition of muscle contraction, preparations were exposed to 1,8-cineole (2×10^{-3} or 6.5×10^{-3} mol/L) for 5 min and then challenged with the contraction-inducing stimuli in the continued presence of 1,8-cineole.

Contractions to Ca²⁺ or Ba²⁺ in the presence of acetylcholine in Ca²⁺-free medium

Calcium-free solutions were prepared by omitting CaCl₂ from the normal Krebs–Henseleit solution and the addition of EGTA (4×10^{-3} mol/L). The availability of extracellular Ca²⁺ was evaluated indirectly by recording contractions induced by 10^{-4} mol/L ACh in Ca²⁺-free medium containing EGTA. After 60 min equilibration in normal Krebs–Henseleit solution, tracheal rings were washed three to six times in Ca²⁺-free medium and then challenged 5 min after the last wash with 10^{-4} mol/L ACh. After addition of ACh to the bathing medium, tissues responded with a small unsustained contraction that always decayed back to resting levels. When the baseline (resting) level had been re-established after addition of ACh, control cumulative concentration–response curves were constructed for Ca²⁺ (1×10^{-4} to 2×10^{-2} mol/L) and Ba²⁺ (1×10^{-4} to 2×10^{-2} mol/L). After the concentration–response curves had been obtained, tracheal ring preparations were washed with Ca²⁺-free Krebs–Henseleit solution, ACh was added to the bath again and, 5 min later, 1,8-cineole (6.5×10^{-3} mol/L) or verapamil (1×10^{-5} mol/L) were added and cumulative concentration–response curves for CaCl₂ or BaCl₂ were again constructed.

Solutions and drugs

The physiological salt solution used in the present study was a modified Krebs–Henseleit solution of the following composition (in mmol/L): NaCl 118.0; KCl 4.7; CaCl₂ 2.5; MgSO₄ 1.2; NaHCO₃ 25.0; KH₂PO₄ 1.2; glucose 10.0. Solutions with high KCl content involved the direct addition of appropriate amounts of a 3 mol/L KCl solution (in distilled water) directly to the organ bath. Stock solutions of propranolol, CCh, TTX, TEA and L-NAME were prepared in distilled water and stored in a freezer. At the time of the experiment, the stock solutions were diluted to the required concentration with Krebs–Henseleit solution. Prior to each experiment, 1,8-cineole was dissolved directly in Krebs–Henseleit solution containing Tween and sonicated. The maximum concentration of Tween in the organ bath was 0.2% (v/v). Salts and drugs (all of analytical grade) were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA) or Merck (Darmstadt, Germany).

Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± SEM, with the number of experiments given in parentheses, except for pD₂ values (the negative logarithm of the EC₅₀), which are given as the geometric mean with 95% confidence intervals (CI) in parentheses. Individual concentration–response curves were analysed by the following four-parameter logist equation for pD₂:

$$y = \min + ((\max - \min) / (1 + 10^{(\log EC_{50} - x) \text{Hill slope}}))$$

The significance of differences was determined using unpaired Student's *t*-test or one- or two-way analysis of variance (ANOVA), as appropriate. When results of the two-way ANOVA indicated significant differences, data were further analysed by the Holm-Sidak multiple comparison test. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$.

RESULTS

Effects of 1,8-cineole on basal tone of the guinea-pig isolated trachea

In isolated trachea with an intact epithelium from naïve guinea-pigs, 1,8-cineole (6.5×10^{-6} to 2×10^{-2} mol/L) induced concentration-dependent

Table 1 Potency (pD_2) and E_{max} values for the relaxant effects of 1,8-cineole on basal tone of tracheal rings from naïve guinea-pigs

	pD_2	E_{max}
Epithelium intact ($n = 14$)	2.23 (2.10–2.37)	92.1 ± 19.9
Epithelium denuded ($n = 17$)	2.35 (2.25–2.45)	99.2 ± 15.8
L-NAME ($n = 6$)	2.32 (2.09–2.55)	82.7 ± 17.7
TTX ($n = 6$)	2.31 (1.87–2.76)	83.3 ± 28.4
TEA ($n = 6$)	2.36 (2.28–2.45)	73.7 ± 14.2
Propranolol ($n = 6$)	2.09 (1.81–2.36)	84.1 ± 10.7

The pD_2 values are the negative logarithm of the EC_{50} (in mol/L) shown as the geometric mean with 95% confidence intervals in parentheses.

The E_{max} values for relaxation of basal tone are the mean ± SEM percentage of the initial contraction to 60 mmol/L K^+ .

L-NAME, N^G -nitro-L-arginine methyl ester; TTX, tetrodotoxin; TEA, tetraethylammonium.

