

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PNEUMOLOGIA**

**CONTRIBUIÇÃO DA HEPARINA INALATÓRIA NO  
ESTUDO DOS MECANISMOS DA ASMA INDUZIDA  
PELO EXERCÍCIO**

T-1449

**FABIANE KAHAN**

Porto Alegre

2001

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: PNEUMOLOGIA**

**CONTRIBUIÇÃO DA HEPARINA INALATÓRIA NO  
ESTUDO DOS MECANISMOS DA ASMA INDUZIDA  
PELO EXERCÍCIO**

**FABIANE KAHAN**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Pneumologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Pneumologia.

**Orientadores: Profa. Dra. Jussara Fiterman**  
**Prof. Dr. Luiz Carlos Corrêa da Silva**

Porto Alegre  
2001

***À minha grande amiga Jussara Fiterman,  
pelo apoio e incentivo constante e pelo  
exemplo de pessoa a ser seguido.***

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

- Aos meus pais, Elias e Marlene Kahan, pela dedicação e carinho em todos momentos da minha vida.
- À minha irmã, Tanira Kahan, minha verdadeira amiga.
- Aos meus tios Tania e Felipe Alboim e ao meu primo Rodrigo, pela presença constante e marcante em minha vida.
- À minha prima, Carolina Alboim, pela disponibilidade e inestimável auxílio na realização deste trabalho.
- Ao Paulo Roberto Kriese, por me fazer feliz.

## **AGRADECIMENTOS**

- À Maria Helena Andrade, meu braço direito na realização deste estudo, pelas palavras de carinho.
- Ao professor Nivaldo A. Fonseca, pela assessoria estatística.
- À Denise Cantarelli Machado pela realização da quantificação dos mediadores liberados pelo Mastócito.
- À Clarice Luz, pelo apoio fundamental na realização da quantificação da Histamina.
- À Clarice Bohn Knies, pela disponibilidade em corrigir esse trabalho.
- Ao amigo Eduardo W. Zettler, companheiro de Residência, de pós-graduação e consultório, pela paciência e pelos conselhos dados durante a realização deste estudo.
- Aos colegas do Serviço de Pneumologia do Hospital São Lucas da PUCRS, pelos ensinamentos e pela amizade.

# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
RESUMO .....	xii
SUMMARY .....	xv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Mecanismos da asma induzida pelo exercício .....	12
1.2 O mastócito .....	17
1.3 Heparina .....	30
1.4 Heparinas de baixo peso molecular .....	36
1.5 Ações antialérgicas da heparinas .....	38
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
2.1 Geral .....	50
2.2 Específicos .....	50
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
3.1 Delineamento .....	52
3.2 Seleção de pacientes .....	52
3.2.1 Critérios de inclusão .....	53
3.2.2 Critérios de exclusão .....	53

---

3.3 Avaliação da função pulmonar .....	53
3.4 Teste de esforço .....	54
3.5 Agentes .....	55
3.6 Aerolização.....	55
3.7 Protocolo .....	55
3.8 Dosagem de histamina, leucotrienos e interleucinas.....	57
3.9 Análise estatística.....	58
4 RESULTADOS.....	60
5 DISCUSSÃO .....	75
6 CONCLUSÕES.....	89
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
8 ANEXO .....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AIE – asma induzida pelo exercício
- AMP – monofosfato de adenosina
- ANOVA – análise de variância
- ATTP – tempo de tromboplastina parcial ativada
- ATIII – antitrombina III
- BIA – broncoconstrição induzida por antígeno
- BIE – broncoconstrição induzida por exercício
- BIH – broncoconstrição induzida por hiperventilação
- DAG – diacilglicerol
- DP<sub>20</sub> – dose cumulativa de uma substância, por mol, que produz queda de 20% no VEF<sub>1</sub>
- FcεRI – porção FC do anticorpo imunoglobulina E
- GTP – guanosina trifosfato
- HBPM – heparina de baixo peso molecular
- HNF – heparina não fracionada
- HRVA – hiper-responsividade da via aérea
- 5-HPTE – ácido 5- hidroperoxyeicosatetraenóico
- IL – interleucinas
- IgE – imunoglobulina E



- 
- IP<sub>3</sub> – fosfatidilinositol trifosfato ou 1,4,5-trifosfato
- LTA<sub>4</sub> – leucotrieno A<sub>4</sub>
- LTB<sub>4</sub> – leucotrieno B<sub>4</sub>
- LTC<sub>4</sub> – leucotrieno C<sub>4</sub>
- LTD<sub>4</sub> – leucotrieno D<sub>4</sub>
- LTE<sub>4</sub> – leucotrieno E<sub>4</sub>
- MC<sub>c</sub> – mastócito rico em quimase
- MC<sub>t</sub> – mastócito rico em triptase
- MC<sub>tc</sub> – mastócito rico em triptase e quimase
- PCE – proteína catiônica eosinofílica
- PFE – pico de fluxo expiratório
- PGD<sub>2</sub> – prostaglandina D<sub>2</sub>
- PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>
- PGF<sub>2</sub> – prostaglandina F<sub>2</sub>
- PGG<sub>2</sub> – prostaglandina G<sub>2</sub>
- PGH<sub>2</sub> – prostaglandina H<sub>2</sub>
- PGI<sub>2</sub> – prostaglandina I<sub>2</sub>
- PH – concentração de íons hidrogênio
- PM – peso molecular
- PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
- Rp – resistência pulmonar
- TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral  $\alpha$
- TXA<sub>2</sub> – tromboxano A<sub>2</sub>
- VEF<sub>1</sub> – volume expiratório forçado no primeiro segundo

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Eventos bioquímicos da ativação do mastócito .....	22
Figura 2: Testes de exercício realizados de março de 1996 a junho de 2000 .....	61
Figura 3: Efeito do pré-tratamento com placebo na queda do VEF <sub>1</sub> pós- exercício. ....	67
Figura 4: Efeito do pré-tratamento com HNF na queda do VEF <sub>1</sub> , pós- exercício, nos diferentes dias de pré-tratamento .....	68
Figura 5: Efeito do pré-tratamento com HBPM na queda do VEF <sub>1</sub> , pós- exercício, nos diferentes dias de pré-tratamento .....	69
Figura 6: Porcentagem de proteção de broncoconstrição com HNF aos 5 e 10 minutos .....	70
Figura 7: Porcentagem de proteção de broncoconstrição com HBPM aos 5 e 10 minutos .....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características da população estudada.....	62
Tabela 2 - VEF <sub>1</sub> , CVF e VEF <sub>1</sub> /CVF basais na triagem.....	63
Tabela 3 - VEF <sub>1</sub> basais nos diferentes dias do estudo.....	64
Tabela 4 - Efeito do pré-tratamento com Placebo, HNF e HBPM no VEF <sub>1</sub> nos diferentes intervalos de tratamento.....	65
Tabela 5 - Porcentagem de queda do VEF <sub>1</sub> pós-exercício nos diferentes intervalos de tratamento.....	66
Tabela 6 - Concentração de histamina (ng/ml) nos diferentes dias de pré-tratamento.....	72
Tabela 7 - Concentração de leucotrienos cisteínicos (pg/ml) nos diferentes dias de pré-tratamento.....	73
Tabela 8 - Concentração de IL <sub>4</sub> (pg/ml) nos diferentes dias de pré- tratamento.....	73

## RESUMO

**Introdução:** Alguns indivíduos podem apresentar broncoconstrição induzida pelo exercício (BIE). Várias hipóteses tentam explicar esse fenômeno, porém o mecanismo responsável pela asma induzida pelo exercício (AIE) permanece controverso.

**Objetivos:** Estudar os mecanismos envolvidos na broncoconstrição induzida pelo exercício através do uso da heparina inalatória. Verificar o efeito protetor das heparinas de baixo peso molecular (HBPM) na AIE, bem como comparar seu efeito com o da heparina não fracionada (HNF) e observar o tempo de ação das heparinas na inibição da BIE.

**Material e métodos:** Pacientes assintomáticos com história sugestiva de AIE realizaram teste de exercício em esteira ergométrica, com aumento gradativo do esforço, até atingir 85% da frequência cardíaca máxima, permanecendo em exercício por 10 minutos. Todos os pacientes que apresentaram uma queda do volume expiratório forçado no primeiro segundo ( $VEF_1$ ) pós-exercício maior ou igual a 15% na triagem

---

prossegiram no protocolo. Nos dias subseqüentes, o VEF<sub>1</sub> foi medido antes e depois do exercício, com pré-tratamento com placebo, HNF (1.000 UI/Kg) ou HBPM (1 mg/Kg) administrados 1, 3 ou 6 horas antes do esforço. Foram coletadas amostras de sangue para dosagem de mediadores. Para a análise estatística dos dados obtidos, utilizou-se a análise de variância de medidas repetidas (ANOVA), o teste t de Student para amostras pareadas e não pareadas e o teste de Wilcoxon. O nível de significância adotado foi igual a 0,05.

**Resultados:** Nove pacientes completaram o protocolo. A queda máxima do VEF<sub>1</sub> pós-exercício foi de 26,67±12,55% aos 5 minutos e de 24,56±19,76% aos 10 minutos na triagem e 22,78±12,53% e de 20,56±19,58%, respectivamente, no dia de pré-tratamento com placebo. As quedas do VEF<sub>1</sub>, nesses dois dias, não foram diferentes ( $p=0,318$  aos 5 minutos e  $p=0,384$  aos 10 minutos). A queda média do VEF<sub>1</sub> após o exercício, com pré-tratamento com HNF 1, 3 e 6 horas, foi respectivamente de 14±13%, 6±8% e 10±16% aos 5 minutos e de 10±13%, 4±9% e 9±16% aos 10 minutos. Com pré-tratamento com HBPM 1, 3 e 6 horas, a queda média respectiva foi de 10±10%, 6±12% e 13±14%, aos 5 minutos e de 7±13%, 7±14% e 10±15% aos 10 minutos. Em todos os intervalos de pré-tratamento, a HNF e a HBPM atenuaram significativamente a queda do VEF<sub>1</sub> ( $p \leq 0,05$ ). A HNF protegeu a queda do VEF<sub>1</sub> induzida pelo exercício em 48%, 78% e 63% aos 5 minutos e em 58%, 83% e 62% aos 10 minutos quando administrada 1, 3 e 6 horas antes do teste de exercício, respectivamente. Já

---

com a HBPM, a proteção da queda do VEF<sub>1</sub> nos mesmos intervalos foi de 63%, 78% e 52% aos 5 minutos e de 70%, 70% e 58% aos 10 minutos. Não houve diferença no efeito protetor da AIE entre as drogas utilizadas (IC94,1%: [- 13,5 a 12] ).A histamina e a IL-4 diminuíram após o pré-tratamento com HBPM. A IL4 aumentou após o exercício no dia de pré-tratamento com placebo.

**Conclusões:** A HNF e a HBPM atenuam a BIE quando administradas até 6 horas antes do teste de esforço. O provável mecanismo de ação para essa proteção está na modulação de mediadores pelo mastócito, via canal IP<sub>3</sub>.

## SUMMARY

**Introduction:** Certain individuals are susceptible to exercise-induced bronchoconstriction (EIB). Various hypotheses have been proposed to explain this phenomenon. However, the mechanism responsible for exercise-induced asthma (EIA) remains subject to controversy.

**Objectives:** To study the mechanisms involved in bronchoconstriction induced by exercise, with the use of inhalant heparin. To verify the protective effect of low molecular weight heparin (LMWH) in EIB, in comparing its effect with non-fractionated heparin (NFH) and in examining the time of effect of the two heparin preparations in reducing EIB.

**Material and methods:** Asymptomatic patients with a history suggesting susceptibility to EIA underwent a treadmill exercise test with gradual increase in exertion, until reaching 85% maximum heart rate and continuing exercise for an additional 10 min. All patients who demonstrated a post-exercise decrease in FEV<sub>1</sub> more than or equal to 15%, were selected to enter into study. On the following day, FEV<sub>1</sub> was determined before and after exercise in patients pre-treated with placebo, NFH (1000 IU/Kg) or LMWH

---

(1mg/Kg) at 1, 3 or 6 hr before the stress test. To measure the mediator concentrations, blood samples were collected. Statistical analysis of the data obtained was performed using the analysis of variance test for repeated measurements (ANOVA), Student's *t* test for paired and unpaired samples and the Wilcoxon test. Differences with *p* values less than 0.05 were considered statistically significant.

**Results:** Nine patients completed the protocol. The maximum decrease in FEV<sub>1</sub> was 26.67±12.55% at 5 min post-exercise and 24.56 ±19.76% at 10 min post-exercise, and 22.78 ±12.53% and 20.56 ±19.58%, respectively, on the day of pre-treatment with placebo. The decreases in FEV<sub>1</sub> during these two days were not significantly different (*p*=0.318 at 5 min and *p*=0.384 at 10 min). The decrease in mean FEV<sub>1</sub> following exercise in patients pre-treated with NFH at 1, 3 and 6 hr, was 14±13%, 6±8% and 10±16%, respectively, at 5 min, and 10±13%, 4±9% and 9±16%, respectively, at 10 min. The decrease in mean FEV<sub>1</sub> post-exercise in patients pre-treated with LMWH at 1, 3 and 6 hr was 10±10%, 6±12% and 13±14%, respectively, at 5 min, 7±13%, 7±14% and 10±15%, respectively, at 10 min. At all pre-treatment time points, NFH and LMWH attenuated significantly the decrease in FEV<sub>1</sub> (*p* ≤ 0.05). NFH reduced the decrease in FEV<sub>1</sub> induced by exercise after 5 min by 48%, 78% and 63%, and after 10 min by 58%, 83% and 62%, when administered 1, 3 or 6 hr, respectively, prior to the stress test. LMWH lessened the decrease in FEV<sub>1</sub> induced by exercise, at 5 min by 63%, 78% and 52%, and after 10 min by 70%, 70% and 58% when



---

administered 1,3 or 6 hr, respectively, prior to the exercise test. There was no difference in protective effect in EIA between the two drugs used (94.1% CI: [- 13,5 to 12] ). Histamine and IL-4 decreased post exercise after pre-treatment with LMWH. IL4 increased post exercise after pre-treatment with placebo.

**Conclusions:** Both NFH and LMWH attenuated EIB when administered up to 6 hr before the exertion test. The likely mechanism of action for this protective effect involves the modulation of mediators by mast cells via IP<sub>3</sub> channels.

# 1 INTRODUÇÃO

# 1 INTRODUÇÃO

Asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada por obstrução ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com tratamento, e por hiper-responsividade das vias aéreas a diversos estímulos. Em indivíduos suscetíveis, essas alterações induzem episódios recorrentes de dispnéia, sibilância, aperto no peito e tosse<sup>(1,2)</sup>.

Evidências indicam que pode ocorrer, em alguns pacientes, fibrose da membrana basal da mucosa, provocando anormalidades persistentes da função pulmonar<sup>(1,2)</sup>.

A despeito do advento de novas drogas broncodilatadoras e da introdução da terapia antiinflamatória, a prevalência e a mortalidade da asma vêm aumentando em diversas regiões<sup>(3, 4, 5, 6)</sup>.

Várias são as causas sugeridas para explicar esses índices, porém o conhecimento atual sobre essa enfermidade pouco contribuiu para a mudança desse perfil epidemiológico.

Muitos indivíduos que são levados a alterar sua rotina diária por apresentarem broncoespasmo induzido por esforços físicos são considerados portadores de asma induzida pelo exercício (AIE).

Aretaeus, há mais ou menos 1800 anos (120 - 200 AD), já observava que o esforço físico provocava obstrução da via aérea. Floyer, 300 anos após, começou a especular sobre os possíveis eventos envolvidos nesse fenômeno.

Em 1946, Herxheimer sugeriu a existência de um mecanismo para a broncoconstrição induzida pelo exercício (BIE)<sup>(7)</sup>.

A presença de AIE pode ser demonstrada em nível laboratorial através da queda de 10% do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>) em relação ao VEF<sub>1</sub> basal, pré-exercício. Alguns autores consideram que uma queda de 15% do VEF<sub>1</sub> define um diagnóstico mais preciso<sup>(1, 2, 8, 9, 10, 11, 12)</sup>.

A asma induzida pelo exercício é uma condição comum em asmáticos, na população em geral, bem como em atletas. Quarenta a noventa por cento dos asmáticos apresentam broncoespasmo ao exercitarem-se, o mesmo ocorrendo em 40% dos pacientes com rinite alérgica<sup>(8, 9, 13)</sup>.

Estudo longitudinal realizado na Dinamarca, com o objetivo de verificar se o teste de exercício é capaz de auxiliar na identificação de crianças assintomáticas com alto risco de desenvolver sintomas

---

respiratórios, demonstrou que 9% dos pacientes estudados que apresentaram hiper-responsividade brônquica ao exercício tiveram sibilância no ano seguinte ao teste de esforço. Além disso, 6% das crianças com teste de exercício positivo desenvolveram tosse no seguimento<sup>(14)</sup>.

No Quênia, 1.226 crianças, com idade entre 8 e 17 anos, provenientes de escolas urbanas e rurais, realizaram teste de exercício durante 6 minutos (corrida ao ar livre). Vinte e três por cento das crianças oriundas de escolas urbanas apresentaram queda do VEF<sub>1</sub> maior ou igual a 10%, enquanto 13% das crianças provenientes de escolas rurais desenvolveram BIE<sup>(15)</sup>.

A BIE ocorre também com freqüência elevada em atletas, influenciando seus desempenhos em competições e prejudicando, algumas vezes, o alcance de seus objetivos. Em Indianápolis, verificou-se que 35% dos patinadores apresentavam broncoespasmo durante as competições<sup>(16)</sup>; o mesmo ocorreu em 11% dos jogadores de hóquei suíços estudados em 1997<sup>(17)</sup>. Em avaliação realizada em atletas de uma escola americana, observou-se uma taxa significativa de BIE não diagnosticada nesses indivíduos. Nove por cento dos atletas apresentaram uma queda de 15% do pico de fluxo expiratório após uma corrida ao ar livre<sup>(18)</sup>.

Pacientes com AIE costumam apresentar uma resposta típica ao esforço físico. Usualmente, esses indivíduos conseguem manter e finalizar uma atividade física vigorosa. Durante os primeiros minutos de exercício, existe uma broncodilatação inicial. Acredita-se que tal fato ocorra pela

---

liberação endógena de catecolaminas que afetam o tônus da musculatura lisa brônquica, embora existam controvérsias em relação ao exato mecanismo desse efeito<sup>(8, 9)</sup>. Outros mecanismos postulados para explicar essa broncodilatação incluem: redução da temperatura da via aérea, que, em cães, inibiu a liberação de mediadores, liberação de um mediador broncodilatador, existência de um mecanismo reflexo, diminuição do tônus vagal, liberação de peptídeos vasoativos intestinais e fatores relaxantes derivados do epitélio<sup>(19)</sup>.

Alguns autores acreditam ser pouco provável que o mediador causador da broncodilatação seja uma catecolamina circulante, já que a administração de  $\beta$ -bloqueadores não atenua o aumento dos fluxos durante o exercício<sup>(19, 20)</sup>. Outro estudo, realizado por Sly e colaboradores, mostrou que a infusão de norepinefrina endovenosa, nas mesmas concentrações achadas durante o exercício, provocou apenas uma pequena alteração no tônus da via aérea<sup>(21)</sup>.

A obstrução da via aérea costuma iniciar logo após o exercício, atingindo seu pico entre 5 e 10 minutos, após o que há remissão espontânea do broncoespasmo, com melhora total da função pulmonar em torno de 30 a 60 minutos<sup>(8, 9)</sup>.

Determinados pacientes, entretanto, apresentam broncoespasmo durante o exercício, como mostraram Beck e colaboradores em 1994. O objetivo dos autores era demonstrar as alterações fisiológicas associadas aos sintomas de BIE. Estudaram 8 pacientes em 3 dias diferentes. No

---

primeiro dia, o paciente exercitava-se com velocidade constante e, nos dias subseqüentes, alternava períodos de exercício com velocidades distintas. Concluíram que pacientes com BIE podem apresentar constrição durante o esforço, particularmente durante os períodos em que há diminuição da intensidade do exercício, embora a obstrução seja reversível se o esforço for aumentado<sup>(19)</sup>.

Em 1995, Suman e colaboradores, com o objetivo de avaliar a obstrução da via aérea durante o exercício, estudaram 6 pacientes asmáticos em sessão de exercício curta (6 minutos) e longa (20 minutos). Observaram que a obstrução da via aérea ocorreu durante o exercício, especialmente em sessões longas de esforço, pois a broncoconstrição iniciava a partir do 15º minuto do teste<sup>(22)</sup>.

Os mesmos autores, para comparar medidas pulmonares durante um teste de exercício longo (20 minutos) com um teste de hiperventilação isocápnica longa (20 minutos), estudaram 6 indivíduos asmáticos. O pico de fluxo expiratório (PFE) e o VEF<sub>1</sub> diminuíram durante ambos os testes, porém a resistência pulmonar inspiratória só se elevou durante o teste de exercício. A função pulmonar alterou-se após os testes, como era esperado. Os autores concluíram que o grau de obstrução da via aérea durante o teste de exercício prolongado era mais intenso do que o observado durante o teste de hiperventilação isocápnica, trazendo dúvidas quanto à equivalência dos testes no estudo da função pulmonar durante a AIE<sup>(23)</sup>.