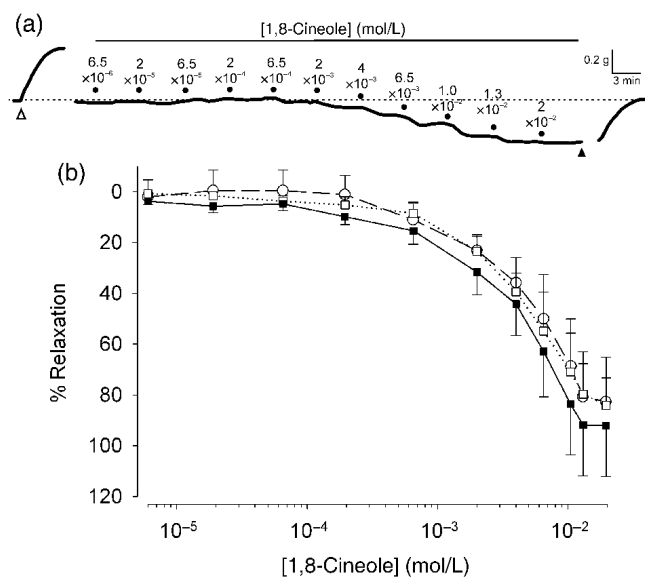


Fig. 1 Myorelaxant effect of 1,8-cineole on basal tone of guinea-pig tracheal rings. (a) Typical trace of an experiment showing the myorelaxant effects of cumulative additions of 1,8-cineole. The interval between additions of higher concentrations of 1,8-cineole was 5 min. Complete recovery of basal tone to baseline values (dashed line) was seen after washout of 1,8-cineole (▲). (b) Myorelaxant effects of 1,8-cineole (as a percentage of the contractile response to 60 mmol/L KCl) in the absence ($n = 14$; ■) and in presence of 50 μ mol/L N^G -nitro-L-arginine methyl ester ($n = 6$; ○) or 5 μ mol/L propranolol ($n = 6$; □). Data are the mean ± SEM.

relaxation ($P < 0.001$, ANOVA) of the basal tone with a pD_2 value of 2.23 (95% CI 2.10–2.37; $n = 14$; Table 1). The maximal relaxation induced by 1,8-cineole was equivalent to $92.1 \pm 19.9\%$ ($n = 14$) of the contraction induced by 60 mmol/L K^+ . Removal of the epithelium ($n = 17$) or pretreatment of the intact tracheal rings with L-NAME (50 μ mol/L; $n = 6$), TEA (5 mmol/L; $n = 6$), TTX (0.5 μ mol/L; $n = 6$) or propranolol (5 μ mol/L; $n = 6$) had no effect on the potency (pD_2) or E_{max} of 1,8-cineole. Moreover, the relaxant effect of 1,8-cineole was reversible following washout with physiological solution (Fig. 1a).

Effects of 1,8-cineole on OVA-induced contraction of the guinea-pig trachea

A group of sensitized animals was challenged with saline or OVA and responses of isolated tracheal rings were recorded 24 h later. *In vitro* exposure of tracheal rings, isolated from sensitized guinea-pigs challenged with saline or OVA, to 10 μ g/mL OVA resulted in contractions of 0.56 ± 0.07 g ($n = 10$) and 0.95 ± 0.15 g ($n = 6$), respectively, with the differences being significantly different ($P < 0.05$, unpaired Student's *t*-test; Fig. 2). In the presence of 1,8-cineole (2×10^{-3} or 6.5×10^{-3} mol/L), OVA-induced contractions were reduced significantly only in tracheal rings from sensitized + OVA-challenged animals ($P < 0.05$, unpaired Student's *t*-test) and not in rings from sensitized + saline-challenged animals (0.29 ± 0.09 and 0.24 ± 0.04 g, respectively; $n = 5$ –6). Although the difference in contractions to OVA in rings from sensitized + saline-challenged animals in the presence and absence of 6.5×10^{-3} mol/L 1,8-cineole did not reach statistical significance, the peak force elicited by OVA in the presence of 1,8-cineole (0.34 ± 0.08 g; $n = 6$) tended to be lower than values obtained in its absence (0.56 ± 0.07 g; $n = 10$; $P = 0.064$).

Effects of 1,8-cineole on concentration–response curves to KCl or carbachol in OVA-sensitized or OVA-challenged guinea-pig tracheal rings

As described above, tracheal responses were evaluated in sensitized animals 24 h after challenge with saline (control) or OVA.