Nove pacientes com AIE e cinco pacientes sem asma foram estudados por Beck e colaboradores com a finalidade de avaliar os métodos usados para documentar as alterações nas vias aéreas durante e após o exercício. A via aérea foi avaliada por medidas da resistência pulmonar ( $R_p$ ) e pelo  $VEF_1$ . A queda do  $VEF_1$  após o exercício foi de  $24 \pm 14\%$  e a  $R_p$  aumentou  $176 \pm 153\%$  nos pacientes com AIE; no grupo controle, não foram observadas quaisquer alterações nas medidas realizadas. Durante o exercício, observou-se uma tendência de o  $VEF_1$  aumentar nos asmáticos, ficando inalterado no grupo controle. A  $R_p$ , entretanto, apresentou um leve aumento durante o exercício em ambos os grupos. Quando as mudanças, em porcentagem, na  $R_p$  e no  $VEF_1$ , durante e após o exercício, foram comparadas, foi observada uma grande concordância entre as duas medidas avaliadas. Os autores concluíram, portanto, que as alterações na  $R_p$  e no  $VEF_1$  produziam índices equivalentes de variação da função pulmonar durante e após o exercício<sup>(24)</sup>.

Os pacientes em crise de asma precipitada pelo exercício apresentam os mesmos sintomas observados em crises desencadeadas por outros estímulos, ou seja, apresentam dispnéia, sibilância, tosse e aperto no peito associados a hiperinsuflação, obstrução do fluxo aéreo e hipoxemia<sup>(8)</sup>.

A gravidade da AIE depende de vários fatores: da duração, intensidade e tipo de exercício, das condições do ar ambiente, do intervalo entre o último episódio de BIE e o próximo exercício e da correlação entre a inflamação eosinofílica da via aérea e a gravidade da crise de asma. O



---

exercício deve ser realizado por no mínimo 6 minutos para desencadear broncoespasmo, e quanto maior o esforço, maior será a gravidade da crise. Além disso, alguns esportes são mais propensos a induzir sintomas de asma. A corrida, por exemplo, induz mais BIE do que a natação. Os exercícios realizados em locais frios e secos costumam provocar broncoconstrição em indivíduos suscetíveis<sup>(8, 9, 25)</sup>.

Yoshikawa e colaboradores, com o objetivo de verificar a relação entre a inflamação eosinofílica da via aérea e a gravidade da BIE, estudaram 21 pacientes asmáticos e 9 controles. Todos os participantes do estudo coletaram amostras de escarro induzido antes da realização de broncoprovocação com metacolina e exercício. Os autores verificaram que a concentração de eosinófilos e da proteína catiônica eosinofílica (PCE) no escarro era maior nos pacientes com AIE do que nos asmáticos que não apresentaram BIE no grupo controle. A gravidade da BIE correlacionou-se significativamente com a concentração de eosinófilos e PCE no escarro. Não houve correlação entre a hiper-responsividade à metacolina e a gravidade da BIE, e entre a concentração de eosinófilos e a PCE no escarro. Os autores concluíram que a gravidade da AIE está mais associada à inflamação eosinofílica da via aérea do que à hiper-responsividade à metacolina. De acordo com isso, é possível que a broncoconstrição estimulada por vários mediadores derivados dos mastócitos seja marcadamente potencializada pela inflamação eosinofílica<sup>(26)</sup>.

O exercício é o único precipitante natural da asma que induz taquifilaxia<sup>(6)</sup>. Cerca de 45% dos pacientes com AIE apresentam um período refratário característico, durante o qual mais exercício não causa broncoespasmo. Quando o exercício é repetido após intervalos de 30 a 90 minutos, verifica-se que a broncoconstrição diminui ou não ocorre<sup>(9, 25)</sup>. A presença de um período refratário parece ser independente do grau de obstrução provocado pelo primeiro teste e inversamente relacionada ao tempo que separa as duas provocações consecutivas pelo exercício. O mecanismo preciso para explicar esse fenômeno permanece incerto<sup>(7)</sup>.

Estudos que examinaram o efeito da indometacina em homens e coelhos sugeriram que a refratariedade a tumos repetidos de exercício observada nos humanos e a refratariedade à hiperpnéia observada em animais são ambas dependentes da geração de prostaglandinas broncodilatadoras, embora a indometacina não tenha bloqueado a refratariedade à hiperpnéia em asmáticos humanos<sup>(27, 28, 29)</sup>.

Em 1993, Manning e colaboradores, para testar a hipótese de que o leucotrieno D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) estimula a liberação de uma prostaglandina inibitória responsável pela refratariedade ao exercício, estudaram 14 pacientes com história de BIE. Após triagem para documentar a BIE, os pacientes realizavam duas provocações, com exercício ou com LTD<sub>4</sub>, com um intervalo de uma hora entre elas, em dois dias distintos. Oito pacientes prosseguiram em um protocolo duplo cego, randomizado, controlado com placebo e cruzado com flurbiprofeno, inibidor da sintetase de prostaglandinas. Os

autores verificaram que houve uma redução da intensidade do broncoespasmo na segunda broncoprovocação com o exercício (refratariedade) e com o LTD<sub>4</sub> (taquifilaxia). Observaram também que o flurbiprofeno atenuou a taquifilaxia ao LTD<sub>4</sub> e a refratariedade cruzada entre o exercício e o tratamento com LTD<sub>4</sub>, ocorridas nesse estudo. A queda média do VEF<sub>1</sub> provocada pelo exercício, uma hora após a provocação com LTD<sub>4</sub>, foi de 12,3% com placebo e de 17,1% com flurbiprofeno ( $p = 0,027$ ). De forma similar, uma hora após o exercício, a concentração necessária para uma queda do VEF<sub>1</sub> de 20% com o LTD<sub>4</sub> foi de 0,73 µg/ml com placebo e de 0,30 µg/ml com flurbiprofeno. Os autores concluíram que a liberação de LTD<sub>4</sub> na via aérea de asmáticos, possivelmente, estimulou a produção de uma prostaglandina inibitória que causa refratariedade ao exercício<sup>(30)</sup>.

Bisschop e colaboradores, com o objetivo de testar o efeito do aquecimento pré-exercício na AIE, avaliaram três tipos diferentes de aquecimento em 16 crianças asmáticas. Posteriormente, verificaram a eficiência do melhor tipo de aquecimento em 30 crianças asmáticas. A função pulmonar foi verificada pela medida do PFE, realizada antes e após o esforço. Concluíram que uma escala personalizada de aquecimento antes do exercício atenuava a queda do PFE em 80% das crianças estudadas, provavelmente devido à liberação de prostaglandinas inibitórias durante os períodos de aquecimento<sup>(31)</sup>.

Outro aspecto controverso relacionado à AIE é a existência ou não de uma resposta tardia ao exercício (3 a 12 horas após). Vários estudos

---

descreveram a ocorrência de uma resposta tardia ao exercício, com uma prevalência variando em torno de 10 a 89%<sup>(8, 9,32)</sup>. No entanto, outros estudos falharam em demonstrar essa resposta. O grande problema desses estudos foi a falta de um dia controle para avaliar as variações espontâneas da função pulmonar e compará-las com aquelas observadas durante o dia do exercício<sup>(8, 9,32)</sup>.

Hofstra e colaboradores, utilizando análise de regressão linear múltipla para cada paciente, estudaram 17 crianças asmáticas com o objetivo de investigar a ocorrência de uma resposta tardia ao exercício. As crianças, após a realização de uma triagem para verificar a presença de AIE, realizavam medidas VEF<sub>1</sub> sem provocação, com provocação por exercício e por histamina, em três dias distintos. O VEF<sub>1</sub> era medido repetidamente durante oito horas. Os 15 pacientes que concluíram o estudo apresentaram resposta imediata ao exercício e à histamina e não demonstraram resposta tardia ao esforço<sup>(33)</sup>.

Koh e colaboradores estudaram 17 crianças com asma, com vistas a determinar quanto uma resposta asmática tardia ao alergênio (*Dermatophagoides pteronyssinus*) poderia alterar a resposta da via aérea ao exercício, levando, também, ao desenvolvimento de uma resposta tardia. As crianças realizaram teste de esforço dois dias antes e dois dias após a provocação com o alergênio. O VEF<sub>1</sub> foi medido durante intervalos regulares, por 10 horas, após cada provocação, inclusive durante um dia em que não foram realizados testes de provocação para avaliar as flutuações

---

espontâneas do VEF<sub>1</sub>. Broncoprovocação com metacolina foi feita antes da provocação com antígeno e antes da realização do teste de exercício feito após a provocação com alergênio. Os autores verificaram que todos os pacientes apresentaram resposta asmática imediata isolada após o teste de exercício, antes da inalação de *Dermatophagoides pteronyssinus*. Sete crianças apresentaram resposta dupla (imediate e tardia) após a realização do teste de esforço, após inalação de alergênio. Eles concluíram que a resposta tardia ao exercício ocorria em algumas crianças com asma e que esse fato relacionou-se com o aumento da sensibilidade à metacolina, causada pelo *Dermatophagoides pteronyssinus*<sup>(34)</sup>.

### 1.1 MECANISMOS DA ASMA INDUZIDA PELO EXERCÍCIO

Aceita-se que a patogênese da BIE está associada ao fluxo de calor e água da mucosa brônquica em direção à luz do brônquio com objetivo de condicionar grandes volumes de ar que chegam ao trato respiratório inferior<sup>(8)</sup>.

O ar inspirado tem uma temperatura de 20 a 23° Celsius e 6 a 12 mg/litro de água (em uma umidade relativa do ar entre 30 e 60%). Em uma inspiração normal, o ar é condicionado, pelo nariz, a uma temperatura de 37° Celsius com 44 mg/litro de água, chegando quente e úmido às vias aéreas inferiores<sup>(9)</sup>. Durante o exercício, há um aumento da frequência respiratória e

grande parte do ar é inspirado pela boca, chegando à via aérea inferior frio e seco<sup>(8, 9)</sup>.

Dentre as hipóteses que tentam explicar os mecanismos da BIE, uma está relacionada à alteração da temperatura e outra à mudança na umidade nas vias aéreas durante os exercícios físicos.

A primeira hipótese relaciona-se com o resfriamento da via aérea devido à perda de calor da mucosa brônquica durante o exercício, provocando constrição da microvasculatura brônquica. Após o exercício, o rápido reaquecimento da via aérea ocasiona uma hiperemia reativa com aumento da permeabilidade capilar e edema da parede brônquica, com conseqüente estreitamento da via aérea<sup>(7, 8, 9, 32, 35)</sup>.

Mc Fadden e colaboradores demonstraram, por meio da medida da temperatura em diversos pontos da árvore traqueobrônquica, que a queda da temperatura na via aérea está diretamente relacionada ao volume de ar inspirado por minuto e inversamente relacionada à temperatura e à concentração de água no ar inspirado<sup>(36)</sup>. Entretanto, até o presente momento, não existem evidências mostrando alterações diretas no fluxo sanguíneo decorrentes de variações da temperatura na via aérea<sup>(32, 37)</sup>.

O surfactante pulmonar estabiliza os alvéolos e mantém a patência dos brônquios. A sua função pode diminuir devido a inflamação da via aérea e esse fato pode ser agravado com a diminuição da temperatura no trato respiratório inferior que ocorre na AIE. Enhorning e colaboradores avaliaram

o efeito da temperatura na função do surfactante pulmonar. O estudo descreveu como as alterações na temperatura afetaram a função do surfactante pulmonar modificado pela inflamação. A reação inflamatória foi obtida de três maneiras: adicionando proteínas plasmáticas a um preparado de surfactante funcionante, infectando o lavado broncoalveolar de ratos com vírus sincicial respiratório e realizando broncoprovocação com alergênio em pacientes com asma leve. Os autores verificaram que os preparados de surfactantes adicionados a proteínas perdiam gradualmente sua função à medida que a temperatura diminuía. A mesma disfunção foi observada no lavado broncoalveolar de ratos e humanos. Eles concluíram que a inflamação da via aérea diminuiu a ação do surfactante, principalmente em baixas temperaturas. Essa poderia ser uma razão para o aumento da resistência das vias aéreas observado em pacientes com AIE<sup>(38)</sup>.

A noção de que a rápida expansão da microvasculatura brônquica gera broncoespasmo fica sem justificativas quando estudos mostraram uma atenuação da BIE com o uso de drogas como o cromoglicato de sódio, o nedocromil sódico e  $\beta_2$ -agonistas. Nenhuma dessas drogas apresenta efeitos significativos na musculatura lisa vascular. Além disso, a AIE pode ocorrer mesmo quando não há resfriamento da via aérea ou durante o exercício, ou seja, antes da ocorrência do rápido reaquecimento da via aérea<sup>(39,40)</sup>. O resfriamento dos brônquios parece ser um epifenômeno do exercício, não sendo essencial para o desenvolvimento do BIE<sup>(37)</sup>.

A segunda hipótese relaciona-se com o ressecamento da via aérea secundário à perda de água da mucosa brônquica durante o exercício, com o objetivo de umidificar o ar seco que chega ao trato respiratório inferior. Como consequência da desidratação da via aérea, ocorre um aumento da osmolaridade brônquica, induzindo a liberação de mediadores pelos mastócitos. Esses mediadores seriam os responsáveis pelo estreitamento da via aérea<sup>(7, 8, 9, 32, 37, 41)</sup>.

Existem algumas evidências significativas em humanos de que os mastócitos estão presentes no epitélio da via aérea em condições ideais de responder às variações osmóticas do ambiente<sup>(42)</sup>. Sabe-se, também, que os mastócitos humanos podem degranular e liberar mediadores em resposta à alteração de osmolaridade da via aérea<sup>(43, 44)</sup>.

Argyros e colaboradores, com a finalidade de avaliar o papel isolado da perda de água na BIE, criaram condições para que o gás inspirado resultasse na perda de água do brônquio sem alterar a liberação de calor pela via aérea. O estudo demonstrou que o broncoespasmo pode ser induzido sem perda significativa de calor e sugeriu que a constrição brônquica é proporcional à quantidade de água perdida pela mucosa<sup>(45)</sup>.

Em 1999, foi realizado um estudo em cães para documentar os efeitos transitórios da hiperventilação com ar seco no volume do fluido da superfície aérea, bem como na osmolaridade; procurou-se também determinar se a cinética do volume do fluido da superfície aérea é consistente com a hipótese de broncoconstrição induzida por hiperpnéia,



devido a alterações da osmolaridade. Os autores verificaram que a exposição das vias aéreas sublobares a ar frio, na insuflação basal, resultou em medidas estáveis do volume e da osmolaridade do fluido da superfície aérea e na resistência da via aérea. A insuflação basal das vias aéreas com ar úmido aumentou o volume, mas não alterou a osmolaridade. A hiperventilação com ar úmido aumentou o volume do fluido da superfície aérea e a resistência da via aérea, mas diminuiu a osmolaridade. A hiperventilação com ar seco aumentou o volume e a osmolaridade do fluido da superfície aérea, bem como a resistência da via aérea. A osmolaridade do fluido da superfície aérea, durante a hiperventilação com ar seco, correlacionou-se fortemente com a broncoconstrição e apresentou uma tendência a ser inversamente proporcional ao volume do fluido da superfície aérea. Os autores concluíram que essas observações são consistentes com a hipótese que sugere que as alterações na osmolaridade da via aérea iniciam a broncoconstrição periférica<sup>(46)</sup>.

Mc Fadden e colaboradores, procurando determinar o quanto a desidratação da via aérea induz asma, estudaram oito pacientes com história de AIE. Esses pacientes realizavam hiperventilação isocápnica por 1, 2, 4 e 8 minutos enquanto respiravam ar seco com temperatura baixa ( $12,5 \pm 2,7^\circ\text{C}$ ) ou com temperatura ambiente ( $24,3 \pm 0,7^\circ\text{C}$ ). Os resultados do estudo mostraram que a remoção de água do trato respiratório inferior não pareceu ser a causa primordial da BIE, visto que a inspiração de ar frio e

seco provocou um maior estreitamento da via aérea quando comparado ao causado pela inalação de ar com temperatura ambiente e seco<sup>(47)</sup>.

O mecanismo primário responsável pelo estreitamento da via aérea induzido pelo exercício permanece incerto, porém muitas evidências indicam que o mastócito tem um papel importante na patogênese da BIE.

## **1.2 O MASTÓCITO**

Os mastócitos são células derivadas de células progenitoras hematopoiéticas CD34<sup>+</sup> pluripotenciais que se diferenciam e amadurecem nos tecidos periféricos, com exceção do pequeno número de mastócitos que residem na medula óssea. Normalmente, eles não são achados na circulação sanguínea<sup>(48, 49, 50)</sup>.

Em geral, os mastócitos aparecem como células redondas ou alongadas com núcleos não segmentados ou, ocasionalmente, bilobulares ou multilobulares com condensação moderada de cromatina nuclear. Os mastócitos contêm abundante quantidade de grânulos citoplasmáticos, bem como corpos lipídicos. Esses grânulos, por possuírem proteoglicanos ácidos, apresentam a propriedade típica de exibir metacromasia quando corados com corantes básicos<sup>(48, 49)</sup>.

Os mastócitos estão distribuídos por todos os tecidos conjuntivos normais, geralmente próximos aos vasos sanguíneos e linfáticos, ao lado ou

dentro dos nervos ou sob as superfícies epiteliais expostas ao ambiente externo, como os epitélios dos tratos gastrointestinal e respiratório e a pele. Tais células também são componentes normais da medula óssea e de tecidos linfóides, embora em pequena quantidade<sup>(48, 49)</sup>.

O conceito de heterogeneidade dos mastócitos está baseado em evidências obtidas em estudos com seres humanos e animais. Essas células podem ter aspectos fenotípicos muito variáveis, bem como variações marcadas em suas propriedades funcionais, histoquímicas e morfológicas. Estudos de mastócitos derivados do trato gastrointestinal de ratos mostraram que eles se dividiam em dois subtipos: mastócitos provenientes do tecido conjuntivo e mastócitos provenientes da mucosa. O primeiro subtipo citado apresenta as seguintes características: não é dependente de células T, possui grandes concentrações de histamina, tem a heparina como seu proteoglicano predominante e seu maior metabólito derivado do ácido aracdônico é a prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>). Já o segundo subtipo de mastócito citado é dependente de células T, possui pouca concentração de histamina, apresenta como seu proteoglicano principal o sulfato de condroitina e seu metabólito principal derivado do ácido aracdônico é o leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>)<sup>(48, 51)</sup>.

A extrapolação desses achados em ratos para outras espécies, especialmente para humanos, não é clara. Parece que há pelo menos dois tipos distintos de mastócitos no intestino e pulmão humano; entretanto, a diferenciação entre esses tipos de células é mais sutil e menos clara do que

a observada nos roedores. Além disso, as subpopulações de mastócitos não ficam confinadas a áreas anatômicas específicas<sup>(48, 52, 53)</sup>.

Os mastócitos humanos eram divididos em dois subtipos de acordo com a composição de suas proteases e a ultra-estrutura dos seus grânulos secretores. Os mastócitos presentes na mucosa intestinal e nos septos interalveolares dos pulmões contêm triptase com pouca ou nenhuma quimase, sendo designados como  $MC_t$ . Em contraste, a célula encontrada, em grande quantidade, na submucosa do intestino e na pele contém triptase e quimase, sendo chamada de  $MC_{tc}$ <sup>(54)</sup>. O primeiro subtipo parece assemelhar-se ao mastócito derivado da mucosa de ratos e o segundo subtipo é semelhante ao derivado do tecido conjuntivo dos roedores<sup>(51)</sup>.

Weidner e colaboradores, ao analisar a heterogeneidade dos mastócitos em relação à expressão de triptase, quimase e/ou carboxipeptidase, estudaram mastócitos provenientes de tecidos de múltiplos locais do organismo. Nesse estudo, um terceiro imunofenótipo de mastócito foi identificado: os  $MC_c$ , mastócitos que possuem quase que exclusivamente quimase. Verificaram, também, que 95% dos mastócitos encontrados na pele de mamas e nos linfonodos axilares eram do fenótipo  $MC_{tc}$ . Nos alvéolos pulmonares, 91% das células encontradas foram do tipo  $MC_t$ , 8% do tipo  $MC_{tc}$  e 1% do tipo  $MC_c$ . Na mucosa intestinal, a distribuição de mastócitos foi de 58% de  $MC_t$ , 35% de  $MC_{tc}$  e 7% de  $MC_c$ , enquanto que, na submucosa intestinal, 83% dos mastócitos identificados eram  $MC_{tc}$  e 17%

MC<sub>c</sub>, o que documenta, portanto, a diversidade dos mastócitos humanos dependente de sua localização<sup>(55)</sup>.

A observação histoquímica evidenciou também variações no conteúdo dos proteoglicanos das células: enquanto as células intestinais apresentam, predominantemente, sulfato de condroitina E, as células do pulmão possuem, além desse, heparina, a qual é encontrada, solitária, nas células da pele<sup>(54, 56)</sup>.

Nas espécies de mamíferos já analisadas, foi verificado que os mastócitos expressam em sua constituição receptores da membrana plasmática que se ligam especificamente e com grande afinidade à porção Fc do anticorpo imunoglobulina E (FceRI)<sup>(48, 49, 50)</sup>.

Além da imunoglobulina E (IgE) e de antígenos específicos, vários outros estímulos estão associados com a liberação de mediadores pelos mastócitos, como substâncias biológicas, agentes químicos e estímulos físicos. Sabe-se que o componente 48/80, o *calcium ionophore A-23187*, a concavalina A, a polimixina B, peptídeos (substância P), opiáceos endógenos (endorfinas), o ozônio, o bióxido sulfúrico, o frio, a alteração da osmolaridade e a concentração de íons hidrogênio (pH) podem provocar a degranulação dos mastócitos<sup>(48, 49, 57)</sup>.