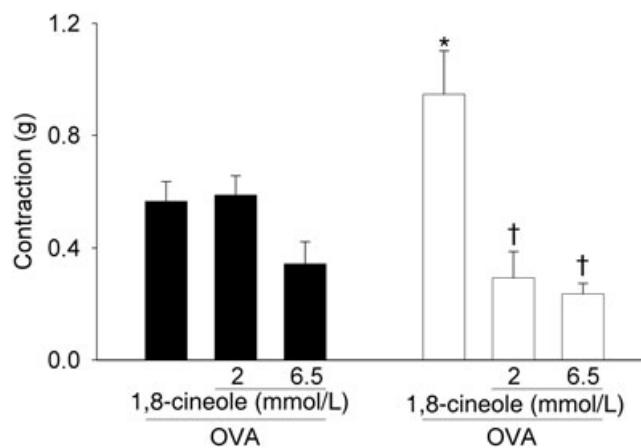


Fig. 2 Effects of 1,8-cineole on guinea-pig tracheal smooth muscle contracted *in vitro* by 10 μ g/mL ovalbumin (OVA). Tracheal rings were obtained from sensitized guinea-pigs that had been challenged 24 h earlier with aerosolized saline (■) or OVA (□). Data are the mean ± SEM. * $P < 0.05$ compared with OVA alone in saline-challenged animals (unpaired Student's *t*-test); † $P < 0.05$ compared with OVA alone in OVA-challenged animals (unpaired Student's *t*-test).

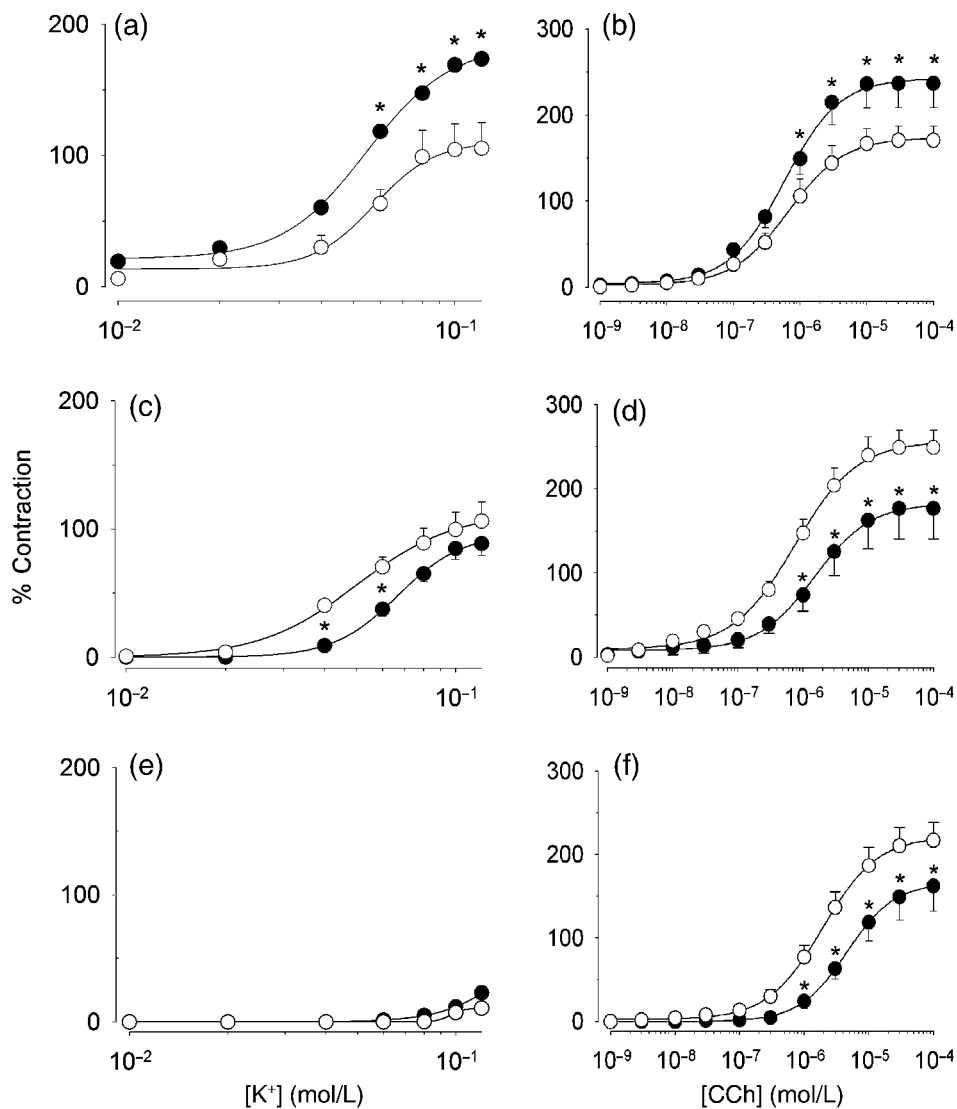


Fig. 3 Concentration–response curves to (a,c,e) KCl or (b,d,f) carbachol (CCh) in ovalbumin (OVA)-sensitized isolated tracheal rings (as a percentage of the contractile response to 60 mmol/L KCl) from guinea-pigs that had been challenged 24 h earlier with aerosolized saline (○) or OVA (●). Concentration–response curves were constructed in absence (a,b) or presence of either 2×10^{-3} mol/L 1,8-cineole (c,d) or 6.5×10^{-3} mol/L 1,8-cineole (e,f). Data are the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with tissues from saline-challenged sensitized animals (Holm-Sidak test). Note, n values are given in Table 2.