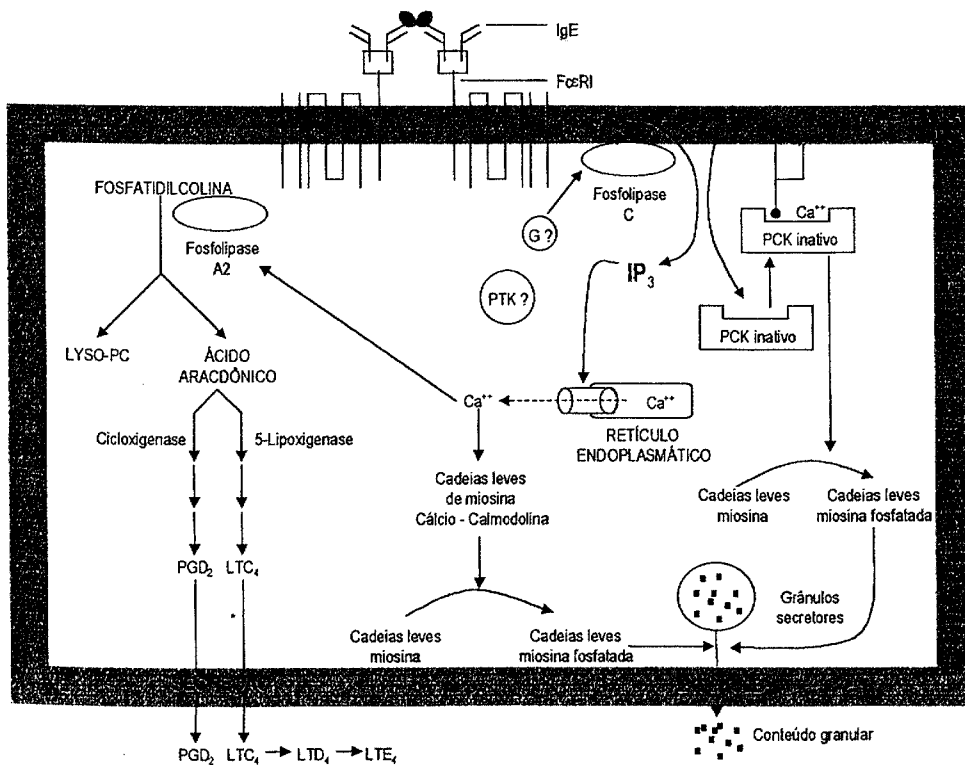
Ao serem ativados, os mastócitos promovem a exocitose dos grânulos pré-formados, a síntese de mediadores lipídicos derivados de precursores

armazenados nas membranas das células e, em alguns casos, nos corpos lipídicos e iniciam a transcrição, a translação e a secreção de citocinas<sup>(48)</sup>.

A ativação da fosfolipase C específica do fosfatidilinositol da membrana plasmática do mastócito catalisa a quebra do fosfatidilinositol bisfosfato em fosfatidilinositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). O DAG, através da ativação da proteinoquinase C, fosforila cadeias leves de miosina, provocando a quebra dos complexos actino-miosina existentes abaixo da membrana plasmática. Tal fenômeno leva à excitose dos grânulos pré-formados<sup>(48)</sup>.

O IP<sub>3</sub> liga-se a receptores específicos no retículo endoplasmático da célula, permitindo a entrada de cálcio com conseqüente elevação intracelular desse íon. O cálcio, ligado à calmodolina, ativa uma quinase de cadeias leves de miosina, provocando a excitose de mediadores por mecanismos já descritos. Além disso, tal íon ativa a fosfolipase A, que é a enzima envolvida na geração de mediadores lipídicos<sup>(48)</sup> (Figura 1).

A estimulação do mastócito também ativa a enzima adenilciclase através de GTP proteína heterotrimétrica. Tal fato provoca o aumento do AMP cíclico que ativa a proteinoquinase A. Essa proteína inibe a degranulação do mastócito, o que sugere a existência de uma via de retroalimentação negativa<sup>(48)</sup>.



**Figura 1: Eventos bioquímicos da ativação do mastócito**

Os mastócitos contêm ou elaboram, sob estímulo adequado, uma série de mediadores. Alguns desses são armazenados em estado pré-formado nos grânulos citoplasmáticos e outros são sintetizados depois de sua ativação.

Os mediadores pré-formados são as aminas biogênicas (histamina), proteoglicanos (heparina), proteases serínicas, carboxipeptidases A e quantidades pequenas de sulfatases e exoglicosidases. Os mediadores pós-formados incluem os leucotrienos, as prostaglandinas e as citocinas.

A histamina é produzida no mastócito pela descarboxilação da histidina<sup>(49, 57, 58)</sup>. O maior local de armazenamento da histamina nos tecidos é o mastócito. Os basófilos são a fonte de maior parte da histamina presente no sangue humano<sup>(49, 58)</sup>. Ela fica armazenada nos grânulos secretores junto com a heparina e algumas enzimas. A produção de histamina por essas células é lenta; uma vez liberada pelos mastócitos, pode levar semanas até que esse autácóide retorne ao normal<sup>(49, 58)</sup>. A histamina é liberada 5 minutos a partir da reação alérgica, descrevendo uma curva descendente em cerca de 30 minutos<sup>(59)</sup>.

A histamina liberada age ligando-se a receptores específicos em diferentes tecidos do organismo. Foram identificados três subtipos de receptores: H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub><sup>(48, 57, 59)</sup>.

Os receptores H<sub>1</sub> estão localizados nas células epiteliais da via aérea, em macrófagos e células alveolares. Esses receptores vão mediar a contração da musculatura lisa da via aérea, o extravasamento da microvasculatura brônquica e a vasodilatação brônquica<sup>(48, 57, 59)</sup>. Além disso, a presença da histamina nos receptores H<sub>1</sub> vai provocar o aumento de transporte de íons pelo epitélio da via aérea, o aumento da secreção de glicoproteínas e a estimulação do *clearance* de muco e pode aumentar a quimiotaxia de células como neutrófilos e eosinófilos<sup>(57)</sup>. A estimulação desses receptores ativa a fosfolipase C, com subsequente secreção de IP<sub>3</sub>, que irá aumentar a concentração de cálcio intracelular<sup>(59)</sup>.



Os receptores H<sub>2</sub> foram identificados no pulmão, mas sua localização precisa permanece desconhecida. Os efeitos da histamina mediados pelos receptores H<sub>2</sub> incluem: relaxamento da musculatura lisa do brônquio, aumento da permeabilidade vascular, aumento da secreção de muco glicoprotéico, aumento de AMP cíclico, que pode inibir a liberação de mediadores, e supressão do efeito quimiotático sobre os leucócitos<sup>(57, 58)</sup>.

Os receptores H<sub>3</sub> podem estar envolvidos na inibição de liberação de histamina pelos mastócitos e basófilos, por meio de um mecanismo de retroalimentação. Tais receptores podem inibir a neurotransmissão em gânglios parassimpáticos, assim como podem impedir a liberação de acetilcolina dos nervos colinérgicos pós-gangliônicos na via aérea de porcos e humanos. Os receptores H<sub>3</sub> também foram identificados em eosinófilos humanos, mas sua função é incerta<sup>(59)</sup>.

As proteases neutras são o principal componente protéico dos grânulos secretores dos mastócitos. Quantitativamente, a triptase, uma endopeptidase serínica, é a principal enzima armazenada nos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos humanos. Ela fica acondicionada em sua forma ativa, formando um complexo estável com a heparina<sup>(49, 60, 61)</sup>.

A triptase apresenta a sua liberação máxima entre 15 e 20 minutos após a degranulação do mastócito, declinando a seguir com meia-vida entre uma hora e meia e duas horas e meia<sup>(62, 63, 64)</sup>.

Quantidades desprezíveis de triptase foram detectadas nos basófilos de humanos<sup>(49)</sup>.

Como a triptase parece ser específica dos mastócitos humanos, a sua determinação é utilizada como marcador da atividade dos mastócitos<sup>(49,65,66)</sup>.

A quimase também é uma protease serínica armazenada em sua forma ativa nos grânulos de alguns mastócitos<sup>(49)</sup>. A função das proteases mastocitárias, *in vivo*, é pouco conhecida. Quando injetada intradermicamente em ovelhas, a triptase induz uma resposta cutânea imediata específica de hipersensibilidade. Quando inalada por animais, promove, por si só, broncoconstrição imediata, evidenciada pelo aumento de resistência ao fluxo aéreo pulmonar<sup>(66)</sup>.

O metabolismo oxidativo do ácido aracdônico pela enzima ciclooxigenase vai produzir as endoperoxidasas cíclicas PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub>, que, devido à ação de isomerases de prostaglandinas, vão produzir as prostaglandinas D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>).

A PGD<sub>2</sub> produz broncoconstrição da via aérea humana<sup>(67)</sup>, pela ação nos receptores TP<sub>1</sub><sup>(68)</sup>, bem como pela estimulação indireta pré-sináptica de nervos colinérgicos<sup>(69)</sup>. Pode aumentar a responsividade da via aérea à histamina e à metacolina inaladas por pacientes asmáticos<sup>(70)</sup>.

A  $\text{PGF}_2\alpha$  também possui potencial para causar broncoconstrição e aumento da responsividade brônquica após a inalação de alergênicos por humanos<sup>(71)</sup>.

O  $\text{TXA}_2$  é um potente broncoconstritor em humanos, além de ser implicado na patogênese da hiper-responsividade das vias aéreas de cães<sup>(72)</sup> e primatas<sup>(73)</sup>; na resposta cutânea tardia a alergênicos intradérmicos em humanos<sup>(74)</sup>, na resposta imediata à inalação de alergênicos em cães<sup>(75)</sup>, na resposta tardia à inalação de alergênicos em asmáticos<sup>(76)</sup> e na hiper-responsividade da via aérea em asmáticos<sup>(77)</sup>.

As prostaglandinas ditas inibitórias (a  $\text{PGE}_2$  e a  $\text{PGI}_2$ ) provocam relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas e antagonizam a resposta contrátil a agonistas broncoconstritores<sup>(78)</sup>.

Existem evidências de que essas prostaglandinas estariam envolvidas na taquifilaxia à histamina<sup>(79)</sup> e na refratariedade ao exercício<sup>(27, 30)</sup>.

Os leucotrienos  $\text{LTB}_4$ ,  $\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$  e  $\text{LTE}_4$  são moléculas derivadas da lipoxigenação do ácido aracdônico. Apesar de cada uma dessas moléculas ter um papel na patogênese da asma, o  $\text{LTC}_4$ , o  $\text{LTD}_4$  e o  $\text{LTE}_4$  apresentam uma implicação maior no início e na manutenção da resposta asmática<sup>(80)</sup>.

O ácido aracdônico catalisado pela 5-lipoxigenase, que por sua vez foi ativada por uma proteína específica (FLAP), produz o ácido 5-hidroperoxyeicosatetraenóico (5-HPETE) e o leucotrieno  $\text{A}_4$  ( $\text{LTA}_4$ ), consecutivamente. O  $\text{LTA}_4$ , sob a ação da  $\text{LTA}_4$ -hidrolase, irá produzir o

LTB<sub>4</sub>; já sob a ação do LTC<sub>4</sub>-sintetase, irá produzir o LTC<sub>4</sub>, o LTD<sub>4</sub> e o LTE<sub>4</sub><sup>(80)</sup>.

Os leucotrienos produzem importantes efeitos na resposta asmática, incluindo obstrução da via aérea, edema tecidual e produção de muco pelas glândulas da submucosa brônquica<sup>(80)</sup>. Um efeito proeminente dos leucotrienos é a sua capacidade de provocar estreitamento das vias aéreas em indivíduos normais<sup>(81, 82, 83, 84)</sup>. Essas moléculas vão promover uma broncoconstrição mais potente e prolongada que outros mediadores<sup>(83, 84, 85)</sup>.

As citocinas constituem um grupo heterogêneo de glicoproteínas sintetizadas e secretadas de modo típico por diversas células em resposta a ativação ou lesão. Essas glicoproteínas podem modular as respostas imunes específicas e a inflamação imunologicamente específica, em virtude de sua capacidade de alterar a função ou expressão de genes das células alvos sensíveis às suas ações<sup>(49)</sup>.

Os mastócitos representam uma fonte potencial de citocinas que podem influenciar a inflamação alérgica e cujas síntese e liberação podem ser induzidas por mecanismos dependentes de IgE. Alguns mastócitos de camundongos ativados contêm níveis aumentados de RNA mensageiro para as interleucinas (IL) 1 $\alpha$ , 3, 4, 5, 6, GM-CSF, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  e secretam substâncias com bioatividades correspondentes a elas (IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, GM-CSF e IL-13)<sup>(86, 87, 88)</sup>.

Os mastócitos humanos parecem constituir uma fonte potencial de muitas citocinas, como é o caso do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), do fator de crescimento fibroblástico básico e das IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-13<sup>(50, 89)</sup>. Essas citocinas, além de estarem estocadas nos grânulos dos mastócitos, são também geradas por mecanismos de transcrição<sup>(50)</sup>.

A produção dessas citocinas parece ser fundamental para as relações existentes entre a ativação dos mastócitos dependentes de IgE e a inflamação que se desenvolve durante as reações de fase tardia da asma<sup>(87)</sup>.

Efetivamente, o mastócito tem sido considerado a célula efetora primária da reação imediata de hipersensibilidade. A participação dessa célula na fisiopatogenia da AIE parece ser fundamental para a ocorrência desse fenômeno.

Mastócitos degranulados foram encontrados em tecidos de biópsias brônquicas, três horas após o exercício, em pacientes com BIE<sup>(90)</sup>. Análises morfométricas de fragmentos obtidos de biópsias brônquicas de cães também revelaram a presença de mastócitos degranulados durante e imediatamente após a hiperpnéia com ar seco nesses animais<sup>(91)</sup>.

Vários estudos baseados em dados farmacológicos indicaram de forma indireta a participação do mastócito e seus mediadores na patogênese da AIE<sup>(92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100)</sup>.

Em um grupo de pacientes com BIE, foi evidenciado um aumento significativo, após exercício, dos níveis de  $9\alpha,11\beta$ -PGF<sub>2</sub> urinário, um

metabólito da  $PGD_2$ , em adultos, demonstrando clara evidência de ativação do mastócito durante a AIE<sup>(101)</sup>.

Suzuki e Freed demonstraram que a broncoconstrição induzida por hiperventilação, em modelos caninos de AIE, aumentou significativamente a concentração de  $LTC_4-E_4$ ,  $PGD_2$ ,  $PGF_2$  e  $TXB_2$  no lavado broncoalveolar de cães quando comparada com a de lavado broncoalveolar de controles, o que reafirma a importância do mastócito na fisiopatogenia da BIE<sup>(102)</sup>.

As populações de mastócitos humanos contêm misturas variáveis de heparina (cerca de 60 Kd) e de proteoglicanos de sulfato de condroitina<sup>(48, 49)</sup>.

Os proteoglicanos exercem várias funções biológicas dentro e fora das células. Por meio de interações iônicas, ligam-se à histamina, às proteases e às carboxipeptidases, podendo contribuir para o armazenamento e acondicionamento dessas moléculas dentro dos grânulos secretores<sup>(48, 49, 60, 61)</sup>. Durante a degranulação dos mastócitos, além de poderem estar envolvidos na cinética de liberação dos mediadores das matrizes dos grânulos, podem também controlar a atividade de alguns dos mediadores associados<sup>(48, 49)</sup>.

O papel desses mediadores, liberados na degranulação do mastócito, na resposta alérgica da via aérea ainda é incerto.

### 1.3 HEPARINA

A descoberta da heparina está relacionada a Mc Lean, estudante de medicina que em 1916 descobriu um anticoagulante fosfolipídico. Posteriormente, em 1922, Howell descobriu a heparina, assim chamada por sua abundância no fígado<sup>(103)</sup>.

A heparina é um polissacarídeo linear complexo, com cerca de 60 a 100 mil dáltons, atado, de forma covalente, a um núcleo protéico, achado nos grânulos secretores dos mastócitos<sup>(103)</sup>.

Ela é sintetizada, a partir de precursores de açúcar UDP, em um polímero de resíduos de ácido D-glucorônico e N-acetil-D-glucosamina, alternando-se ao longo de sua estrutura<sup>(103, 104, 105)</sup>. Esse polímero sofre uma série de modificações: N-desacetilação e N-sulfatação dos resíduos de glucosamina, epimerização do ácido D-glucorônico em ácido L-idurônico, sulfatação dos resíduos dos ácidos idurônicos e glucorônicos na posição C<sub>2</sub> e sulfatação dos resíduos de glucosamina nas posições C<sub>3</sub> e C<sub>6</sub>. Cada uma dessas modificações origina uma grande variedade de estruturas de oligossacarídeos incompletos com a cadeia de glicosaminoglicano presente. O sulfato de heparina é sintetizado sempre a partir do mesmo precursor<sup>(103)</sup>.

A heparina é encontrada em todos os tecidos que possuem mastócitos.

A heparina não fracionada (HNF) é obtida da mucosa intestinal de porcos ou de pulmão de boi. Trata-se de fragmentos de uma mistura heterogênea de polissacarídeos sulfatados, com peso molecular variando em torno de 5 mil a 30 mil dáltons e com uma média de 50 unidades sacarídeas<sup>(103, 104, 105)</sup>.

As ações fisiológicas dessas moléculas não são completamente entendidas. Parece que a heparina estabiliza as proteases no interior dos mastócitos e modula a liberação de alguns mediadores por essa célula<sup>(48, 49, 60, 61, 103)</sup>. Ela é rapidamente ingerida e destruída pelos macrófagos após a sua liberação pelos mastócitos, não sendo detectada no plasma em circunstâncias normais<sup>(103, 106)</sup>.

A HNF apresenta uma seqüência de pentassacarídeos com alta afinidade para ligar-se com a antitrombina III (ATIII), uma proteína produzida pelo fígado. Essa interação com a ATIII altera a conformação dessa proteína, causando uma aceleração de sua habilidade em inativar fatores de coagulação ativos, como a trombina (fator II) e o fator X<sub>a</sub>, principalmente. Um terço das moléculas de heparina contém a seqüência pentassacarídea necessária para a ligação com a ATIII. Além de inibir os fatores da coagulação já citados, ela inativa outros fatores de coagulação da via intrínseca, como os fatores IX<sub>a</sub>, XI<sub>a</sub>, XII<sub>a</sub> e a calicreína<sup>(103, 104, 105)</sup>.

A heparina também catalisa a inativação da trombina por um segundo cofator plasmático, chamado cofator II da heparina, que é específico para a



trombina. Essa ação somente ocorre com doses muito altas dessa substância<sup>(104, 105)</sup>.

O efeito anticoagulante da heparina é medido por sua atividade anti-fator  $X_a$  e anti-fator  $II_a$ , sendo que a HNF apresenta uma razão de 1:1<sup>(107)</sup>.

Em vários estudos com a heparina, evidenciou-se que ela possui alguns efeitos não relacionados ao seu importante efeito anticoagulante.

A heparina age como um antagonista competitivo do  $IP_3$ , ligando-se a seus receptores específicos no retículo endoplasmático de várias células, inibindo, conseqüentemente, a liberação e o aumento de cálcio intracelular.

Tiras da artéria pulmonar principal de coelhos foram estudadas, com o objetivo de analisar o efeito da heparina na liberação de cálcio intracelular induzida pelo  $IP_3$  e pela cafeína na musculatura lisa desses animais. A heparina bloqueou a liberação de cálcio induzida pelo  $IP_3$ , mas não a induzida pela cafeína, de forma dose-dependente. Esse fato indicou que a heparina não afeta o conteúdo de cálcio do retículo sarcoplasmático e nem a permeabilidade do cálcio pela sua membrana, efeito atribuído à cafeína. Tais resultados, portanto, mostraram evidências significativas de que a heparina é um antagonista específico do  $IP_3$ <sup>(108)</sup>.

O mesmo efeito da heparina na liberação de cálcio estimulado pelo  $IP_3$ , a partir de microssomas de fígado de ratos, foi encontrado em um outro estudo. A heparina não afetou a liberação de cálcio estimulado pelo GTP, o

que mostra que, em fígados de ratos, o aumento de cálcio intracelular pode ocorrer por diferentes mecanismos<sup>(109)</sup>.

Estudando células permeabilizadas de musculatura lisa (DDT<sub>1</sub> MF-2) ou frações da membrana microsomal isoladas a partir de células intactas, foi observado que a ação inibitória da heparina na liberação de cálcio pelas células é feita através do canal IP<sub>3</sub>, de forma específica e potente. Nenhuma alteração nas outras vias de transporte de cálcio foi encontrada com o uso da heparina<sup>(110)</sup>.

Em 1990, Chilvers e colaboradores identificaram um sítio de ligação específico e de alta afinidade para o IP<sub>3</sub> na musculatura lisa da via aérea da traquéia bovina. A ligação era máxima em um pH de 7,75 e era desfeita pela heparina, não sendo afetada por alterações na concentração de cálcio<sup>(111)</sup>.

A heparina não é absorvida pelo trato gastrointestinal, devendo ser administrada de forma endovenosa ou subcutânea. No plasma, ela tem alta afinidade pelas proteínas plasmáticas, pelas células endoteliais e pelos macrófagos, apresentando uma biodisponibilidade baixa e uma resposta anticoagulante heterogênea e imprevisível. Essas características da heparina fazem com que o seu uso deva ser monitorizado através do tempo de tromboplastina parcial ativado (ATTP)<sup>(103, 104, 105, 107)</sup>.

A meia-vida da heparina depende da dose do fármaco utilizado. Quando se administram 100, 400 e 800 unidades por quilo de heparina

endovenosa, a meia-vida é, aproximadamente, de 1, 2 e 5 horas respectivamente<sup>(103, 105)</sup>.

A heparina é eliminada em duas fases, de modo dose-dependente: uma fase rápida, saturável, refletindo a captação hepática, e uma fase mais lenta, correspondendo à depuração renal. Ela apresenta a característica de não ultrapassar a barreira placentária<sup>(103, 104, 105)</sup>.