Full concentration–response curves were constructed to KCl (0.01–0.12 mol/L) and CCh (10^{-9} to 10^{-4} mol/L) in rings from control and OVA-challenged animals. In the absence of 1,8-cineole, contractile responses of rings from OVA-challenged guinea-pigs to KCl and CCh were greater than those obtained in rings of saline (control)-challenged animals (Fig. 3a,b; $P < 0.01$, two-way ANOVA; $n = 5$ –7), as also evidenced by the E_{\max} values given in Table 2.

Tracheal rings from guinea-pigs pretreated with 1,8-cineole (2×10^{-3} or 6.5×10^{-3} mol/L) did not show enhanced contractile responses to KCl (Fig. 3c,e; $n = 4$ –8) or CCh (Fig. 3d,f; $n = 7$ –8) after OVA challenge. Moreover, the effect of 1,8-cineole in inhibiting CCh-induced contractions was greater in challenged than sensitized rings, because the concentration–response curves in challenged rings were shifted significantly to the right. This effect was also observed for K^+ -induced contractions in the presence of 2×10^{-3} mol/L 1,8-cineole. Interestingly, KCl-induced contractions in both sensitized and challenged rings were almost abolished in presence of 6.5×10^{-3} mol/L 1,8-cineole (Fig. 3e), whereas the maximum response to CCh was increased significantly in sensitized tissues in the presence of 2×10^{-3} mol/L 1,8-cineole ($P < 0.05$, Holm-Sidak test; Table 2).

In the presence of Tween alone, tracheal rings from sensitized animals had pD_2 values for KCl and CCh of 1.24 (95% CI 1.20–1.28; $n = 6$) and 6.31 (95% CI 5.79–6.83; $n = 5$), respectively. The E_{\max} values for KCl and CCh were 132.8 ± 14.2 and $173.1 \pm 34.1\%$ of control, respectively. These values did not differ significantly from those of tracheal rings in the presence of Krebs–Henseleit solution only, which were obtained from a separate group of sensitized guinea-pigs ($P > 0.05$, Student's t -test).

Effects of 1,8-cineole and verapamil on concentration–response curves to Ca^{2+} or Ba^{2+}

Under Ca^{2+} -free conditions, ACh (10^{-4} mol/L) induced a transient but unsustainable contraction in tracheal rings isolated from naïve guinea-pigs that rapidly returned to baseline. Subsequently, and still in presence of ACh, cumulative concentration–response curves were constructed for Ca^{2+} ($n = 12$) and Ba^{2+} ($n = 4$). Neither 1,8-cineole (6.5×10^{-3} mol/L; $n = 12$) nor verapamil (1×10^{-5} mol/L; $n = 11$) had any effect on the concentration–response curve to Ca^{2+} (Fig. 4a,b), although both drugs almost completely abolished responses to Ba^{2+} (Fig. 4c,d; $n = 6$).

Table 2 Potency (pD₂) and E_{max} values for the concentration–response curves to K⁺ or carbachol in tracheal rings from guinea-pigs that were sensitized only or sensitized and challenged to ovalbumin

	K ⁺		Carbachol	
	pD ₂	E _{max}	pD ₂	E _{max}
Control				
Sensitized (<i>n</i> = 8)	1.30 (1.15–1.45)	105.4 ± 19.8	6.07 (5.85–6.30)	170.4 ± 16.8
Challenged (<i>n</i> = 5)	1.30 (1.17–1.43)	173.3 ± 17.6 [§]	6.22 (6.10–6.35)	236.6 ± 28.3 [§]
1,8-Cineole				
2 × 10 ⁻³ mol/L				
Sensitized (<i>n</i> = 11)	1.33 (1.24–1.41)	106.0 ± 15.0	6.12 (5.97–6.23)	249.1 ± 20.1 [‡]
Challenged (<i>n</i> = 8)	1.18 (1.13–1.22) [†]	88.5 ± 9.3	5.73 (5.52–5.94) [†]	175.5 ± 35.9 [§]
6.5 × 10 ⁻³ mol/L				
Sensitized (<i>n</i> = 7)	1.02 (0.99–1.06)*	10.8 ± 3.3 [‡]	5.67 (5.52–5.82)*	216.9 ± 22.0
Challenged (<i>n</i> = 4)	0.74 (–0.20–1.67)	22.7 ± 9.3	5.34 (5.19–5.49) [†]	162.0 ± 29.8 [§]

The pD₂ values are the negative logarithm of the EC₅₀ (in mol/L) shown as the geometric mean with 95% confidence intervals in parentheses.

The E_{max} values for relaxation of basal tone are the mean±SEM percentage of the initial contraction to 60 mmol/L K⁺.

**P* < 0.05 compared with control sensitized (unpaired *t*-test); [†]*P* < 0.05 compared with sensitized under the same treatment (unpaired *t*-test); [‡]*P* < 0.05 compared with control sensitized (Holm-Sidak test); [§]*P* < 0.05 compared with sensitized under the same treatment (Holm-Sidak test).

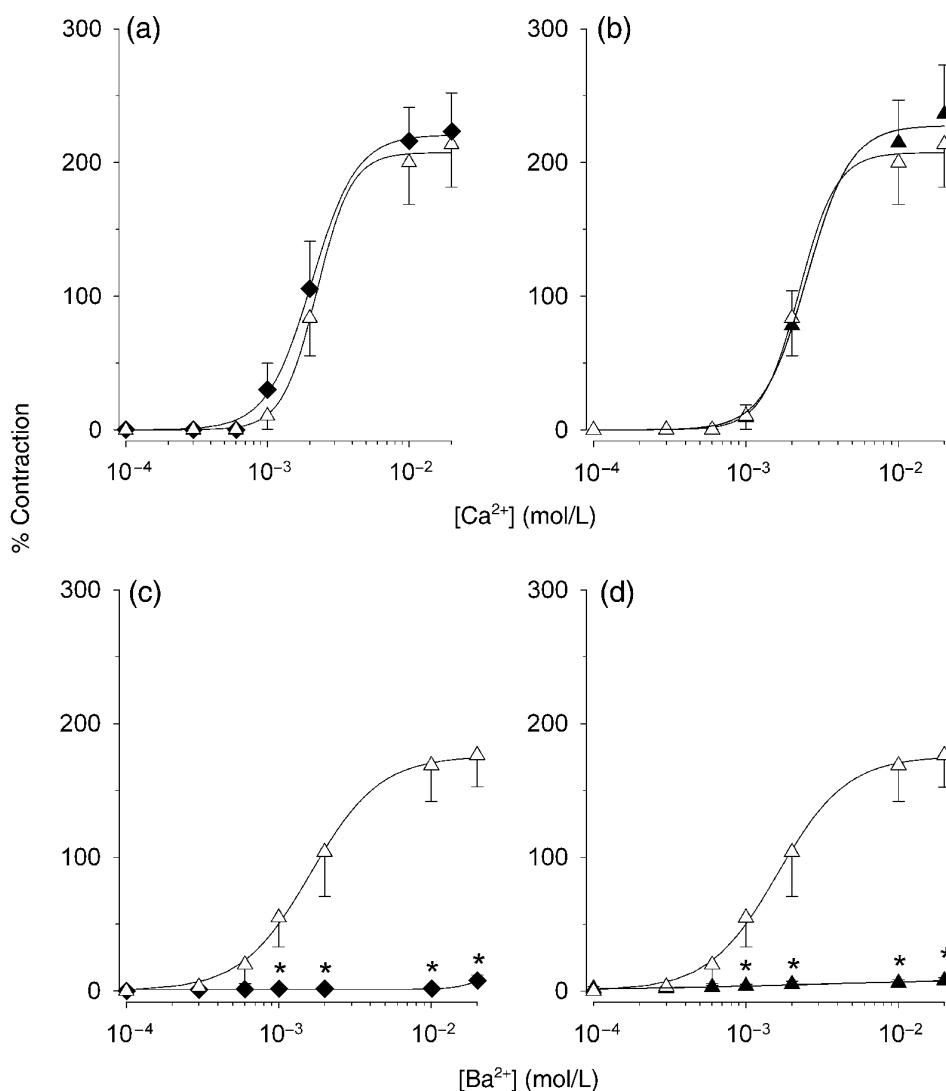


Fig. 4 Effects of 1,8-cineole (6.5 × 10⁻³ mol/L; ◆) and verapamil (10⁻⁵ mol/L; ▲) on concentration–response curves to Ca²⁺ (a,b) or Ba²⁺ (c,d) in guinea-pig tracheal smooth muscle in presence of acetylcholine and under Ca²⁺-free conditions. (△), control curves. Isolated tracheal rings were obtained from naïve guinea-pigs and tissues were exposed to 1,8-cineole or verapamil for 5 min prior to the addition of Ca²⁺ or Ba²⁺. Data are the mean±SEM. **P* < 0.05 compared with control (Holm-Sidak test).

DISCUSSION

The results of the present study show that 1,8-cineole relaxes the basal tone of smooth muscle and decreases antigen-induced contraction of guinea-pig isolated tracheal rings obtained from sensitized animals. 1,8-Cineole inhibited the development of increased contractions in tissues subjected to antigen challenge and exhibited antispasmodic effects preferentially against contractile responses elicited electromechanically.