Recentemente, Bendstrup e colaboradores verificaram, em voluntários normais, a farmacocinética da heparina administrada por via inalatória. O objetivo do estudo era o de determinar a porcentagem de heparina radioativa depositada no trato respiratório inferior após uma dose única da droga, no caso, nebulização de 90 mil unidades da droga, e a sua distribuição nas vias aéreas periféricas, intermediárias e centrais e a cinética da heparina aerolisada. Os autores observaram que 8% da heparina nebulizada chegou ao trato respiratório inferior, correspondendo a 7 mil unidades. Quinze por cento da substância ficou nos filtros da boca, 32% ficou nos filtros de exalação e 53% permaneceu no nebulizador como volume morto. A heparina distribuiu-se de forma uniforme pelos pulmões e foi eliminada de forma lenta, visto que 39% da droga permanecia neles após 24 horas. Setecentas unidades de heparina-Tc<sup>99m</sup> foram absorvidas no sangue em um tempo máximo de 61 minutos após o início da inalação. Nenhum efeito anticoagulante foi detectado com uma dose única de heparina inalada<sup>(112)</sup>. Esses dados foram semelhantes aos de um estudo prévio dos autores, onde foi caracterizada a distribuição das partículas e a demanda de várias

fórmulas e concentrações de heparina nebulizadas por nebulizadores ultrassônicos e *jets*<sup>(113)</sup>.

Os efeitos adversos relacionados com o uso da heparina são hemorragias, trombocitopenia, lesões cutâneas, inclusive com necrose, reações de hipersensibilidade, alterações hepáticas, hipercalemia devido a hipoaldosteronismo, osteoporose e priapismo<sup>(103, 104, 105)</sup>.

As indicações clínicas da heparina estão basicamente relacionadas ao seu efeito anticoagulante; ela é efetiva na prevenção e tratamento da trombose venosa e embolia pulmonar, no tratamento da fase inicial de angina instável e infarto agudo do miocárdio, em pacientes que realizaram cirurgias cardíacas, em pacientes que colocaram *stents* coronarianos e em casos selecionados de coagulação intravascular disseminada<sup>(103, 104)</sup>.

As ações não anticoagulantes da heparina incluem interação com vários fatores de crescimento<sup>(114)</sup>, modulação da proliferação celular<sup>(115, 116, 117, 118)</sup>, regulação da angiogênese<sup>(119)</sup> e modulação de proteases e enzimas<sup>(61)</sup>. Ela também possui propriedades antiinflamatórias e antialérgicas<sup>(120, 121, 122)</sup>, regula a função de células inflamatórias<sup>(123, 124, 125)</sup>, possui atividade antiviral<sup>(126)</sup> e anticomplemento<sup>(127)</sup>, bem como atenua a BIE<sup>(128, 129, 130)</sup>.

#### 1.4 HEPARINAS DE BAIXO PESO MOLECULAR

As heparinas de baixo peso molecular (HBPM) foram desenvolvidas a partir da década de setenta, estimuladas por uma série de observações que demonstravam vantagens em relação à HNF<sup>(105, 131)</sup>.

Elas são derivadas da HNF pela despolimerização química ou enzimática ou por meio de técnicas de cromatografia, que provocam a dessulfatação da molécula, originando fragmentos que possuem aproximadamente um terço do tamanho da HNF<sup>(104, 132)</sup>.

Essas moléculas possuem um peso molecular que varia entre 4 mil e 6,5 mil dáltons, com uma média de 15 unidades sacarídeas<sup>(105, 107)</sup>.

Moléculas de heparina com menos de 18 unidades sacarídeas são menos hábeis em formar o complexo ternário (heparina ligada à ATIII e à trombina), necessário para inativar a trombina. Em consequência desse fenômeno, as HBPM apresentam uma razão anti-fator  $X_a$  e anti-fator  $II_a$  que varia de 2:1 até 4:1, pois mantêm sua atividade contra o fator  $X_a$ , com reduzida ação sobre o fator  $II_a$ <sup>(104, 105, 107)</sup>.

Muitas são as vantagens, já definidas, das HBPM em relação às HNF. Elas apresentam resposta anticoagulante mais previsível, não sendo necessário monitorizar a anticoagulação, devido a sua reduzida capacidade de inativar a trombina, e se ligam menos às proteínas plasmáticas e às

células endoteliais. A biodisponibilidade dessas moléculas é melhor com doses mais baixas, sendo maior que 90% após a aplicação subcutânea da droga. A depuração é dose-independente e sua meia-vida plasmática é mais longa. Isso decorre da menor ligação das HBPM às células endoteliais e macrófagos. É bem provável também que essas substâncias promovam menos sangramentos, bem como menor incidência de osteoporose e trombocitopenia<sup>(104, 105, 107)</sup>.

Elas são eliminadas por via renal e não ultrapassam a barreira placentária<sup>(104, 105, 107)</sup>.

As HBPM são indicadas para a profilaxia de trombose venosa profunda em cirurgia geral e ortopédica, em lesão aguda da medula espinhal e em politraumatismo, bem como para o tratamento da trombose venosa, angina instável e acidente vascular encefálico, entre outras indicações, embora a relativa pouca experiência com essa droga suscite algumas dúvidas em relação ao seu uso<sup>(104, 105, 131)</sup>.

Assim como a HNF, as HBPM possuem atividades antiinflamatórias. Evidências demonstram que, quanto menor o peso molecular da heparina, maior é sua ação antiinflamatória e menor é sua ação anticoagulante<sup>(133, 134)</sup>.

### 1.5 AÇÕES ANTIALÉRGICAS DA HEPARINAS

A heparina é um componente dos grânulos dos mastócitos cuja função, entre outras, é estabilizar as proteases. Embora o papel da heparina endógena ainda seja incerto, vários estudos foram feitos para verificar as ações antialérgicas das heparinas.

Ahmed e colaboradores, em 1992, para estudar o efeito da heparina inalatória na broncoconstrição induzida por estímulos imunológicos e não imunológicos, verificaram a resistência das vias aéreas de 15 ovelhas alérgicas a *Ascaris suum* (antígeno), antes e depois da provocação com um antígeno específico, com histamina, com carbacol e com o componente 48/80. Em dias diferentes, cada animal foi exposto a antígenos e agonistas inalatórios após ter sido pré-tratado com heparina inalatória em doses de 100, 300 e 1.000 unidades por quilo. Eles observaram que a heparina inalatória reduziu a broncoconstrição induzida pelo antígeno (BIA) de forma dose-dependente, bem como atenuou, marcadamente, a broncoconstrição induzida pelo componente 48/80 (agente não imunológico da degranulação do mastócito). Entretanto a heparina inalatória falhou em atenuar a broncoconstrição induzida pelo carbacol e pela histamina, o que sugere que essa droga poderia não ter efeito direto na musculatura lisa da via aérea. A heparina inalatória não modificou o tempo de tromboplastina parcial ativada. Quando administrados em doses equivalentes, a heparina N-sulfatada e o sulfato de dextran falharam em atenuar a BIA, sugerindo que a atividade

antialérgica da heparina não estaria relacionada a sua estrutura mucopolissacarídea. Os autores concluíram que a heparina inalatória preveniu a broncoconstrição induzida por estímulos imunológicos e não imunológicos que provocam a degranulação do mastócito, sem inibir a contração da musculatura lisa da via aérea<sup>(135)</sup>.

Acreditando que a heparina age como um antagonista competitivo do  $IP_3$ , mensageiro secundário envolvido na degranulação do mastócito, um outro estudo procurou determinar o efeito da heparina em reações mediadas pelos mastócitos: a reação cutânea imediata e a broncoconstrição induzidas por antígeno, pela histamina e pelo composto 48/80 em 23 ovelhas. Os autores estudaram, também, o efeito dessa droga, *in vitro*, na liberação de histamina por mastócitos isolados de úteros humanos. Verificaram que a heparina inibiu a resposta cutânea imediata bem como a broncoconstrição induzida por antígeno e pelo componente 48/80 de forma dose-dependente, não alterando a resposta cutânea e a broncoconstrição induzida pela histamina. Nos mastócitos uterinos pré-tratados com heparina, houve uma inibição da liberação de histamina induzida pela IgE, fato que não ocorreu quando se utilizou o *calcium ionophore* (A23187). Tais resultados sugerem que a ação da heparina estaria relacionada à modulação dos mediadores liberados pelos mastócitos, sem inibir, portanto, receptores nos órgãos alvos terminais<sup>(136)</sup>.

Bowler e colaboradores, procurando compreender o papel da heparina na hipersensibilidade imediata, investigaram o efeito do pré-



tratamento com heparina, administrada de forma inalatória e endovenosa, na resposta cutânea e pulmonar a alergênicos e à histamina em 10 pacientes alérgicos. Os autores demonstraram que uma dose de 25 unidades por quilo de heparina, administrada de forma endovenosa 10 minutos antes da provocação, reduziu a resposta cutânea a alergênicos e à histamina. Em 15 pacientes asmáticos, a heparina inalatória (20 mil unidades) inibiu o broncoespasmo induzido por antígeno. Não houve alteração do ATTP após 36 horas da inalação de heparina. Esses dados sugerem que a heparina pode ter um papel importante nas reações mediadas pelos mastócitos<sup>(137)</sup>.

Para avaliar a ação da heparina na broncoconstrição induzida por hiperventilação (BIH) e determinar se seu mecanismo de ação envolve a inibição da produção e liberação de mediadores, Suzuki e colaboradores mediram a resistência das vias aéreas antes e após provocação com ar seco, com e sem pré-tratamento com heparina inalatória em cães. Foi avaliado também o efeito da heparina na liberação de mediadores no lavado broncoalveolar. Eles verificaram que a substância reduziu significativamente a BIH, bem como inibiu a produção e a liberação de mediadores causadas pela provocação ( $LTC_4 - E_4$ ,  $PGD_2$ ,  $PGF_2$  e  $TXB_2$ ), o que sugere que a heparina inibe a degranulação do mastócito<sup>(102)</sup>.

Em 1993, Ahmed e colaboradores estudaram a farmacodinâmica da heparina. A resistência específica da via aérea de oito ovelhas alérgicas a *Ascaris suum* foi medida antes e 5 minutos após a inalação desse antígeno. Em dias diferentes, a provocação com o antígeno foi repetida após pré-

tratamento com heparina inalatória (1.000 UI/Kg) administrada 20 minutos, 6, 12 e 24 horas antes do teste. O mesmo foi feito com o pré-tratamento com heparina endovenosa administrada 20 minutos, 1, 6 e 12 horas antes da provocação com o antígeno. A farmacodinâmica da heparina na resposta cutânea imediata à provocação com antígeno também foi avaliada, bem como a degranulação do mastócito e a liberação de histamina por essa célula, *in vitro*. Os autores observaram que a heparina administrada de forma inalatória e endovenosa atenuou a BIA de forma tempo-dependente, ou seja, prolongando-se o tempo entre o pré-tratamento e a provocação com o antígeno, diminui o efeito inibitório da heparina inalatória. Em contraste, o aumento do tempo entre o pré-tratamento e a provocação com antígeno aumentou os efeitos inibitórios da heparina endovenosa na BIA. Além disso, a heparina endovenosa atenuou a resposta cutânea imediata ao antígeno de maneira tempo-dependente, bem como inibiu a degranulação do mastócito e a liberação de histamina por este. A heparina inalada não alterou o ATTP, o mesmo não ocorrendo quando ela foi administrada por via endovenosa. Os autores concluíram que os efeitos antialérgicos da heparina são tempo-dependentes e que a via de administração da droga influencia nesse aspecto<sup>(138)</sup>.

Em um estudo, *in vitro*, com tiras da musculatura lisa traqueal de ovelhas tratadas com heparina e nedocromil sódico, os autores evidenciaram que a heparina bloqueava a contração da musculatura lisa induzida pelo *Ascaris suum* sem afetar a resposta contrátil à acetilcolina, um

agonista direto da musculatura lisa. Esse efeito foi semelhante ao do nedocromil sódico, sugerindo, novamente, uma ação relacionada com a liberação de mediadores pelos mastócitos<sup>(139)</sup>.

Vários estudos testaram a ação da heparina na hiper-responsividade da via aérea (HRVA).

Ahmed e colaboradores avaliaram, os efeitos da heparina na HRVA induzida por um antígeno específico e pelo fator de ativação plaquetária, um mediador pró-inflamatório que induz HRVA sem causar degranulação do mastócito, em 17 ovelhas. No estudo, *in vitro*, foi estimada também a degranulação de mastócitos derivados de peritônio de ratos, mediada pelo  $IP_3$ , pelo *calcium ionophore* (A-23187) e pela IgE. Os autores observaram que o pré-tratamento com heparina inalatória preveniu a BIA e a HRVA pós-antígeno. A heparina administrada imediatamente após a provocação com antígeno falhou em modificar a magnitude e a duração da BIA e da HRVA induzida por antígeno, bem como em alterar a resistência da via aérea e a HRVA induzida pelo fator de ativação plaquetária. A heparina, de forma dose-dependente, inibiu a degranulação dos mastócitos mediada pelo  $IP_3$  e pela IgE, sem atenuar os efeitos do *calcium ionophore*. Concluíram que as ações da heparina, possivelmente, ocorram por inibição do canal  $IP_3$  e não por suas ações antiinflamatórias<sup>(140)</sup>.

A ação da heparina inalatória na hiper-responsividade brônquica induzida pela metacolina foi avaliada em 13 pacientes com asma leve. Os autores realizaram um estudo randomizado, cego e cruzado onde um teste

de broncoprovocação com metacolina era feito 45 minutos após a inalação de placebo ou heparina. Demonstrou-se que a heparina inalatória provocou um aumento na DP<sub>20</sub> da metacolina de  $5,26 \pm 4,8$  mg/ml para  $10,57 \pm 5,72$  mg/ml ( $p < 0,0002$ ). Concluíram que a heparina pode ter um papel inibitório na broncoprovocação com metacolina, possivelmente por ação direta na musculatura lisa da via aérea, embora essa ação seja pouco entendida<sup>(141)</sup>.

Em um estudo duplo cego, randomizado e cruzado foram estudados oito pacientes com asma leve, para verificar o efeito de doses múltiplas de heparina inalatória na resposta asmática imediata e tardia a alergênicos. Durante o estudo, um teste de broncoprovocação com histamina foi realizado 24 horas antes e depois da provocação com alergênio. Cinco doses de heparina não fracionada (1.000 UI/Kg) ou placebo foram inaladas 90 e 30 minutos antes da provocação com alergênio e 2, 4 e 6 horas após a provocação. Foi verificado, pelos autores, que a heparina atenuou, embora sem significância, a resposta imediata ao alergênio e reduziu significativamente a resposta tardia. O mecanismo para explicar esse fenômeno não é conhecido<sup>(142)</sup>.

Um outro mecanismo de ação da heparina na reatividade brônquica foi proposto em estudo realizado por Pavord e colaboradores. Os autores testaram a hipótese de que a heparina inalatória poderia inibir a broncoconstrição induzida por neurotransmissão colinérgica. Realizaram um estudo duplo cego e randomizado com 11 pacientes com asma leve. Após pré-tratamento com heparina inalada (1.000 UI/Kg) ou placebo, esses

pacientes realizavam uma broncoprovocação com metabissulfito de sódio. Nove pacientes realizaram, também, uma broncoprovocação com metacolina. Eles observaram que a heparina não causou alteração na coagulação sanguínea e no VEF<sub>1</sub> e não apresentou efeito na resposta broncoconstritora ao metabissulfito de sódio e à metacolina, ou seja, a ação inibitória da heparina inalatória não ocorreu por vias neurais ou por ação na musculatura lisa da via aérea<sup>(143)</sup>.

Durante a realização dos estudos que avaliaram as atividades não anticoagulantes da heparina, foi observado que a heparina inalatória não alterava o ATTP. Foi levantada, então, a hipótese de que as atividades antialérgicas dessa droga estariam relacionadas às suas propriedades não anticoagulantes e ao seu peso molecular.

Em 1998, Martinez-Salas e colaboradores estudaram o efeito de heparinas com pesos moleculares diferentes (PM médio, PM baixo e PM ultrabaixo) na broncoconstrição induzida por antígeno e na HRVA de ovelhas alérgicas. A resistência da via aérea foi medida em 22 ovelhas antes e depois da provocação com antígeno, com e sem tratamento com as heparinas fracionadas. A responsividade da via aérea foi estimada antes e 2 horas após a provocação com antígeno. Os resultados obtidos sugeriram que as HBPM atenuam a BIA e a HRVA e que existe uma relação inversa entre a atividade antialérgica das heparinas fracionadas e o peso molecular. A heparina com peso molecular ultrabaixo foi mais efetiva na prevenção da BIA e da HRVA<sup>(144)</sup>.

---

Em outro estudo com ovelhas alérgicas, os autores analisaram os efeitos de uma fração não anticoagulante da heparina (LA-heparina) na BIA, na HRVA; e na degranulação do mastócito. Tais efeitos foram comparados aos resultados obtidos com uma HBPM. Verificaram que o pré-tratamento com a LA-heparina atenuou a BIA de forma dose-dependente, porém falhou em atenuar a HRVA, já o pré-tratamento com a HBPM atenuou tanto a BIA quanto a HRVA de forma dose-dependente. Ambas inibiram a degranulação do mastócito, porém a LA-heparina foi quatro vezes mais potente. Os autores concluíram que frações não anticoagulantes da heparina mediam a atividade antialérgica das heparinas e, que, provavelmente, esse fenômeno relaciona-se à prevenção de degranulação dos mastócitos<sup>(134)</sup>.

A partir desses resultados, Molinari e colaboradores estudaram os efeitos de uma heparina não fracionada e de três heparinas fracionadas (heparinas de médio, baixo e ultrabaixo peso molecular) na HRVA induzida por antígeno, quando administradas após a provocação com antígeno, em 20 ovelhas alérgicas. Além disso, verificaram a liberação de histamina no lavado broncoalveolar dessas ovelhas com e sem o pré-tratamento com heparina. Observaram que as heparinas não fracionadas de médio e baixo peso molecular falharam em modificar a HRVA ao antígeno, enquanto que a heparina de ultrabaixo peso molecular inibiu a HRVA de forma dose-dependente. A heparina não fracionada e as de baixo peso molecular inibiram a liberação de histamina no líquido do lavado broncoalveolar, o mesmo não ocorrendo com a heparina de ultrabaixo peso molecular.

---

Concluíram que a modificação da HRVA induzida por antígeno é peso molecular dependente. Além disso, por meio de um mecanismo não dependente dos mastócitos e desconhecido, a heparina de ultrabaixo peso molecular mostrou-se capaz de atenuar a HRVA quando administrada após a provocação por antígeno<sup>(133)</sup>.

Campo e colaboradores estudaram comparativamente os efeitos de uma fração não anticoagulante da heparina, com três pesos moleculares distintos (alto, médio e ultrabaixo peso molecular), na BIA, na HRVA e na liberação de histamina no lavado broncoalveolar de 23 ovelhas. Observaram que essa fração não anticoagulante da heparina atenuou a BIA e a HRVA de forma peso molecular dependente, mas falhou em inibir o aumento da histamina no lavado broncoalveolar causado pela provocação antigênica. Tais dados indicaram que a atividade antialérgica da heparina inalatória seria independente da sua ação anticoagulante e residiria em  $<2.500$  ULMW chains. A atividade antialérgica dessas frações de heparina é mediada por mecanismos desconhecidos<sup>(145)</sup>.

O papel da heparina inalatória também foi estudada na BIE.

Ahmed e colaboradores compararam o efeito da heparina inalatória na AIE com o do cromoglicato de sódio. Uma dose única de 1.000 UI/Kg de heparina ou 20 mg de cromoglicato foram administrados, por via inalatória, 45 minutos antes da realização de um teste de exercício em esteira ergométrica, em 12 pacientes com história de AIE. A queda máxima da condutância específica da via aérea foi de 9%, 22% e 35%, respectivamente,

---

com o pré-tratamento com heparina, cromoglicato de sódio e placebo. Ambas as substâncias apresentaram efeitos significativamente diferentes em relação ao placebo, sendo que a heparina foi significativamente superior ao cromoglicato de sódio. Cinco pacientes realizaram um teste de broncoprovocação com histamina após pré-tratamento com heparina ou placebo. A heparina não afetou a broncoconstrição induzida pela histamina. Os autores concluíram que a heparina preveniu a BIE sem interferir na broncoconstrição induzida pela histamina, o que sugere que a ação da heparina poderia estar relacionada com a prevenção da liberação de mediadores ao invés de agir diretamente na musculatura lisa do brônquio, inibindo o canal  $IP_3$ <sup>(128)</sup>.

Em 1996, o mesmo grupo de pesquisadores investigou a farmacocinética da heparina inalatória em pacientes com AIE e comparou o efeito dessa droga com o do cromoglicato de sódio. Nove pacientes com AIE realizaram teste de exercício após 15 minutos, 1, 3 e 6 horas do pré-tratamento com heparina, cromoglicato ou placebo inalados. A heparina inibiu a broncoconstrição induzida pelo exercício em 58%, 78% e 67% quando inalada 15 minutos, 1 e 3 horas antes do exercício, respectivamente. O cromoglicato de sódio inibiu em 37%, 46% e 41% a BIE, respectivamente. Ambas foram inefetivas quando administradas 6 horas antes do exercício. Os autores concluíram, portanto, que a heparina inalatória preveniu a AIE por até 3 horas, sendo mais efetiva que o cromoglicato<sup>(129)</sup>.



---

Foi estudado, também, o efeito da enoxaparina na AIE. Treze pacientes asmáticos realizaram um teste de exercício após 45 minutos da inalação de heparina não fracionada, enoxaparina (0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg e 2,0 mg/kg) ou placebo. Foi realizada, também, uma broncoprovocação com metacolina após 45 minutos da inalação de enoxaparina (2 mg/kg) ou placebo. Os autores verificaram que pré-tratamento com heparina não fracionada preveniu a BIE em 31%, enquanto que a enoxaparina preveniu o broncoespasmo, de forma dose-dependente, em 28%, 38% e 48% quando foram administradas 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg ou 2,0 mg/kg da substância, respectivamente. A enoxaparina não apresentou efeito na broncoconstrição induzida pela metacolina e não alterou a atividade plasmática do anti-fator X<sub>a</sub>. Esses dados demonstraram que a droga preveniu a BIE de maneira dose-dependente, provavelmente por uma ação independente de seus efeitos anticoagulantes<sup>(130)</sup>.