In addition to its previously reported vascular and gastrointestinal myorelaxant properties,^{4,8,23} in the present study 1,8-cineole also exhibited an inhibitory effect on the basal tone of guinea-pig isolated tracheal smooth muscle (corresponding to approximately 95% of the K^+ -induced contraction), which is significantly less than the effect of aminophylline (approximately 209%) under similar conditions.¹⁸ In preparations with an intact epithelium, tracheal relaxation was unchanged by either propranolol or L-NAME, suggesting that neither β -adrenoceptors nor nitric oxide (NO) are involved in the myorelaxant effects of 1,8-cineole on tracheal smooth muscle.^{19,22} Furthermore, 1,8-cineole-induced myorelaxation was unaltered by removal of the epithelium and the presence of TTX, indicating that the action of 1,8-cineole in tracheal rings was independent of putative factors released from epithelial cells and TTX-sensitive neuronal activity. Increased K^+ conductance causes plasma membrane hyperpolarization with consequent reduction of cell excitability by shifting the transmembrane potential (E_m) away from threshold for excitation.²⁴ This mechanism is not involved in the relaxant effects of 1,8-cineole on basal tone because TEA pretreatment of tracheal rings had no effect on the actions of 1,8-cineole. Similarly, we have shown previously that the essential oil of *C. nepetaefolius*, which contains 1,8-cineole, had no effect on the E_m of guinea-pig tracheal smooth muscle cells in the presence of 5 or 80 mmol/L extracellular K^+ .¹⁸

Tracheal rings from OVA-sensitized guinea-pigs that had been challenged previously with aerosolized antigen showed an expected increase in tissue responsiveness to both CCh and high- K^+ solutions,²⁵ as well as to the Schultz-Dale reaction evoked by antigen presence in the bath, a phenomenon that seems to be mediated by histamine, leukotrienes and prostanooids.²⁶ In sensitized tissues, only 6.5×10^{-3} mol/L 1,8-cineole tended to reduce tracheal contractions induced by OVA, but this effect did not reach statistical significance. However, contractile responses to OVA were significantly inhibited in tracheal rings from OVA-challenged animals by both 2×10^{-3} and 6.5×10^{-3} mol/L 1,8-cineole. In addition, the magnitude of the myorelaxation obtained under these conditions was significantly reduced compared with that in OVA-sensitized tissues in the absence of 1,8-cineole.

Interestingly, the efficacy of 1,8-cineole in inhibiting tracheal contractions was higher in K^+ -stimulated than in CCh-contracted tissues. In fact, 1,8-cineole almost abolished the contractions induced by KCl, whereas it only slightly reduced those elicited by CCh. This contrasting effect may be due to a preferential action of 1,8-cineole on the high- K^+ -induced smooth muscle contraction, a cellular pathway that promotes excitation-contraction coupling by activation of voltage-operated Ca^{2+} channels (VOCCs) and transmembrane Ca^{2+} influx.²⁷ In contrast, although ACh may contract many smooth muscles and cause depolarization,²⁸ in airways it is considered that the contractile effects of ACh are due to a mechanism independent of shifts in E_m .^{29,30} This mechanism is comprised of two components: (i) an initial phase resulting from inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum,³¹ and (ii) a sustained

component resulting from dihydropyridine-insensitive Ca^{2+} influx through receptor-operated Ca^{2+} channels (ROCCs).³² It has been reported that in guinea-pig tracheal muscle cells, ACh inhibits L-type Ca^{2+} channel currents (I_{Ca}) via a cytosolic signalling pathway.³³

In the present study, 1,8-cineole did not inhibit the concentration-response curves for CCh in tracheal rings obtained from sensitized animals. In contrast, the maximum response to CCh was enhanced in the presence of 2×10^{-3} mol/L 1,8-cineole. A tendency for a similar enhancement was observed in presence of 6.5×10^{-3} mol/L 1,8-cineole, but the difference did not reach statistical significance because the maximal force induced by CCh was reduced. A previous report showed that contractions induced by either ACh or electrical field stimulation were significantly enhanced by 1,8-cineole¹⁸ through a mechanism that remains to be elucidated. It is of note that although 1,8-cineole did not inhibit the CCh-induced contractions in sensitized animals, it decreased these contractile responses in OVA-challenged tissues, therefore preventing the occurrence of tracheal hyperreactivity. Indeed, the concentration-response curves to CCh were significantly shifted to the right in the presence of 1,8-cineole. Conversely, using KCl as a contractile agent, rings from OVA-challenged showed a decreased response in the presence of 2×10^{-3} mol/L 1,8-cineole, although the maximal effect of KCl was similar to that in sensitized preparations. At 6.5×10^{-3} mol/L, 1,8-cineole almost completely blocked the contractile response to KCl, providing evidence of a preferential action of 1,8-cineole on electromechanically induced tracheal contractions.

Previous studies have shown that greater Ca^{2+} entry is involved in the hyperreactivity of sensitized tissues to spasmogens.³⁴⁻³⁷ Isolated tracheas from OVA-challenged rats did not show hyperresponsiveness to 5-hydroxytryptamine in the presence of either nifedipine or niflumic acid, indicating that increased contractile responses in allergic tissues may be related to greater ionic permeability (Ca^{2+} or Cl^-).³⁶ Enhanced activity of Ca^{2+} channels has been confirmed in hyperresponsive bronchial smooth muscle cells obtained from guinea-pigs challenged with antigen.³⁸ Thus, we hypothesize that the higher efficacy of 1,8-cineole in inhibiting K^+ - rather than CCh-induced contractions in OVA-challenged tissues is due to its preferential action on VOCCs, which are further activated by antigen challenge. In fact, it has been shown that 1,8-cineole depresses the development of force in rat ventricular papillary muscles probably by acting as a Ca^{2+} channel blocker.³⁹

In the present study, 1,8-cineole was unable to alter the contractions induced by cumulative additions of Ca^{2+} to the bath solution in the presence of ACh and in Ca^{2+} -free medium in rings obtained from naïve guinea-pigs. Conversely, when contractile responses to Ba^{2+} , an ion that is poorly permeable through ROCCs but with selective flow through VOCCs,^{31,32} were examined, it was found that 1,8-cineole abolished the responses of tracheal preparations to this ion in the presence of ACh and in Ca^{2+} -free medium. Verapamil, another blocker of L-type Ca^{2+} channels, similarly inhibited the concentration-response curve to Ba^{2+} in tracheal preparations in the presence of ACh and in Ca^{2+} -free medium, despite its inability to block Ca^{2+} -induced contractions under similar conditions.

In conclusion, the results of the present study show that 1,8-cineole is a tracheal myorelaxant and that its mechanism of action involves a preferential action on contractile responses elicited electromechanically. Further studies are necessary to determine whether 1,8-cineole interferes with electromechanical events by acting directly or indirectly on the VOCCs in airway smooth muscle.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FUNCAP and CNPq and it is a part of the PhD requirements to obtain for VPDB. This paper is dedicated to the memory of our friend Dr FJA Matos, Emeritus Professor of the Universidade Federal do Ceará, for his dedication to the study of medicinal plants.