Em vista desses dados, acredita-se que o estudo das heparinas, por via inalatória, na prevenção do BIE traria informações importantes a respeito da fisiopatogenia da AIE, podendo servir de estímulo para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da doença.

**2 OBJETIVOS**

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

Estudar os mecanismos envolvidos na broncoconstrição induzida pelo exercício.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- Verificar o efeito protetor da heparina de baixo peso molecular no broncoespasmo induzido pelo exercício.
- Comparar o efeito protetor da heparina de baixo peso molecular ao da heparina não fracionada na broncoconstrição induzida pelo exercício.
- Verificar o tempo de ação das heparinas na inibição do broncoespasmo induzido pelo exercício.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 DELINEAMENTO**

Estudo cruzado, duplo cego, onde o paciente foi seu próprio controle.

### **3.2 SELEÇÃO DE PACIENTES**

Foram avaliados pacientes voluntários provenientes do ambulatório de pneumologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Os pacientes assinaram um termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética do hospital (Anexo A).

---

### 3.2.1 Critérios de inclusão

Foram avaliados pacientes assintomáticos, não tabagistas, com história de asma induzida pelo exercício.

### 3.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com história de infecção recente do trato respiratório (últimos três meses), doença cardiológica, hepática e distúrbio de coagulação, bem como aqueles em uso de medicação preventiva para asma.

## 3.3 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO PULMONAR

A função pulmonar foi avaliada através da curva fluxo volume (espirômetro computadorizado Erich Jaeger) com a medida do volume expiratório forçado ao final do primeiro segundo ( $VEF_1$ ). A tabela dos valores previstos utilizada pelo aparelho é a de Zepletal, para crianças, e a da *European Community Committee Spirometry* (ECCS), para adultos.

### 3.4 TESTE DE ESFORÇO

O teste de esforço foi realizado numa esteira ergométrica com monitorização eletrocardiográfica. Antes do início do exercício, o paciente permanecia em repouso por 30 minutos. Iniciava-se o exercício com uma velocidade de 1,7 milhas/hora e inclinação de 10%. O esforço era aumentado gradativamente, através da elevação da inclinação e/ou velocidade da esteira, até o paciente atingir 85% da sua frequência máxima prevista. Ao atingir a frequência submáxima, o paciente permanecia em exercício por 10 minutos. A frequência máxima era calculada subtraindo-se 220 da idade do paciente. Durante o exercício, o paciente usava um clipe nasal. Imediatamente após o teste de esforço, o paciente realizava uma curva fluxo volume, repetindo-se o procedimento a cada 5 minutos, até completar 30 minutos ou até o paciente retornar aos seus valores basais<sup>(12)</sup>.

A fórmula utilizada para calcular a porcentagem de queda do VEF<sub>1</sub> pós-exercício foi:  $(\text{VEF}_1 \text{ basal} - \text{VEF}_1 \text{ pós-exercício}) / \text{VEF}_1 \text{ basal} \times 100$ .

A fórmula utilizada para calcular a porcentagem de proteção das heparinas foi:  $(\% \text{ de queda do VEF}_1 \text{ basal} - \% \text{ de queda do VEF}_1 \text{ com a droga}) / \% \text{ de queda do VEF}_1 \text{ basal} \times 100^{(100)}$ .

---

### 3.5 AGENTES

Os agentes utilizados no estudo foram heparina de baixo peso molecular (enoxaparina, peso molecular de 4.500 dáltons), heparina não fracionada derivada da mucosa de suínos e soro fisiológico a 0,9% (placebo). Os dois primeiros agentes eram diluídos com soro fisiológico para formar uma soluoo com volume final de 4 ml.

### 3.6 AEROLIZAO

As soluoes de enoxaparina e placebo foram administradas através de um nebulizador de ar comprimido (White Martins - fluxometro AR) durante 20 minutos. O diâmetro aerodinâmico médio das gotículas liberadas pelo nebulizador foi estimado em 4,5  $\mu\text{m}$ .

### 3.7 PROTOCOLO

Todos os testes foram realizados no laboratório de funoo pulmonar do Hospital São Lucas da PUCRS, onde a temperatura e a umidade ambiente permanecem constantes (22 graus centígrados e umidade relativa do ar menor de 50%). Os pacientes deveriam suspender o uso de B<sub>2</sub>-



---

agonista 24 horas antes de cada teste de exercício. O estudo foi dividido em 8 dias, com intervalo de no mínimo 7 dias entre eles.

- **Dia 1:** realização de espirometria, seguida de teste de esforço, com objetivo de documentar a magnitude do broncoespasmo induzido pelo exercício. Todos os pacientes que apresentaram uma queda do VEF<sub>1</sub> maior ou igual a 15% prosseguiram no estudo.

- **Dia 2:** realização da espirometria seguida da inalação de placebo. Após **1 hora** da inalação do soro fisiológico, era realizada nova espirometria, seguida do teste de esforço e subseqüentes medidas do VEF<sub>1</sub> a cada 5 minutos.

- **Dia 3 :** realização da espirometria, seguida da inalação de 1 mg/Kg de enoxaparina. Era realizada nova espirometria **1 hora** após a inalação da droga, seguida do teste de esforço e subseqüentes medidas do VEF<sub>1</sub> a cada 5 minutos.

- **Dia 4:** realização da espirometria, seguida da inalação de 1 mg/Kg de enoxaparina. Era realizada nova espirometria **3 horas** após a inalação da droga, seguida do teste de esforço e subseqüentes medidas do VEF<sub>1</sub> a cada 5 minutos.

- **Dia 5:** realização da espirometria, seguida da inalação de 1 mg/Kg de enoxaparina. Era realizada nova espirometria **6 horas** após a inalação da droga, seguida do teste de esforço e subseqüentes medidas do VEF<sub>1</sub> a cada 5 minutos.

---

- **Dia 6:** realização de espirometria, seguida da inalação de 1.000 UI de heparina/Kg (dose máxima=80.000 UI). Após **1 hora** da inalação da droga, era realizada nova espirometria, seguida do teste de esforço e subseqüentes medidas dos volumes pulmonares a cada 5 minutos.

- **Dia 7:** realização de espirometria, seguida da inalação de 1.000 UI de heparina/Kg (dose máxima=80.000 UI). Após **3 horas** da inalação da droga, era realizada nova espirometria, seguida do teste de esforço e subseqüentes medidas dos volumes pulmonares a cada 5 minutos.

- **Dia 8:** realização de espirometria, seguida da inalação de 1.000 UI de heparina/Kg (dose máxima=80.000 UI). Após **6 horas** da inalação da droga, era realizada nova espirometria, seguida do teste de esforço e subseqüentes medidas dos volumes pulmonares a cada 5 minutos.

Amostras de sangue venoso foram coletadas pré e pós-exercício (aos 5 minutos após o esforço), com pré-tratamento com placebo, enoxaparina e HNF, para posterior dosagem de mediadores inflamatórios.

### **3.8 DOSAGEM DE HISTAMINA, LEUCOTRIENOS E INTERLEUCINAS**

As amostras de sangue foram centrifugadas a 6.000 rpm, por 5 minutos, e o plasma foi armazenado a -20° Celsius para posterior utilização.

---

A quantificação de histamina foi feita por radioimunoensaio na Central de Radioimunoensaio de São Paulo (CRIESP).

A quantificação dos leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub> foi realizada pelo método de ensaio imunoenzimático com o *kit* comercial *Amersham Pharmacia Biotech*, catálogo RPN 224, seguindo-se as recomendações do fabricante. O limite mínimo de detecção é de 0,015 pm/ $\mu$ l.

A quantificação das interleucinas IL-2, IL-4, IFN- $\delta$  foi realizada pelo método de EIISA com os *kits* comerciais *OptEIA human (Pharmigen)*, catálogos 2627KI, 2629KI e 2613KI, respectivamente, seguindo-se as orientações do fabricante. Os limites mínimos de detecção foram de 7,8 pg/ml, 7,8 pg/ml e 4,7 pg/ml, respectivamente.

Os leucotrienos e as interleucinas foram quantificados no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com a finalidade de comparar as várias mensurações do VEF<sub>1</sub> basal de um indivíduo, em diferentes dias do estudo, utilizou-se a análise de variância de medidas repetidas (ANOVA).

---

Para identificar diferenças entre os VEF<sub>1</sub> basais registrados antes e após as medicações no mesmo indivíduo, aplicou-se o teste t de Student para amostras pareadas. Procedimento idêntico foi aplicado para verificar prováveis diferenças nas quedas do VEF<sub>1</sub>, nos diferentes tempos pós-exercício, nos oito dias do estudo e nas concentrações de histamina sangüínea nos dias de pré-tratamento com HNF e HBPM. O teste t de Student para amostras não pareadas foi utilizado para a análise das diferenças de concentração da histamina nos dias de pré-tratamento com placebo.

Com o propósito de comparar o efeito protetor das HNF e das HBPM, expressos em porcentagem, aplicou-se o teste de Wilcoxon.

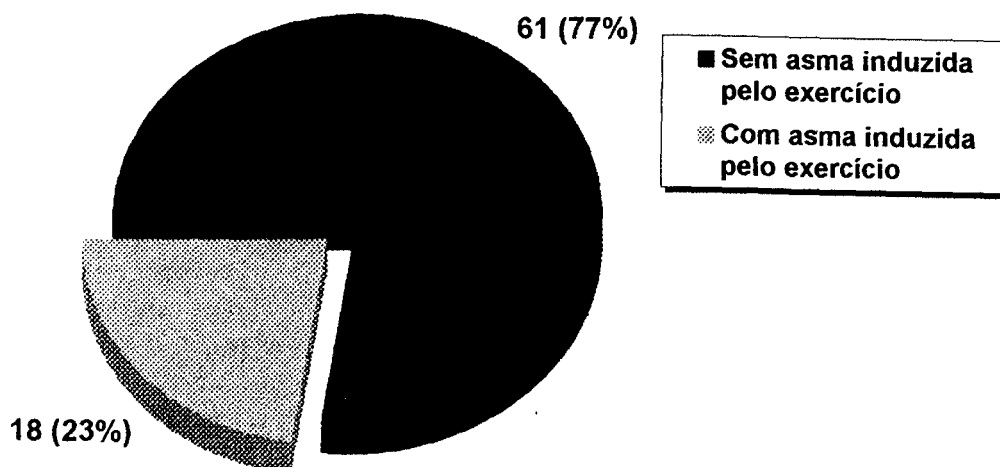
Para as tomadas de decisões dos procedimentos acima, adotou-se um erro do tipo I ( $\alpha$  ou nível de significância) igual a 0,05 ou 5 %.

O software usado foi o Minitab, versão 12 para Windows, de fevereiro de 1998.

## **4 RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

Foram realizados 79 testes de exercício para diagnóstico de AIE no laboratório de função pulmonar do Hospital São Lucas da PUCRS, no período de março de 1996 a junho de 2000. Dezoito desses testes foram positivos (23%) e 61 foram negativos (77%) (Figura 2).



**Figura 2: Testes de exercício realizados de março de 1996 a junho de 2000**

Nove pacientes prosseguiram no protocolo. Os demais foram excluídos devido aos seguintes motivos: taquiarritmia ventricular durante o

exercício (1), necessidade de medicação preventiva para asma com corticóide inalatório (3) e recusa a prosseguir no estudo (5).

Foram estudados 5 homens e 4 mulheres com média de idade de 23 anos, com um desvio padrão de 9,33. A Tabela 1 mostra as características da amostra estudada.

**Tabela 1 - Características da população estudada**

Paciente	Sexo	Idade (anos)
1	F	27
2	M	38
3	M	17
4	M	21
5	F	22
6	M	37
7	F	14
8	F	12
9	M	19
<b>Média ± DP</b>		<b>23 ± 9,33</b>

F = feminino; M = masculino.

Todos os pacientes apresentavam VEF<sub>1</sub> e CVF basais acima de 80% no primeiro dia do estudo, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 - VEF<sub>1</sub>, CVF e VEF<sub>1</sub>/CVF basais na triagem

Paciente	CVF	% CVF	VEF <sub>1</sub>	% VEF <sub>1</sub>	VEF <sub>1</sub> /CVF
1	4,60	135	3,56	120	77,30
2	4,72	105	3,96	100	83,80
3	5,40	106	4,28	100	79,20
4	5,40	100	4,16	82	77,03
5	3,68	95	2,88	85	78,20
6	4,96	110	3,20	85	64,50
7	3,80	107	3,24	108	85,20
8	2,84	93	2,28	89	80,00
9	6,04	112	5,24	113	86,75
<b>Média ± DP</b>	<b>4,60 ± 1,0</b>	<b>107 ± 12,3</b>	<b>3,64 ± 0,87</b>	<b>98 ± 13,66</b>	<b>79,1 ± 6,77</b>

CVF = capacidade vital forçada; VEF<sub>1</sub> = volume expiratório forçado no primeiro segundo; VEF<sub>1</sub> / CVF = razão entre volume expiratório forçado no primeiro segundo e capacidade vital forçada; %CVF = porcentagem sobre o previsto da capacidade vital forçada; %VEF<sub>1</sub> = porcentagem sobre o previsto do volume expiratório forçado no primeiro segundo.

Analisados pela ANOVA, os resultados das medidas de VEF<sub>1</sub> basal na amostra, nos diferentes dias do estudo, revelaram um valor estatístico de  $F=0,15$ , que está associado a um valor probabilístico (prob-value) igual a 0,988; portanto, os VEF<sub>1</sub> basais nos oito dias de estudo foram semelhantes entre si (Tabela 3).



Tabela 3 - VEF<sub>1</sub> basais nos diferentes dias do estudo\*

Paciente	Triagem	Placebo	HNF			HBPM		
			1h	3h	6h	1h	3h	6h
1	3,56	3,64	3,68	3,52	3,40	3,04	3,16	3,48
2	3,96	4,04	4,12	4,40	4,12	3,96	4,16	4,16
3	4,28	4,08	4,08	4,44	4,24	3,88	4,04	4,44
4	4,16	4,96	5,00	4,76	4,68	4,92	5,00	4,96
5	2,88	3,16	3,16	2,88	3,24	3,04	3,04	2,92
6	3,20	3,20	3,48	2,96	3,32	3,40	3,36	3,04
7	3,24	3,52	3,48	3,72	3,44	2,96	3,36	3,48
8	2,28	2,36	2,88	2,60	2,32	2,48	2,76	3,20
9	5,24	5,20	5,40	5,24	4,72	4,88	4,72	4,88
Média ± DP	3,64±0,87	3,80±0,89	3,92±0,83	3,84±0,92	3,72±0,78	3,62±0,86	3,73±0,78	3,84±0,79

HNF 1, 3, 6h = heparina não fracionada administrada 1, 3 e 6h antes do exercício; HBPM 1, 3, 6h = heparina de baixo peso molecular administrada 1, 3 e 6h antes do exercício.

As sete possíveis comparações entre o VEF<sub>1</sub> pré e pós-tratamento com placebo, heparina não fracionada e heparina de baixo peso molecular, por via inalatória, nos diferentes intervalos de pré-tratamentos estão demonstrados na Tabela 4.

**Tabela 4 - Efeito do pré-tratamento com Placebo, HNF e HBPM no VEF<sub>1</sub> nos diferentes intervalos de tratamento**

Tratamento	Intervalos	Pré-Tratamento	Pós-Tratamento	P
<b>Placebo</b>				
	1h	3,80±0,89	3,67±0,78	0,14
	3h	-	-	-
	6h	-	-	-
<b>HNF</b>				
	1h	3,92±0,89	3,90±0,80	0,68
	3h	3,84±0,92	4,11±0,95	0,06
	6h	3,72±0,78	3,87±0,73	0,20
<b>HBPM</b>				
	1h	3,62±0,86	3,64±0,85	0,39
	3h	3,73±0,78	3,85±0,85	0,16
	6h	3,84±0,79	3,82±0,75	0,69

Valores são apresentados como média ± desvio-padrão.

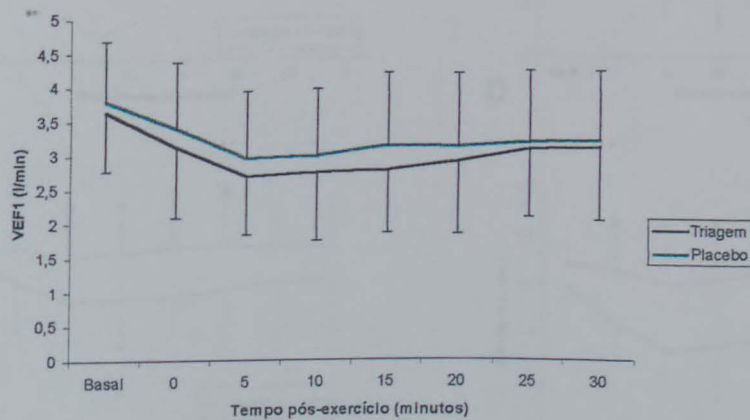
As combinações entre as porcentagens de queda do VEF<sub>1</sub> pós-exercício, durante 30 minutos, nos diferentes dias do estudo originaram 49 resultados estatísticos que estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 - Porcentagem de queda do VEF<sub>1</sub> pós-exercício nos diferentes intervalos de tratamento\*

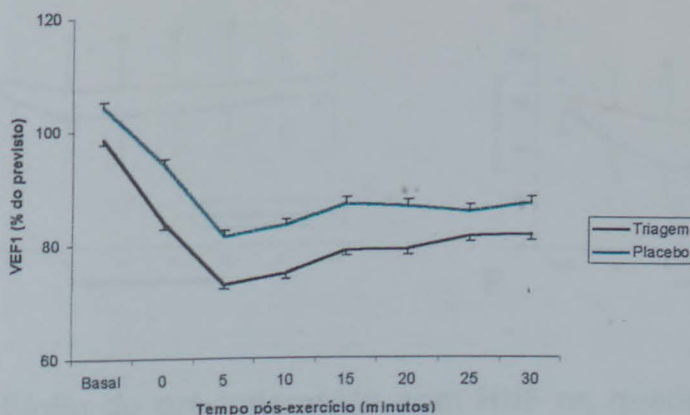
Tempo (minutos)	Triagem	Placebo	HNF			HBPM		
			1h	3h	6h	1h	3h	6h
0	15,22 ± 13,54	10,33 ± 14,44	9,56 ± 10,99	0,11 ± 10,04	5,22 ± 15,67	1,33 ± 10,02	1,22 ± 13,75	7,89 ± 8,12
P	-	0,251	0,051	0,026	0,079	0,022	0,018	0,088
5	26,67 ± 12,55	22,78 ± 12,53	13,67 ± 12,83	5,56 ± 8,56	10,11 ± 16,41	10,11 ± 9,99	5,67 ± 11,77	12,56 ± 14,16
P	-	0,318	0,000	0,004	0,024	0,001	0,001	0,021
10	24,56 ± 19,76	20,56 ± 19,58	10,22 ± 13,56	3,56 ± 8,80	8,67 ± 16,08	6,89 ± 13,16	6,89 ± 13,93	10,00 ± 14,98
P	-	0,384	0,004	0,021	0,042	0,006	0,033	0,024
15	23,33 ± 18,31	17,56 ± 18,26	9,33 ± 16,16	0,11 ± 11,03	8,56 ± 16,17	6,11 ± 12,36	3,11 ± 11,75	9,22 ± 10,91
P	-	0,173	0,001	0,015	0,042	0,001	0,003	0,009
20	20,67 ± 20,25	18,00 ± 20,12	9,44 ± 16,04	0,11 ± 10,39	7,00 ± 17,80	4,00 ± 13,93	1,11 ± 14,56	8,22 ± 9,68
P	-	0,535	0,003	0,041	0,078	0,004	0,003	0,034
25	15,67 ± 15,91	16,11 ± 17,11	9,67 ± 15,31	0,56 ± 7,99	5,67 ± 16,71	4,67 ± 14,27	0,56 ± 13,06	6,78 ± 10,96
P	-	0,907	0,086	0,050	0,148	0,012	0,014	0,056
30	15,44 ± 17,77	15,11 ± 17,49	7,56 ± 14,44	0,11 ± 8,51	5,00 ± 14,29	2,22 ± 15,25	1,00 ± 13,14	2,67 ± 8,70
P	-	0,941	0,068	0,056	0,108	0,014	0,017	0,098

\* Dados são apresentados como média ± desvio-padrão. Foram analisados estatisticamente os dados do dia de tratamento com os da triagem.

Na triagem, a queda máxima do  $VEF_1$  foi de  $26,67\% \pm 12,55\%$  aos cinco minutos pós-exercício e de  $24,56 \pm 19,76\%$  aos dez minutos; no dia de pré-tratamento com placebo, a queda foi, respectivamente, de  $22,78 \pm 12,53$  e de  $20,56 \pm 19,58\%$ . As comparações entre as quedas do  $VEF_1$ , nesses dois dias, através do teste t de Student para amostras pareadas, mostraram  $p = 0,318$  aos 5 minutos e  $p = 0,384$  aos 10 minutos, sem diferença estatística (Figura 3).



A



B

**Figura 3:** Efeito do pré-tratamento com placebo na queda do  $VEF_1$  pós-exercício (a queda do  $VEF_1$  não apresentou diferença significativa em relação à triagem). Dados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão.