REFERENCES

- Juergens UR, Engelen T, Racké K, Stöber M, Gillissen A, Vetter H. Inhibitory activity of 1,8-cineole (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2004; **17**: 281–7.
- Barton A, Tjandra J, Nicholas P. Chemical evaluation of volatile oils in *Eucalyptus* species. *J. Agric. Food Chem.* 1989; **37**: 1253–7.
- Vigo E, Cepeda A, Gualillo O, Perez-Fernandez R. *In-vitro* anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*: Nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. *J. Pharm. Pharmacol.* 2004; **56**: 257–63.
- Lahlou S, Figueiredo AF, Magalhães PJ, Leal-Cardoso JH. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2002; **80**: 1125–31.
- Abdon AP, Leal-Cardoso JH, Coelho-de-Souza AN, Morais SM, Santos CF. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002; **35**: 1215–19.
- Araújo PF, Coelho-de-Souza AN, Morais SM, Ferreira SC, Leal-Cardoso JH. Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. *Phytomedicine* 2005; **12**: 482–6.
- Moura RS, Emiliano AF, de Carvalho LC *et al.* Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of *Alpinia zerumbet*, a medicinal plant. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2005; **46**: 288–94.
- Magalhães PJ, Lahlou S, Jucá DM *et al.* Vasorelaxation induced by the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2008; **22**: 169–77.
- Liapi C, Anifantis G, Chinou I, Kourounakis AP, Theodosopoulos S, Galanopoulou P. Antinociceptive properties of 1,8-cineole and beta-pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in rodents. *Planta Med.* 2007; **73**: 1247–54.
- Lima-Accioly PM, Lavor-Porto PR, Cavalcante FS *et al.* Essential oil of *Croton nepetaefolius* and its main constituent, 1,8-cineole, block excitability of rat sciatic nerve *in vitro*. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2006; **33**: 1158–63.
- Santos FA, Silva RM, Tomé AR *et al.* 1,8-Cineole protects against liver failure in an *in-vivo* murine model of endotoxemic shock. *J. Pharm. Pharmacol.* 2001; **53**: 505–11.
- Kelen M, Tepe B. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresour. Technol.* 2008; **99**: 4096–104.
- Santos FA, Rao VS. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother. Res.* 2000; **14**: 240–4.
- Santos FA, Silva RM, Campos AR, de Araújo RP, Lima Júnior RC, Rao VS. 1,8-Cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. *Food Chem. Toxicol.* 2004; **42**: 579–84.
- Juergens UR, Dethlefsen U, Steinkamp G, Gillissen A, Reppes R, Vetter H. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: A double-blind placebo-controlled trial. *Respir. Med.* 2003; **97**: 250–6.
- Tesche S, Metternich F, Sonnemann U, Engelke JC, Dethlefsen U. The value of herbal medicines in the treatment of acute non-purulent rhinosinusitis: Results of a double-blind, randomised, controlled trial. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2008; **265**: 1355–9.
- Coelho-de-Souza LN, Leal-Cardoso JH, de Abreu Matos FJ, Lahlou S, Magalhães PJ. Relaxant effects of the essential oil of *Eucalyptus tereticornis* and its main constituent 1,8-cineole on guinea-pig tracheal smooth muscle. *Planta Med.* 2005; **71**: 1173–5.
- Magalhães PJ, Lahlou S, Vasconcelos dos Santos MA, Pradines TL, Leal-Cardoso JH. Myorelaxant effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on the contractile activity of the guinea-pig tracheal smooth muscle. *Planta Med.* 2003; **69**: 874–7.
- Shand DG. Drug therapy: Propranolol. *N. Engl. J. Med.* 1975; **293**: 280–5.
- Narahashi T, Moore JW, Scott WR. Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *J. Gen. Physiol.* 1964; **47**: 965–74.
- Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1995; **268**: C799–822.
- Folkerts G, Nijkamp FP. Nitric oxide in asthma therapy. *Curr. Pharm. Des.* 2006; **12**: 3221–32.
- Magalhães PJ, Criddle DN, Tavares RA, Melo EM, Mota TL, Leal-Cardoso JH. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. *Phytother. Res.* 1998; **12**: 172–7.
- Quast U. Do the K⁺ channel openers relax smooth muscle by opening K⁺ channels? *Trends Pharmacol. Sci.* 1993; **14**: 332–7.
- Lai YL, Tang-Tei FC. Airway hyperresponsiveness and remodeling in antigen-challenged guinea pigs. *Chin. J. Physiol.* 2003; **46**: 9–13.
- Jonsson EW, Dahlén SE. Leukotrienes and other mediators of the Schultz-Dale reaction in guinea-pig lung parenchyma. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* 1995; **23**: 353–5.
- Kirkpatrick CT. Excitation and contraction in bovine tracheal smooth muscle. *J. Physiol.* 1975; **244**: 263–81.
- Bolton TB. Cholinergic mechanisms in smooth muscle. *Br. Med. Bull.* 1979; **35**: 275–83.
- Somlyo AV, Somlyo AP. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1968; **159**: 129–45.
- Coburn RF, Baron CB. Coupling mechanisms in airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1990; **258**: L119–33.
- Cuthbert NJ, Gardiner PJ, Nash K, Poll CT. Roles of Ca²⁺ influx and intracellular Ca²⁺ release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. *Am. J. Physiol.* 1994; **266**: L620–7.
- Wade GR, Barbera J, Sims SM. Cholinergic inhibition of Ca²⁺ current in guinea pig gastric and tracheal smooth muscle cells. *J. Physiol.* 1996; **491**: 307–19.
- Perpina M, Palau M, Cortijo J, Fornas E, Ortiz JL, Morcillo E. Sources of calcium for the contraction induced by various agonists in trachealis muscle from normal and sensitized guinea pigs. *Respiration* 1989; **55**: 105–12.
- Perpina M, Cortijo J, Fornas E, Palau M, Ortiz JL, Morcillo E. Hyper-reactivity and ⁴⁵Ca movements in sensitized guinea-pig tracheal muscle. *Eur. Respir. J.* 1991; **4**: 450–7.
- Chiba Y, Misawa M. Alteration in Ca²⁺ availability involved in antigen-induced airway hyperresponsiveness in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1995; **278**: 79–82.
- Moura CT, Bezerra FC, de Moraes IM, Magalhães PJ, Capaz FR. Increased responsiveness to 5-hydroxytryptamine after antigenic challenge is inhibited by nifedipine and niflumic acid in rat trachea *in vitro*. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2005; **32**: 1119–23.
- Wang Z, Ma Z, Zhou J. Changes of Ca²⁺ channel behaviors in bronchial smooth muscle cells of asthma guinea-pig model. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 2001; **24**: 539–41 (in Chinese).
- Soares MC, Damiani CE, Moreira CM, Stefanon I, Vassallo DV. Eucalyptol, an essential oil, reduces contractile activity in rat cardiac muscle. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2005; **38**: 453–61.
- Murray RK, Kotlikoff MI. Receptor-activated calcium influx in human airway smooth muscle cells. *J. Physiol.* 1991; **435**: 123–44.