A queda média do VEF<sub>1</sub> após o exercício, com pré-tratamento com HNF 1, 3 e 6 horas, foi de  $14 \pm 13\%$ ,  $6 \pm 8\%$  e  $10 \pm 16\%$ , respectivamente, aos 5 minutos e de  $10 \pm 13\%$ ,  $4 \pm 9\%$  e  $9 \pm 16\%$  aos 10 minutos. Em todos os intervalos de pré-tratamento, a HNF atenuou significativamente a queda do VEF<sub>1</sub> (Figura 4).

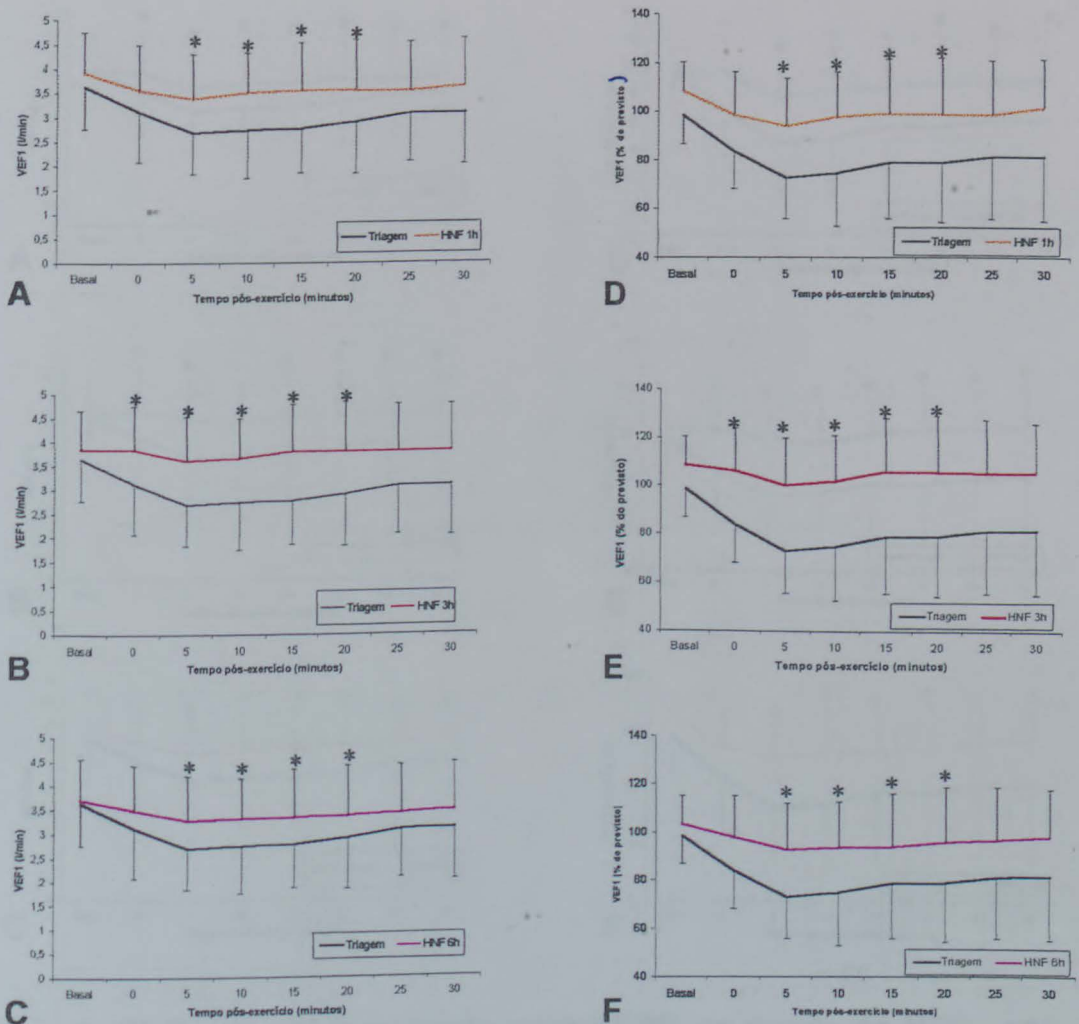


Figura 4: Efeito do pré-tratamento com HNF na queda do VEF<sub>1</sub>, pós-exercício, nos diferentes dias de pré-tratamento (em A, B e C, em litros por minuto; em D, E e F, porcentagem do previsto). Dados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. \* Significativamente diferente da triagem ( $p < 0,05$ )

A queda média do  $VEF_1$  após o exercício, com pré-tratamento com HBPM 1, 3 e 6 horas, foi de  $10 \pm 10\%$ ,  $6 \pm 12\%$  e  $13 \pm 14\%$ , respectivamente, aos cinco minutos e de  $7 \pm 13\%$ ,  $7 \pm 14\%$  e  $10 \pm 15\%$ , aos dez minutos, respectivamente. Em todos os intervalos de pré-tratamento, a HBPM atenuou significativamente a queda do  $VEF_1$  (Figura 5).

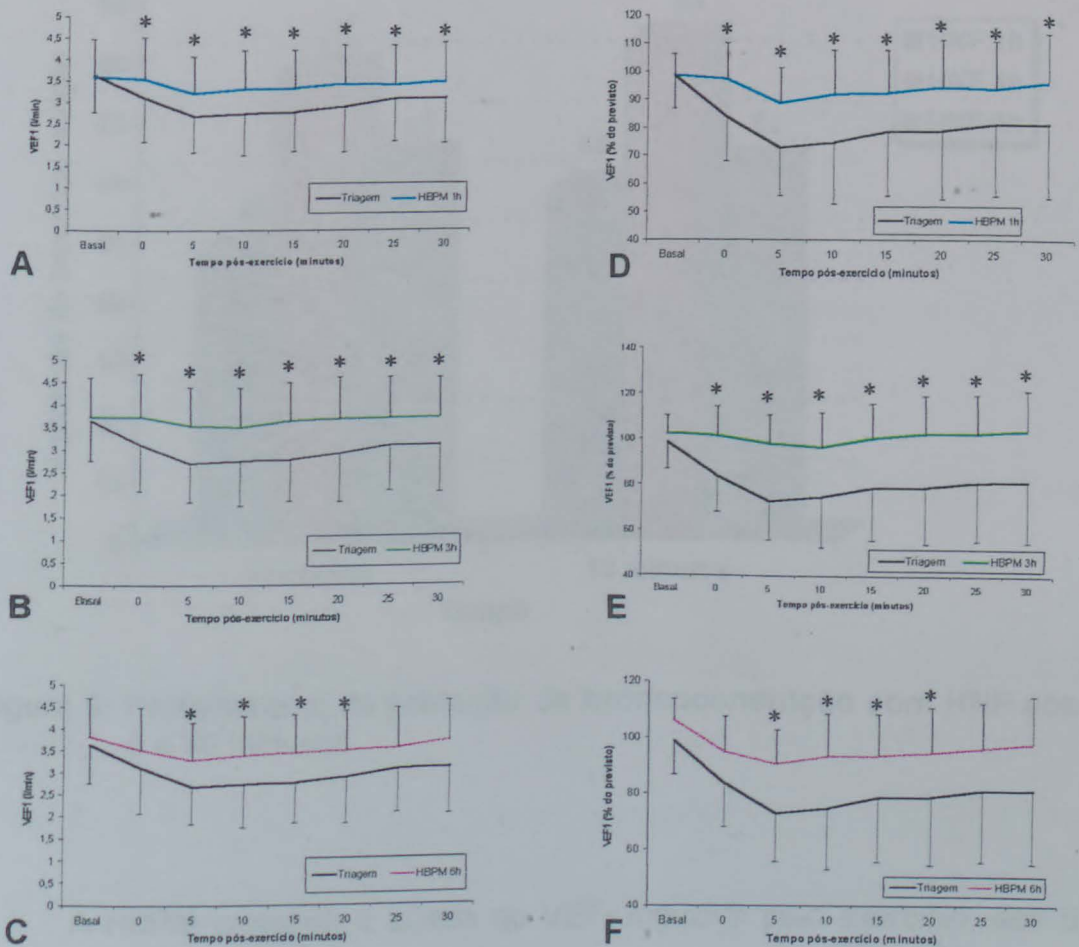
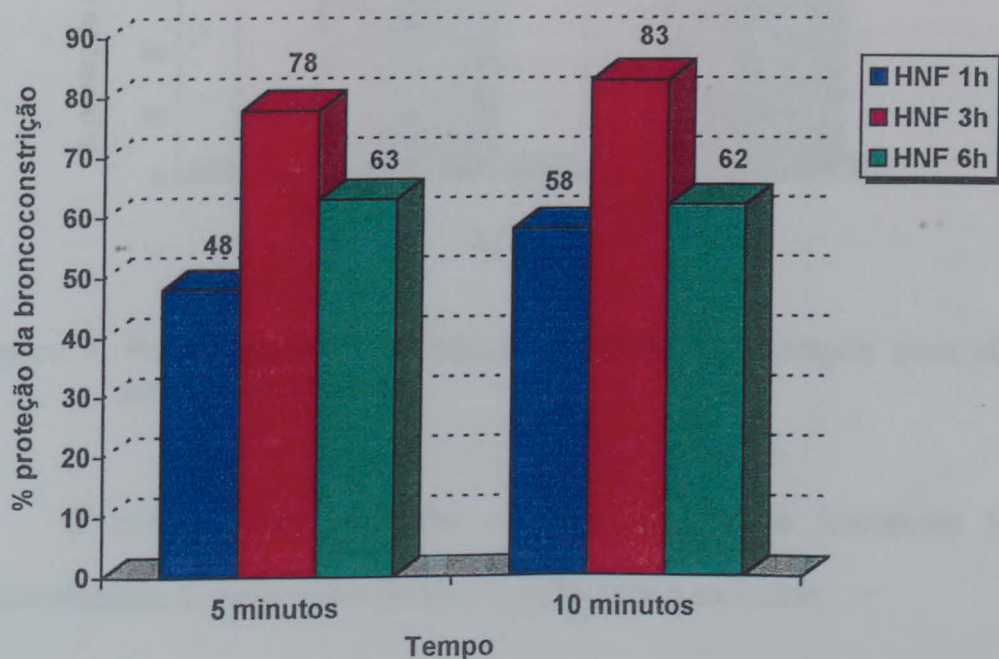


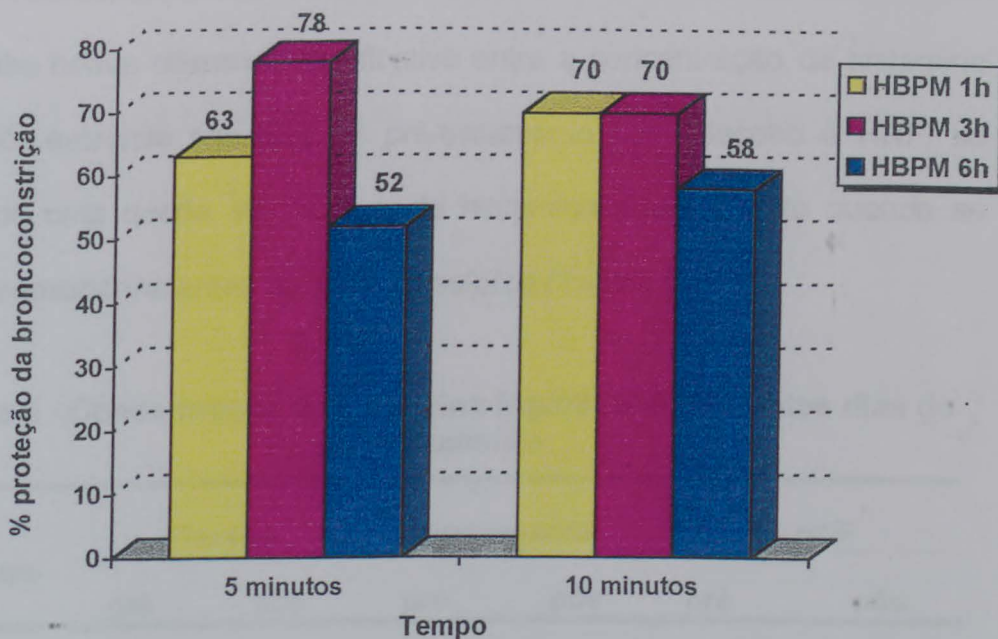
Figura 5: Efeito do pré-tratamento com HBPM na queda do  $VEF_1$ , pós-exercício, nos diferentes dias de pré-tratamento (em A, B e C, em litros por minuto; em D, E e F, porcentagem do previsto). Dados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. \* Significativamente diferente da triagem ( $p < 0,05$ )

A HNF protegeu a queda do  $VEF_1$  induzida pelo exercício em 48%, 78% e 63% aos 5 minutos e em 58%, 83% e 62% aos 10 minutos quando administrada, respectivamente, 1, 3 e 6 horas antes do teste de exercício (Figura 6).



**Figura 6: Porcentagem de proteção de broncoconstrição com HNF aos 5 e 10 minutos**

A HBPM protegeu a queda do  $VEF_1$  induzida pelo exercício, aos 5 minutos, em 63%, 78% e 52% e, aos 10 minutos, em 70%, 70% e 58% quando administrada 1, 3 e 6 horas antes do teste de esforço, respectivamente (Figura 7).



**Figura 7: Porcentagem de proteção de broncoconstrição com HBPM aos 5 e 10 minutos**

O efeito protetor máximo ocorreu quando as heparinas foram administradas 3 horas antes da provocação com o exercício.

Com o propósito de comparar o efeito protetor da HNF com o da HBPM na AIE no mesmo grupo, aplicou-se o teste de Wilcoxon nas diferenças. Tal teste permitiu apurar o intervalo de  $[-13,5; 12]$  para a mediana com uma confiança calculada de 94,1%, o que demonstra não existir diferença no efeito protetor das drogas na AIE, nas doses utilizadas.

Seis pacientes coletaram amostras de sangue antes e após o exercício no dia de tratamento com placebo. Desses pacientes, três coletaram amostras de sangue antes e após o exercício com pré-tratamento com heparina e três antes e após o tratamento com enoxaparina.



Não houve diferença significativa entre a concentração de histamina pré e pós-exercício nos dias de pré-tratamento com placebo e HNF, só ocorrendo uma queda significativa da histamina pós-exercício quando se utilizou enoxaparina antes do teste de esforço (Tabela 6).

**Tabela 6 - Concentração de histamina (ng/ml) nos diferentes dias de pré-tratamento**

Pacientes	Placebo		Enoxaparina		HNF	
	pré	pós	pré	pós	pré	pós
2	0,7	6,8	-	-	0,7	3,4
3	6,9	0,6	2,6	1,5	-	-
4	-	1,2	-	-	0,9	1,8
5	0,8	0,8	-	-	0,9	1,1
8	0,9	0,6	3,9	1,4	-	-
9	0,8	1,6	5,9	1,6	-	-
<b>Média ± DP</b>	<b>2,02±2,7</b>	<b>1,93±0,99</b>	<b>4,13±0,96</b>	<b>1,5±1,6</b>	<b>0,83±0,11</b>	<b>2,1±1,8</b>

As concentrações de leucotrienos cisteínicos estão demonstradas na Tabela 7. Os resultados foram inexpressivos.

**Tabela 7 - Concentração de leucotrienos cisteínicos (pg/ml) nos diferentes dias de pré-tratamento**

Paciente	Placebo		Enoxaparina		HNF	
	pré	pós	pré	pós	pré	pós
2	0	0	-	-	0	> 0,96
3	> 0,96	0	0	> 0,96	-	-
4	> 0,96	0	-	-	0	0
5	0	0	-	-	0	> 0,96
8	0	0	> 0,96	> 0,96	-	-
9	> 0,96	> 0,96	0,85	0,81	-	-

\* - Limite de detecção de 0,015 pg/ml

A IL-2 e o IFN- $\delta$  foram indetectáveis pelos métodos utilizados. A Tabela 8 mostra os valores de IL-4.

**Tabela 8 - Concentração de IL4 (pg/ml) nos diferentes dias de pré-tratamento**

Paciente	Placebo		Enoxaparina		HNF	
	pré	pós	pré	pós	pré	pós
2	0	< 7,8	-	-	9	16,4
3	0	35,5	40,5	18,7	-	-
4	0	< 7,8	-	-	0	0
5	0	0	-	-	< 7,8	< 7,8
8	30,7	47,8	< 7,8	0	-	-
9	0	< 7,8	57,7	26,9	-	-

\* - Limite de detecção de 7,8 pg/ml

Analisando paciente a paciente, observou-se um aumento da IL-4 após o exercício em 5 dos 6 pacientes estudados no dia de pré-tratamento com placebo. Os valores de IL-4 diminuíram pós-exercício no dia de pré-tratamento com enoxaparina.

Considerando que o método utilizado detecta a IL-4 somente a partir de 7,8 pg/ml, não foi possível aplicar um teste estatístico. Como houve uma diferença grande nos valores de IL-4 basais nos diferentes dias de coleta, não foi possível comparar os dados obtidos no dia de pré-tratamento com placebo com os dados do dia de pré-tratamento com enoxaparina.

## **5 DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

As heparinas não fracionadas e as de baixo peso molecular atenuam o broncoespasmo induzido pelo exercício quando administradas até 6 horas antes do teste de esforço. O provável mecanismo de ação para essa proteção está na modulação de mediadores pelo mastócito, via canal  $IP_3$ .

Estudando os pacientes que vinham ao laboratório de função pulmonar com história de BIE, observou-se que 23% confirmaram o diagnóstico pelo teste de esforço em esteira ergométrica.

A prevalência descrita de sintomas desencadeados pelo exercício em pacientes com asma varia de 40% a 90%<sup>(2,8,9,10)</sup>, o mesmo ocorrendo em 40% dos pacientes com rinite alérgica<sup>(9)</sup>. Essa disparidade pode dever-se ao fato de que os pacientes encaminhados ao laboratório para o teste formavam um grupo heterogêneo, já que diversos setores e especialidades solicitavam o exame e a história clínica nem sempre era bem fundamentada.

A grande variação na prevalência de AIE nos diversos estudos realizados, provavelmente, decorra das diferenças na seleção de pacientes (gravidade da asma), do tipo de exercícios empregados no teste (corrida ao

---

ar livre, esteira ou bicicleta ergométrica) e de critérios utilizados na demonstração do broncoespasmo<sup>(2)</sup>.

Estudo realizado em 1.071 crianças menores de 12 anos, no Quênia, encontrou uma prevalência de AIE de 22,9% em crianças urbanas e de 13,2% em crianças provenientes da zona rural, considerando-se como diagnóstico uma queda do VEF<sub>1</sub> maior ou igual a 10%, após a realização de corrida ao ar livre<sup>(15)</sup>.

Em 1998, Kukafka e colaboradores avaliaram a prevalência de AIE em 214 atletas através de corrida ao ar livre. Verificaram que 9% dos atletas apresentaram uma queda do PFE maior ou igual a 15% após o exercício<sup>(18)</sup>.

Leuppi e colaboradores encontraram uma prevalência de 11,5% de BIE em atletas de hóquei no gelo<sup>(17)</sup>, enquanto Manix e colaboradores verificaram que 35% dos patinadores no gelo estudados apresentaram uma queda do VEF<sub>1</sub> maior ou igual a 10%<sup>(16)</sup>.

Sano e colaboradores, quando avaliaram a prevalência de AIE em 71 pacientes com história prévia de asma leve, moderada ou grave, encontraram 45,1% de testes positivos, definidos como uma queda do VEF<sub>1</sub> maior ou igual a 15%, os quais ocorrem de forma mais freqüente no grupo de pacientes com asma moderada a grave<sup>(13)</sup>.

No presente estudo, 9 pacientes completaram todas as etapas de avaliação, perfazendo um total de 56 testes de exercício realizados. A idade média±DP dos pacientes foi de 23±9,33 anos. O diagnóstico de AIE é

---

---

geralmente feito em pacientes jovens, crianças e adolescentes, grupos que costumam realizar mais atividades físicas, além de não apresentarem comorbidades que influenciem no diagnóstico. Em três estudos em que foi avaliado o efeito das HNF e da HBPM na BIE, as idades médias dos pacientes foram de 27, 25 e 27 anos, sendo semelhantes ao grupo aqui avaliado<sup>(128,129,130)</sup>.

Todos os pacientes apresentavam VEF<sub>1</sub> e CVF basais maiores que 80% do previsto na triagem, não havendo, portanto, pacientes com obstrução importante da via aérea antes do exercício.

Os valores de VEF<sub>1</sub> basais, nos oito dias de estudo, foram reprodutíveis, ou seja, os pacientes iniciaram o teste de esforço com valores de VEF<sub>1</sub> semelhantes em cada dia do estudo, não havendo influência do VEF<sub>1</sub> pré-exercício nas quedas e proteções obtidas durante o protocolo.

O pré-tratamento com placebo, HNF e HBPM não induziu efeito significativo nos valores de VEF<sub>1</sub>, demonstrando que as variações da função pulmonar ocorreram exclusivamente pela provocação com exercício.

Coletivamente, esses achados ressaltam a importância do efeito protetor das heparinas na AIE, visto que sua ação não sofreu influências extrínsecas (ação ambiental e de drogas) ou intrínsecas (gravidade da asma).

Considerando-se que o diagnóstico de AIE é definido pela queda do VEF<sub>1</sub> maior ou igual a 10%, embora alguns autores acreditem que uma

---

---

queda do VEF<sub>1</sub> maior ou igual a 15% estabeleceria de forma mais precisa a presença de AIE<sup>(1,2,8,9,10,11,12)</sup>, o presente estudo apresentou quedas significativas do VEF<sub>1</sub> após o exercício, estabelecendo com clareza o diagnóstico.

Os pacientes apresentaram uma resposta típica à provocação com exercício, atingindo um pico de obstrução no quinto minuto pós-exercício, com melhora gradual do VEF<sub>1</sub> até o trigésimo minuto. A segunda maior queda do VEF<sub>1</sub> ocorreu no décimo minuto após esforço.

Uma queda importante do VEF<sub>1</sub> foi observada, entretanto, imediatamente após o esforço (tempo 0), demonstrando que a obstrução da via aérea pode ter iniciado durante a realização do teste na esteira ergométrica. Alguns pacientes podem desenvolver broncoconstrição durante o exercício. Tal fato relaciona-se com a intensidade do esforço<sup>(19)</sup> e com a duração do exame<sup>(22)</sup>. Os pacientes do presente estudo realizaram o teste de esteira durante aproximadamente 15 minutos, pois permaneciam em exercício por 10 minutos a partir do momento em que atingissem sua frequência cardíaca submáxima, o que, algumas vezes, demorava até 5 minutos. Suman e colaboradores observaram que a obstrução da via aérea pode ocorrer durante o exercício, especialmente em sessões longas, pois evidenciaram que a BIE iniciava a partir do décimo quinto minuto do teste<sup>(22,23)</sup>.

O pré-tratamento com HNF, na dose de 1.000 UI/Kg (dose máxima de 80.000 UI), atenuou a BIE nos diferentes tempos de pré-tratamento. Fez-se

---



---

uso dessa dose de HNF com base em estudos que demonstraram uma inibição completa da broncoconstrição induzida por antígeno em ovelhas<sup>(135)</sup>, bem como uma atenuação da BIE em 75% dos pacientes estudados com essa droga<sup>(128)</sup>.

A heparina comercial utilizada neste estudo contém, como excipiente, o álcool benzil. Essa substância, utilizada apenas em altas doses, pode provocar o relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas de cães, *in vitro*<sup>(146)</sup>, porém é bastante improvável que tal fato tenha ocorrido, pois em 1993, Ahmed e colaboradores, ao testarem a ação da heparina inalatória em 12 pacientes com AIE, compararam seu efeito com o de uma solução de placebo que continha uma concentração equivalente desse excipiente. Evidenciaram que a BIE não foi atenuada por essa solução<sup>(128)</sup>. Anteriormente, foi demonstrado, em ovelhas, que o pré-tratamento com álcool benzil não interferiu na BIA<sup>(135)</sup> e na resposta cutânea imediata a estímulos imunológicos e não imunológicos<sup>(136)</sup>. O álcool benzil também falhou em modificar, *in vitro*, a resposta constritora, induzida por antígenos, de tiras de musculatura lisa traqueal de ovelhas<sup>(139)</sup>.

A HNF preveniu a BIE por até seis horas, de forma tempo-dependente. A proteção alcançada foi de 48%, 78% e 63% aos 5 minutos após exercício e de 58%, 83% e 62% aos 10 minutos após esforço. A proteção máxima ocorreu quando a heparina foi administrada 3 horas antes do exercício.

---

---

Em estudo semelhante, a HNF inalatória (1.000 UI/Kg) preveniu a queda da condutância da via aérea induzida pelo exercício, também de forma tempo-dependente. Contrastando com os presentes dados, a proteção da BIE foi de 58%, 78% e 67% quando o tempo de pré-tratamento com a droga em estudo foi de 15 minutos, 1 hora e 3 horas, já o pré-tratamento com HNF 6 horas antes do exercício foi inefetivo<sup>(129)</sup>.

A duração da ação antialérgica das heparinas é dependente da dose e da via de administração, como demonstrado em estudos realizados em animais<sup>(135,138)</sup>. Em ovelhas, a heparina aerolizada tem início de ação mais rápido quando comparada com heparina utilizada por via endovenosa. À medida que se prolongava o tempo entre o pré-tratamento com a droga inalatória e a provocação com antígeno, o efeito inibitório da heparina diminuía. Em contraste, prolongando-se esse tempo de pré-tratamento, aumentava-se o efeito das heparinas administradas por via endovenosa. Com ambas as vias de administração, a heparina demonstrou um efeito inibitório comparável na BIA por até 6 horas; entretanto, quando foi aumentado o tempo de pré-tratamento para 12 horas, a heparina endovenosa tornou-se inefetiva<sup>(138)</sup>.

Esses estudos, *in vivo* e *in vitro*, também demonstraram que a heparina possuía propriedades farmacológicas para inibir a reação alérgica cutânea e a liberação de mediadores pelos mastócitos em um tempo ótimo de pré-tratamento de uma hora<sup>(136,138)</sup>.

---

---

No presente estudo, a proteção máxima ocorreu quando o pré-tratamento com heparina inalatória foi de três horas, tendo a proteção se mantido até a sexta hora. Essas diferenças podem refletir as variações na absorção e metabolismo da heparina nas duas espécies, mas ainda são necessários novos estudos para ampliar tais observações.

Comparando os resultados aqui obtidos com os de Garrigo e colaboradores, onde também foi estudado o tempo de ação da HNF em 9 pacientes com AIE através da condutância da via aérea, observam-se diferenças importantes. É possível que a heparina sofra outras influências no seu mecanismo de ação, embora questões como essas não tenham sido avaliadas pelos autores.

A HBPM, na dose de 1 mg/Kg de peso, atenuou a queda do  $VEF_1$  pós-exercício, nos diferentes tempos de pré-tratamento estudados (1, 3 e 6 horas), em  $10 \pm 10\%$ ,  $6 \pm 12\%$  e  $13 \pm 14\%$ , respectivamente, aos 5 minutos e em  $7 \pm 13\%$ ,  $7 \pm 14\%$  e  $10 \pm 15\%$ , respectivamente, aos 10 minutos após exercício.

A proteção conferida pela HBPM na queda do  $VEF_1$  induzida pelo exercício foi de 63%, 78% e 52% aos 5 minutos e de 70%, 70% e 58% aos 10 minutos quando administrada 1, 3 e 6 horas antes da provocação com exercício.

Em 1999, Ahmed e colaboradores testaram o efeito da enoxaparina inalatória em 13 pacientes com AIE. Verificaram que a enoxaparina

---

---

aerolizada, administrada 45 minutos antes do teste de esforço, inibiu a BIE de forma dose-dependente, ou seja, a proteção da AIE encontrada foi de 28%, 38% e 48% quando os autores utilizaram, respectivamente, 0,5 mg/Kg, 1 mg/Kg e 2 mg/Kg da droga<sup>(130)</sup>.

No presente estudo, a proteção encontrada com o uso de enoxaparina 1 mg/Kg, administrada uma hora antes do esforço, foi superior à do estudo daqueles autores, mostrando-se inclusive mais efetiva quando comparada com a proteção conferida por 2 mg/Kg de enoxaparina.

Alguns estudos demonstraram que as ações antialérgicas das heparinas são peso molecular dependentes. Martinez-Salas e colaboradores mostraram que três pesos moleculares distintos de heparina fracionada (médio, baixo e ultrabaixo peso molecular) atenuaram a BIA e a HRVA em ovelhas. Além disso, encontraram uma relação inversa entre a ação antialérgica da droga e o seu peso molecular. A heparina de ultrabaixo peso molecular foi mais efetiva na prevenção da BIA e da HRVA<sup>(144)</sup>.

O pré-tratamento com fragmina (HBPM) atenuou, de forma dose-dependente, o BIA e a HRVA em 15 ovelhas, bem como inibiu a degranulação de mastócitos, derivados de peritônio de ratos, induzida pela IgE<sup>(134)</sup>. A liberação de histamina, induzida por antígeno, no lavado broncoalveolar de ovelhas foi inibida pelo pré-tratamento com HNF e HBPM<sup>(133)</sup>.

---

---

Com base nesses dados, foi levantada a hipótese de que a HBPM seria mais efetiva na prevenção da AIE. Entretanto, as proteções na queda do VEF<sub>1</sub> pós-exercício não foram diferentes com as duas drogas utilizadas. Considerando que as propriedades antialérgicas da enoxaparina são dose-dependentes, é possível postular que essas diferenças poderiam ser maiores se a dose utilizada no estudo fosse também maior.

A utilização de 1 mg/Kg de enoxaparina aerolizada no pré-tratamento da AIE preveniu em 38% a queda do VEF<sub>1</sub> após esforço em estudo realizado por Ahmed e colaboradores. Essa proteção foi de 48% quando a dose de enoxaparina foi aumentada para 2 mg/Kg. Tal proteção de 38% foi semelhante à encontrada com o uso de 1.000 UI/Kg de HNF (31%) na prevenção da BIE, nesse mesmo estudo<sup>(130)</sup>. Utilizando as mesmas doses das drogas acima, reproduziu-se aqui um efeito protetor na AIE semelhante entre a HNF e a HBPM estudada.

As heparinas possuem vários sítios de ação, porém estudos sugerem que as ações antialérgicas dessas drogas estejam relacionadas com a inibição da liberação de mediadores pelos mastócitos, ou seja, elas não inativam ou bloqueiam os efeitos dos mediadores nos órgãos alvos. Essa hipótese baseia-se em observações feitas em vários estudos sobre as heparinas, os quais mostram que elas são incapazes de atenuar, *in vivo* e *in vitro*, a resposta contrátil da via aérea induzida por agentes agonistas<sup>(102,128,130,135,136,139)</sup>; inibem a BIA, *in vivo* e *in vitro* <sup>(134,135,136,137,138,139,140,142,144,145)</sup>; previnem a resposta broncoconstritora induzida pelo

---

componente 48/80, agente não imunológico capaz de provocar a degranulação do mastócito<sup>(135,136)</sup>; inibem a liberação de histamina, *in vitro*, por mastócitos de úteros humanos e de peritônio de ratos estimulados por IgE<sup>(134,136,138,140)</sup>; e atenuam a BIE<sup>(128,129,130)</sup>.

Os pré-tratamentos com placebo e heparina não modificaram as concentrações de histamina pós-exercício. A enoxaparina, ao contrário, diminuiu significativamente a histamina após teste de esforço.

Suzuky e colaboradores demonstraram que o pré-tratamento com heparina aerolizada reduziu a liberação de leucotrienos e prostaglandinas, bem como aboliu a liberação de tromboxano no lavado broncoalveolar de cães induzida pela hiperventilação<sup>(102)</sup>.

No presente estudo, as concentrações de leucotrienos foram anedóticas.

É possível que esses achados inexpressivos estejam relacionados ao tempo de coleta das amostras (5 minutos após o exercício): a histamina, por apresentar uma liberação fugaz,<sup>(59)</sup> e os leucotrienos, por serem mediadores pós-formados, talvez necessitassem de um tempo maior para serem adequadamente detectáveis.

A IL-4, embora seja um mediador inflamatório, apresentou um aumento após exercício no dia de pré-tratamento com placebo. É possível que esse aumento tenha ocorrido pela degranulação do mastócito provocada pelo teste de exercício<sup>(50,86,87,88,89)</sup>.

---

---

A diminuição da IL4 após exercício com pré-tratamento com enoxaparina pode estar relacionada com a ação antiinflamatória peso molecular dependente dessa droga<sup>(133,144)</sup>. Outros mecanismos que expliquem esses achados, entretanto, devem ser estudados.

O mecanismo celular exato responsável pelas ações antialérgicas das heparinas não é claro. Parece que elas agem como um antagonista competitivo do IP<sub>3</sub>, inibindo o aumento do cálcio intracelular<sup>(108,109,110)</sup>.

A heparina, *in vitro*, inibiu seletivamente a degranulação do mastócito induzida pela IgE e pelo IP<sub>3</sub>, sem atenuar os efeitos do *calcium ionophore* (A23187)<sup>(136,140)</sup>.

Outro aspecto é o efeito antialérgico das heparinas inalatórias não relacionado com sua ação anticoagulante. Vários estudos demonstraram que a HNF inalada não alterou o ATTP<sup>(102,112,128,135,137,138,142,143)</sup>, assim como a enoxaparina não modificou o fator anti-Xa no plasma<sup>(130)</sup>.

Em 1997, Ahmed e colaboradores verificaram que uma fração não anticoagulante de heparina inibiu, de forma quatro vezes mais potente que uma HBPM, a degranulação do mastócito<sup>(138)</sup>. Posteriormente, Campo e colaboradores verificaram que as ações das frações não anticoagulantes das heparinas são peso molecular dependentes<sup>(145)</sup>.

O mecanismo exato do desenvolvimento de AIE é controverso, porém muitas evidências destacam o mastócito como a célula responsável pela BIE<sup>(90, 91, 101, 102)</sup>.

---

A inalação de ar seco durante o exercício aumentaria a osmolaridade da célula, provocando a degranulação do mastócito e a liberação de mediadores espasmogênicos<sup>(7,8, 9, 41, 45)</sup>.

O papel da constrição da microvasculatura brônquica causada pela inalação de ar frio durante o exercício parece ser um mecanismo associado à degranulação do mastócito na fisiopatogenia da AIE<sup>(37)</sup>, mecanismo que é bloqueado, por sua vez, pelo uso de heparinas inalatórias.

Considerando-se o mastócito como a célula responsável pelo desenvolvimento da BIE, é possível levantar a hipótese de que a AIE poderia ocorrer em pacientes em que o aumento da osmolaridade do mastócito provocasse a quebra do fosfatidilinositol da membrana plasmática, gerando o IP<sub>3</sub> e o DAG. O IP<sub>3</sub>, ao ligar-se a receptores específicos no retículo endoplasmático do mastócito, aumentaria a concentração de cálcio intracelular. Esse evento permitiria a exocitose dos grânulos espasmogênicos responsáveis pela BIE.

As heparinas inibiram a BIE nos pacientes estudados. É provável que tenha havido uma ruptura da cadeia de liberação de cálcio, provocada pela ligação do IP<sub>3</sub> no retículo endoplasmático do mastócito, com bloqueio do fenômeno de broncoconstrição.

O fato de a heparina ser um antagonista específico do IP<sub>3</sub> no mastócito, impedindo a liberação de mediadores como histamina, triptase,



leucotrienos, prostaglandinas e citocinas, suporta, de forma indireta, a hipótese de que esta pode ser a via principal da AIE.

---

**6 CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

- O provável mecanismo responsável pela broncoconstrição induzida pelo exercício está relacionado com a liberação de mediadores espasmogênicos pelo mastócito, via canal  $IP_3$ .
- A heparina de baixo peso molecular (enoxaparina) atenua a broncoconstrição induzida pelo exercício.
- A heparina não fracionada atenua a broncoconstrição induzida pelo exercício, nas doses utilizadas, de forma semelhante à heparina de baixo peso molecular.
- As heparinas protegem a broncoconstrição induzida por exercício por até seis horas.

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. National Heart, Lung and Blood Institute. National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report 2: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. NIH pub nº 97-4051. Bethesda, MD, 1997.
2. Consenso Brasileiro no Manejo da Asma (2: 1998: Fortaleza) II Consenso Brasileiro no manejo da asma. Brasília: Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, Alergia e Imunopatologia e Pediatria, 1999.
3. Fritscher CC, Severo RD, Fagundes SC, Cohen R, Domelles RL, Kahan F. Modificações na prevalência de asma brônquica em escolares de Porto Alegre. J Pneumol 1994; 20: 6-10.
4. Chatkin JM. Magnitude e tendência da mortalidade por asma brônquica no Rio Grande do Sul 1970/1992 [tese]. Porto Alegre (RS): UFRGS; 1994.

- 
5. Molinari JF, Chatkin JM. Tendência da mortalidade por asma Brônquica no Rio grande do Sul. *J Pneumol* 1995; 21:103-6.
  6. Weiler JM, Layton T, Hunt M. Asthma in the United States olympic athletes who participated in the 1996 summer games. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 722-6.
  7. Freed NA. Models and mechanisms of exercise-induced asthma. *Eur Respir J* 1995; 8: 1770-85.
  8. McFadden ER, Gilbert IA. Exercise-induced asthma. *N Eng J Med* 1994; 330: 1362-67.
  9. Kumar A, Busse WW. Recognizing and controlling exercise-induced asthma. *J Respir Dis* 1995; 16: 1087-96.
  10. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH, Cockcroft DW, O' Byrne PM, Anderson SD et al. Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. *Eur Respir J* 1993; 6 Suppl 16: 53-83.
  11. Haby MM, Anderson SD, Peat JK, Mellis CM, Toelle BG, Woolcock AJ. An exercise challenge protocol for epidemiological studies of asthma in children: comparison with histamine challenge. *Eur Respir J* 1994; 7: 43-9.

- 
12. American Thoracic Society. Guidelines for Methacoline and exercise challenge testing- 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 309-29.
  13. Sano F, Sole D, Naspitz CK. Prevalence and characteristics of exercise-induced asthma in children. *Pediatr Allergy Immunol* 1998; 9: 181-5.
  14. Rasmussen F, Lambrechtsen J, Siersted HC, Hansen HS, Hansen NC. Asymptomatic bronchial hyperresponsiveness to exercise in childhood and the development of asthma related symptoms in young adulthood: the Odense schoolchild study. *Thorax* 1999; 54: 587-9.
  15. Ng'ang'a LW, Odhiambo JA, Mungai MW, Gicheha CM, Nderitu P, Maingi B et al. Prevalence of exercise induced bronchospasm in Kenyan school children: an urban-rural comparison. *Thorax* 1998; 53: 919-26.
  16. Mannix ET, Farber MO, Palange P, Galassetti P, Manfredi F. Exercise-induced asthma in figure skaters. *Chest* 1996; 109: 312-5.
  17. Leuppi JD, Kuhn M, Comminot C, Reinhart WH. High prevalence of bronchial hyperresponsiveness and asthma in ice hockey players. *Eur Respir J* 1998; 12: 13-6.

- 
18. Kukafka DS, Lang DM, Porter S, Rogers J, Ciccolella D, Polansky M et al. Exercise induced bronchospasm in high school athletes via a free running test. *Chest* 1998; 114: 1613-22.
  19. Beck KC, Offord KP, Scanlon PD. Bronchoconstriction occurring during exercise in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 352-7.
  20. Sly RM, Heimlich EM, Busser RJ, Strick L. Exercise-induced bronchospasm: effect of adrenergic or cholinergic blockade. *J Allergy* 1967; 40: 93-9.
  21. Larsson K, Martinsson A, Hjemdahl P. Influence of circulating  $\alpha$  adrenoceptor agonists on lung function in patients with exercise induced asthma and healthy subjects. *Thorax* 1986; 41: 552-8.
  22. Suman OE, Babcock MA, Pegelow DF, Jarjour NN, Reddan WG. Airway obstruction during exercise in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 24-31.
  23. Suman OE, Beck KC, Babcock MA, Pegelow DF, Reddan WG. Airway obstruction during exercise and isocapnic hyperventilation in asthmatic subjects. *J Appl Physiol* 1999; 87: 1107-13.



- 
24. Beck KC, Hyatt RE, Mpougas P, Scanlon PD. Evaluation of pulmonary resistance and maximal expiratory flow measurements during exercise in humans. *J Appl Physiol* 1999; 86: 1388-95.
  25. Wright LA, Martin RJ. Nocturnal asthma and exercise-induced bronchospasm. *Postgrad Med J* 1995; 97:83-90.
  26. Yoshikawa T, Shoji S, Fujii T, Kanazawa H, Kudoh S, Hirata K et al. Severity of exercise-induced bronchoconstriction is related to airway eosinophilic inflammation in patients with asthma. *Eur Respir J* 1998; 12: 879-84.
  27. O'Byrne PM, Jones GL. The effect of indomethacin on exercise-induced bronchoconstriction and refractoriness after exercise. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 69-72.
  28. Margolskee DJ, Bigby BG, Boushey HA. Indomethacin blocks airway tolerance to repetitive exercise but not to eucapnic hyperpnea in asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 842-6.
  29. Ohtsuka A, Koyama S, Horie T. Refractoriness of eucapnic hyperventilation-induced bronchoconstriction in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:682-6.

- 
30. Manning PJ, Watson RM, O'Byrne PM. Exercise-induced refractoriness in asthmatic subjects involves leukotriene and prostaglandin interdependent mechanisms. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 950-4.
  31. Bisschop C, Guenard H, Desnot P, Vergeret J. Reduction of exercise-induced asthma in children by short, repeated warm ups. *Br J Sports Med* 1999; 33: 100-4.
  32. Peroni Dg, Boner AL. Exercise-induced asthma: is there a space for late-phase reactions? *Eur Respir J* 1996; 9: 1335-8.
  33. Hofstra WB, Sterk PJ, Neijens HJ, Kouwenberg JM, Mulder PGH, Duiverman EJ. Occurrence of a late response to exercise in asthmatic children: multiple regression approach using time-matched baseline and histamine control days. *Eur Respir J* 1996; 9: 1348-55.
  34. Koh YY, Jeong JH, Jin SM, Kim CK, Min KU. The occurrence of late asthmatic response to exercise after allergen challenge. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; 81: 366-72.
  35. McFadden ER. Respiratory heat and water exchange: physiological and clinical implications. *J Appl Physiol* 1983; 54: 331-6.
  36. McFadden ER, Denison DM, Waller JF, Assoufi W, Peacock A, Sopwith T. Direct recording of the temperatures in the tracheobronchial tree in normal man. *J Clin Invest* 1982; 69: 700-5.

- 
37. Anderson SD. Asthma provoked by exercise, hyperventilation and the inhalation of non-isotonic aerosols. In: Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC, editors. *Asthma: basic mechanisms and clinical management*. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Academic Press;1998. p 569-87.
  38. Enhorning G, Hohlfeld J, Krug N, Lema G, Welliver RC. Surfactant function affected by airway inflammation and cooling: possible impact on exercise-induced asthma. *Eur Respir J* 2000; 15:532-8.
  39. Anderson SD, Schoeffel RE, Black JL, Daviskas E. Airway cooling as the stimulus to exercise-induced asthma- a re-evaluation. *Eur J Respir Dis* 1985; 67: 20-30.
  40. Zawadskii DK, Lenner KA, McFadden ER. Comparison of intraairway temperatures in normal and asthmatic subjects after hyperpnea with hot, cold and ambient air. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 1553-8.
  41. Anderson SD, Schoeffel RE, Follet R, Perry CP, Daviskas E, Kendall M. Sensivity to heat and water loss at rest and during exercise in asthmatic patients. *Eur J Respir Dis* 1982; 63: 459-71.
  42. Pesci A, Foresi A, Bertorelli G, Chetta A, Oliveri D. Histochemical characteristics and degranulation of mast cells in epithelium and lamina propria of bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 684-9.

- 
43. Eggleston PA, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. A comparison of the osmotic activation of basophils and human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1043-8.
  44. Silber G, Proud D, Warner J, Naclerio R, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein L et al. In vivo release of inflammatory mediators by hyperosmolar solutions. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 606-12.
  45. Argyros GJ, Phillips YY, Rayburn DB, Rosenthal RR, Jaeger JJ. Water loss without heat flux in exercise-induced bronchospasm. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1419-24.
  46. Freed AN, Davis MS. Hyperventilation with dry air increases airway surface fluid osmolality in canine peripheral airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1101-7.
  47. McFadden ER, Nelson JA, Skowronski ME, Lenner KA. Thermally induced asthma and airway drying. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 221-6.
  48. Albas AK, Lichtman AH, Polear JS. Effector mechanisms of immunoglobulin E-initiated immune reactions. In: *Cellular and molecular immunology*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p. 279-92.
  49. Costa JJ, Weller PF, Galli SJ. The cells of the allergic response. *JAMA* 1997; 278:1815-22.

- 
50. Holgate ST. Experimental models in asthma. *Clin Exp Allergy* 1999; 29 Suppl3: 82-6.
  51. Pearce FL. Mast cell and basophils. In: Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC, editors. *Asthma: basic mechanisms and clinical management*. 3<sup>rd</sup> ed. San diego: Academic Press; 1998. p. 113-26.
  52. Pearce FL. On the heterogeneity of mast cells. *Pharmacology* 1986; 32: 61-71.
  53. Stroebel S, Miller HRP, Ferguson A. Human intestinal mucosal mast cells: evaluation of fixation and staining techniques. *J Clin Pathol* 1981; 34: 851-8.
  54. Schwartz LB. Mediators of human mast cells and human mast cells subsets. *Ann Allergy* 1987; 58: 226-35.
  55. Weidner N, Austen KF. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. *Path Res Pract* 1993; 189: 156-62.
  56. Thompson HL, Schulman ES, Metcalfe DD. Identification of chondroitin sulfate E in human lung mast cells. *J Immunol* 1988; 140: 2706-13.
  57. Abraham WM, Wanner A. Inflammatory mediators of asthma. *Pediatric Pulmonology* 1988; 4: 2372-47.

- 
58. Garrison JC, Rall TW. Autacoids; drug therapy of inflammation In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editors. Goodman and Gilman's-The pharmacological basis of therapeutics. 8<sup>th</sup> ed. New York:Pergamon Press 1990.p. 575-99.
59. Chung KF, Barnes PJ. Others mediators of asthma. In: Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC, editors. Asthma: basic mechanisms and clinical management. 3<sup>rd</sup> ed. San diego: Academic Press; 1998. p. 343-368.
60. Stevens RL. Mast cell proteoglycan. In Stevens RI, Kaliner M, Metcalfe DD. The mast cell in health and disease. New York: Marcel Dekker; 1993. p. 381-91.
61. Schwartz LB, Bradford TR. Regulation of tryptase from human lung mast cell by heparin: stabilization of the active tetramer. J Biol Chem 1986; 261: 7372-9.
62. Schwartz LB, Yunginger JW, Miller J, Bokhari R, Dull D. Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. J Clin Invest 1989; 83:1551-5.
63. Shalit M, Schwartz LB, Golzar N, VonAllman C, Valenzano M, Fleekop P, atkins PC, Zweiman B. Release of histamine and tryptase in vivo after prolonged cutaneous challenge with allergen in humans. J Immunol 1988; 141: 821-6.

- 
64. Bosso JV, Schwartz LB, Stevenson DD. Tryptase and histamine release during aspirin-induced respiratory reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 830-7.
  65. Schwartz LB, Metcalfe DD, Miller JS, Earl H, Sullivan T. Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N Engl J Med* 1987; 316: 1622-6.
  66. Molinari JF. Efeitos da triptase na hipersensibilidade cutânea, no fenômeno broncoespástico e na hiper-responsividade das vias aéreas [tese]. Porto Alegre (RS): UFRGS; 1996.
  67. Hardy CC, Robinson C, Tattersfield AE, Holgate ST. The bronchoconstrictor effect of inhaled prostaglandin D<sub>2</sub> in normal and asthmatic men. *N Engl J Med* 1984; 311:800-4.
  68. Johnston SL, Freezer NJ, Ritter W, O' Toole S, Howarth PH. Prostaglandin D<sub>2</sub>-induced bronchoconstrictions mediated only in part by the thromboxane prostanoid receptor. *Eur Respir J* 1995; 8:411-5.
  69. Beasley R, Varley J, Robinson C, Holgate ST. Cholinergic-mediated bronchoconstriction induced by prostaglandin D<sub>2</sub>, its initial metabolite 9<sub>a</sub>, 11<sub>b</sub>-PGF<sub>2a</sub> in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:1140-4.

- 
70. Fuller RW, Dixon CMS, Dollery CT, Barnes PJ. Prostaglandin D<sub>2</sub> potentiates airway responsiveness to histamine and methacoline. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:252-4.
  71. Thomson NC, Roberts R, Bandouvakis J, Newball H, Hargreave FE. Comparison of bronchial responses to prostaglandin F<sub>2a</sub> and mathacoline. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68:392-8.
  72. Aizawa H, Chung KF, Leikauf GD, et al. Significance of thromboxane generation in ozone-induced airway hyperresponsiveness in dogs. *J Appl Physiol* 1985; 59:1918-23.
  73. McFarlane CS, Ford-Hutchinson AW, Letts LG. Inhibition of thromboxane (TxA<sub>2</sub>)-induced airway hyperresponsiveness to aerosolized acetylcholine by the selective TxA<sub>2</sub> antagonist L655, 240 in the conscious primate. *Am Rev Respir Dis* 1985; 137:100A.
  74. Dorsch WD, Ring J, Melzer H. A selective inhibitor of thomboxane biosynthesis enhances immediate and inhibits late cutaneous allergic reactions in man. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 72:168-74.
  75. Kleeberger SR, Kolbe J, Adkinson NF Jr, Peters SP, Spannhake EW. Thromboxane contributes to the immediate antigenic response of canine peripheral airways. *J Apply Physiol* 1987; 62:1589-95.



- 
76. Shephard EG, Malan L, McFarlane CM, Mouton W, Joubert JR. Lung function and plasma levels of thromboxane B<sub>2</sub>, 6-ketoprostaglandin F<sub>1α</sub> and B-thromboglobulin in antigen-induced asthma before and after indomethacin pretreatment. *Br J Clin Pharmacol* 1985; 19:459-70.
  77. Fujimura M, Sasaki F, Nakatsumi Y, et al. Effects of a thromboxane synthetase inhibitor (OKY-046) and a lipoxygenase inhibitor (AA-861) on bronchial responsiveness to acetylcholine in asthmatic subjects. *Thorax* 1986; 41:955-9.
  78. O'Byrne PM. Prostaglandins and Thromboxane. In: Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC, editors. *Asthma: basic mechanisms and clinical management*. 3<sup>rd</sup> ed. San diego: Academic Press; 1998. p. 269-80.
  79. Manning PJ, Jones GL, O'Byrne PM. Tachyphylaxis to inhaled histamine in asthmatic subjects. *J Appl Physiol* 1987; 63:1572-7.
  80. Drazen JM. Cysteinyl Leukotrienes. In: Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC, editors. *Asthma: basic mechanisms and clinical management*. 3<sup>rd</sup> ed. San diego: Academic Press; 1998. p. 281-95.
  81. Holroyde MC, Altounyan RE, Cole M, Dixon M, Elliot EV. Bronchoconstriction produced in man by leukotrienes C and D. *Lancet* 1981; 2: 17-8.

- 
82. Barnes NC, Piper PJ, Costello JF. Comparative effects of inhaled leukotriene C<sub>4</sub>, leukotriene D<sub>4</sub> and histamine in normal subjects. *Thorax* 1984; 39:500-4.
83. Smith LJ, Greenberger PA, Patterson R, Krell RD, Bernstein PR. The effect of inhaled leukotriene D<sub>4</sub> in humans. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 368-72.
84. Davidson AB, Lee TH, Scanlon PD, et al. Bronchoconstrictor effects of leukotriene E<sub>4</sub> in normal and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 333-7.
85. Griffin M, Weiss JW, Leitich AG, et al. Effects of leukotriene D on the airways in asthma. *N Engl J Med* 1983; 308: 436-9.
86. Galli SJ, Costa JJ. Mast cell-leukocyte cytokine cascades in allergic inflammation. *Allergy* 1995; 50: 851-62.
87. Galli SJ. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* 1993; 328:257-65.
88. Robinson DS, Durhan SR, Kay AB. Cytokines, III: cytokines in asthma. *Thorax* 1993; 148: 401-6.

- 
89. Costa JJ, Church MK, Galli SJ. Mast cell cytokines in allergic inflammation. In: Holgate ST, Busse W, eds. Inflammatory mechanisms in asthma. New York, NY: Marcel Dekker Inc; 1997. p.11-127.
  90. Crimi E, Balbo A, Milanese M, Miadonna A, Rossi GA, Brusasco V. Airway inflammation and occurrence of delayed bronchoconstriction in exercise-induced asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 507-12.
  91. Omori C, Schofield BH, Mitzner W, Fred AN. Hyperpnea with dry air causes time-dependent alterations in mucosal morphology and bronchovascular permeability. *J Appl Physiol* 1995; 78: 1043-51.
  92. Silverman M, Andrea T. Time course off effect of disodium cromoglycate on exercise-induced asthma. *Arch Dis Child* 1972; 47:419-22.
  93. Finnerty JP, Holgate ST. Evidence for the role of histamine and prostaglandins as mediators in exercise-induced asthma: the inhibitory effect of terfenadine and flurbiprofen alone and in combination. *Eur Respir J* 1990; 3:540-7.
  94. Hartley JPR, Norgrady SG. Effect of an inhaled antihistamine on exercise-induced asthma. *Thorax* 1980; 35:593-4.
  95. Magnussen H, Reuss G, Jorres A, Aurich R. Effect of azelastine on exercise-induced asthma. *Chest* 1988; 93:937-40.

- 
96. Finnerty JP, Wood-Baker R, Thomson H, Holgate ST. Role of leukotrienes in exercise-induced asthma. Inhibitory effects of ICI 204219, a potent leukotriene D<sub>4</sub> receptor antagonist. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:746-9.
  97. Meltzer SS, Hasday JD, Cohn J, Bleecker ER. Inhibition of exercise-induced bronchospasm by zileuton: a 5-lipoxygenase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:931-5.
  98. Leff JA, Busse WW, Pearlman D, Bronsky EA, Kemp J, Hendeles L et al. Montelukast, a leukotriene-receptor antagonist, for the treatment of mild asthma and exercise-induced bronchoconstriction. *N Engl J Med* 1998; 339:147-52.
  99. Pearlman DS, Ostrom NK, Bronsky EA, Bonuccelli CM, Hanby LA. The leukotriene d<sub>4</sub>-receptor antagonist zafirlukast attenuates exercise-induced bronchoconstriction in children. *J Pediatr* 1999; 134:273-9.
  100. Spooner CH, Saunders LD, Rowe BH. Nedocromil sodium for preventing exercise-induced bronchoconstriction [on CD-ROM] *Cochrane Libr.* 2000; (1):1-15.
  101. O'Sullivan, Roquet A, Dahlén B, Larsen F, Eklund A, Kumlin M et al. Evidence for mast cell activation during exercise-induced bronchoconstriction. *Eur Respir J* 1998; 345:345-0.

- 
102. Suzuki R, Freed AN. Heparin inhibits eicosanoid metabolism and hyperventilation-induced bronchoconstriction in dogs. *Am J Respir Crit care Med.* 2000; 161:1850-4.
103. Majerus PW, Broze GJ, Miletich JP, Tollefsen DM. Anticoagulant, thrombolytic, and antiplatelet drugs. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editors. *Goodman and Gilman's-The pharmacological basis of therapeutics.* 8<sup>th</sup> ed. New York:Pergamon Press 1990.p. 1311-31.
104. Hirsch J, Warkentin TE, Raschke R, Granger C, Ohman EM Dalen JE. Heparin and low-molecular-weight heparin. Mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 1998; 114:489s-510s.
105. Oliveira LCL, Lacerda APM. Atualização no uso das heparinas de baixo peso molecular. *Pulmão RJ* 1999; 8: 25-34.
106. Bleinberg I, MacGregor I, Aronson M. Heparin receptors on mouse macrophages. *Thromb Res* 1983; 29: 53-61.
107. Cruvinel MC, Morrone N. Heparinas de baixo peso molecular. *J Pneumol* 1995; 21: 185-8.
108. Kobayashi S, Somlyo AV, Somlyo AP. Heparin inhibits the inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent, but not the independent, calcium

- 
- release induced by guanine nucleotide in vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 153: 625-31.
109. Cullen PJ, Comerford JG, Dawson AP. Heparin inhibits the inositol 1,4,5-trisphosphate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from rat liver microsomes. *FEBS* 1988; 228: 57-9.
110. Ghosh TK, Eis PS, Mullaney JM, Ebert CL, Gill DL. Competitive, reversible, and potent antagonism of inositol 1,4,5-trisphosphate-activated calcium release by heparin. *J Biol Chem* 1988; 263: 11075-9.
111. Chilvers ER, Callis RAJ, Willcocks AL, Potter BVL, Barnes PJ, Nahorski SR. Characterisation of stereospecific binding sites for inositol 1,4,5-trisphosphate in airway smooth muscle. *J Pharmacol* 1990; 99: 297-302.
112. Bendstrup KE, , Chambers CB, Jensen JI, Newhouse MT. Lung deposition and clearance of inhaled  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -heparin in healthy volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1653-8.
113. Bendstrup KE, Newhouse MT, Pedersen OF, Jensen JI. Characterization of heparin aerosols generated in jet and ultrasonic nebulizers. *J Aerosol Med* 1999; 12:17-25.
114. McCaffrey TAD, Falcone DJ. Transforming growth factor- $\beta_1$  is a heparin-binding protein: identification of putative heparin-binding

- 
- regions and isolation of heparins with varying affinity for TGF- $\beta_1$ . *J Cell Physiol* 1992; 152:430-40.
115. Castellot JJ, Cochran DL, Karnovsky MJ. Effect of heparin on vascular smooth muscle cells. I. Cell metabolism. *J Cell Physiol* 1985; 124: 21-8.
116. Cochran DL, Castellot JJ, Karnovsky MJ. Effect of heparin on vascular smooth muscle. II. Specific protein synthesis. *J Cell Physiol* 1985; 124: 29-36.
117. Yamashita Y, Nakagomi K, Takeda T, Hasegawa S, Mitsui Y. Effect of heparin on pulmonary fibroblasts and vascular cells. *Thorax* 1992; 47: 634-9.
118. Völker W, Böhm A, Schmidt A, Svahn CM, Gellerbring AK, Mattson C et al. Inhibition of smooth muscle cell proliferation and neointimal growth by low-anticoagulant heparin. *Drug Res* 1995; 45: 546-50.
119. Folkman J, Ingber DE. Angiogenesis: regulatory role of heparin and related molecules. *In* Heparin. D.A. Lane and U Lindahl, editors. Edward Arnold, London, 1989. p. 317-33.
120. Dolowitz DA, Dougherty TF. The use of heparin as an anti-inflammatory agent. *Laryngoscope* 1960; 70: 873-84.

- 
121. Carr J. The anti-inflammatory action of heparin: heparin as an antagonist to histamine, bradykinin and prostaglandin E<sub>1</sub>. *Thromb. Res.* 1979; 16: 507-16.
122. Hanahoe THP, Jones DR. Heparin and acute inflammation in the rat. *Archs Allergy Appl Immun* 1988; 86: 243-4.
123. Seeds EAM, Hanss J, Page CP. The effect of heparin and related proteoglycans on allergen. and PAF-induced eosinophil infiltration. *J Lipid Mediat* 1993; 7: 269-78.
124. Lider O, Mekori YA, Miller T, Bar-Tana R, Vlodayvski I, Baharav E et al. Inhibition of T-lymphocyte heparanase by heparin prevents T cell migration and T cell-mediated immunity. *Eur J Immunol* 1990; 20:493-9.
125. Matzner Y, Marx G, Drexler R, Eldor A. The inhibitory effect of heparin and related glycosaminoglycans on neutrophil chemotaxis. *Thromb Haemost* 1984; 52:134-7.
126. Trybala E, Bergström T, Spillman D, Svennerholm B, Olofsson S, Flynn SJ et al. Mode of interaction between pseudorabies virus and heparan Sulfate/heparin. *Virology* 1996; 218:35-42.
127. Weiler JM, Edens RE, Linhard RJ, Kapelanski DP. Heparin and modified heparin inhibit complement activation *in vivo*. *J Immunol* 1992; 148:3210-5



- 
128. Ahmed T, Garrigo J, Danta I. Preventing bronchoconstriction in exercise-induced asthma with inhaled heparin. *N Engl J Med* 1993; 329:90-5.
129. Garrigo J, Danta I, Ahmed T. Time course of the protective effect of inhaled heparin on exercise-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1702-7.
130. Ahmed T, Gonzalez BJ, Danta I. Prevention of exercise-induced bronchoconstriction by inhaled low-molecular-weight heparin. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:576-81.
131. Fareed J, Walenga JM, Hoppensteadt D, Racanelli A, Coyne E. Chemical and biological heterogeneity in low molecular weight heparins: implications for clinical use and standardization. *Semin Thromb Hemost* 1989; 15:440-63.
132. Harenberg J, Stehle G, Augustin J, Zimmermann R. Comparative human pharmacology of low molecular weight heparins. *Semin Thromb Hemost* 1989; 15:414-23.
133. Molinari JF, Campo C, Shakir S, Ahmed T. Inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness by ultralow molecular-weight heparin. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:887-93.

- 
134. Ahmed T, Campo C, Abraham MK, Molinari JF, Abraham WM, Ashkin D, Syryste T et al. Inhibition of antigen-induced acute bronchoconstriction, airway hyperresponsiveness, and mast cell degranulation by a nonanticoagulant heparin- comparison with a low molecular weight heparin. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1848-55.
135. Ahmed T, Abraham M, D'Brot J. Effects of inhaled heparin on immunologic and nonimmunologic bronchoconstrictor responses in sheep. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:566-70.
136. Lucio J, D'Brot J, Guo C, Abraham WM, Lichtenstein LM, Kagei-Sobotka A et al. Immunologic mast cell-mediated responses and histamine release are attenuated by heparin. *J Appl Physiol* 1992; 73:1093-01.
137. Bowler SD, Smith SM, Lavercombe PS. Heparin inhibits the immediate response to antigen in the skin and lungs of allergic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:160-3.
138. Ahmed T, Syryste T, Lucio J, Abraham W, Robinson M, D'Brot J. Inhibition of antigen-induced airway and cutaneous responses by heparin: a pharmacodynamic study. *J Appl Physiol* 1993; 74: 1492-8.

- 
139. Abraham WM, Abraham MK, Ahmed T. Protective effect of heparin on immunologically induced tracheal smooth muscle contraction in vitro. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 110:79-84.
140. Ahmed T, Syriste T, Mendelsohn R, Sorace D, Mansour E, Lansing M et al. Heparin prevents antigen-induced airway hyperresponsiveness: interference with IP<sub>3</sub>-mediated mast cell degranulation? *J Appl Physiol* 1994; 76:893-901.
141. Ceyhan B, Celikel T. Effect of inhaled heparin on methacoline-induced bronchial hyperreactivity. *Chest* 1995;107:1009-12.
142. Diamant Z, Timmers MC, Van Der Veen H, Page CP, Van Der Meer FJ, Sterk PJ. Effects of inhaled heparin on allergen-induced early and late asthmatic responses in patients with atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1790-5.
143. Pavord I, Mudassar T, Bennet J, Wilding P, Knox A. The effect of inhaled heparin on bronchial reactivity to sodium metabisulphite and methacoline in patients with asthma. *Eur Respir J* 1996; 9:217-9.
144. Martinez-Salas J, Mendelsson R, Abraham WM, Hsiao B, Ahmed T. Inhibition of allergic airway responses by inhaled low-molecular-weight heparins: molecular-weight dependence. *J Appl Physiol* 1998; 84:222-8.

- 
145. Campo C, Molinari JF, Ungo J, Ahmed T: Molecular-weight-dependence effects of nonanticoagulant heparins on allergic airway responses. *J Appl Physiol* 1999; 86:549-7.
146. Tamaoki J, Kanemura T, Hori S et al. Relaxation of canine airway smooth muscle by the heparin preservative benzyl alcohol. *Am J Physiol* 1990; 258:355-60.



## ANEXO A - CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

**Estudo: Contribuição da heparina inalatória no estudo da asma induzida pelo exercício.**

**Descrição do estudo e objetivos:** Você está sendo convidado a participar de um estudo clínico experimental com um produto chamado heparina, indicado para o tratamento e prevenção de tromboembolismos. O objetivo do estudo é verificar a ação protetora dessa droga na asma induzida pelo exercício. Essa droga já foi utilizada em outros países, por via inalatória, em animais e humanos, mostrando eficiência e baixo índice de efeito adverso.

Caso você concorde em participar do estudo, você realizará oito testes de esforço com pré-tratamento com heparina, enoxaparina e placebo. Esse último será inalado num dispositivo idêntico ao utilizado para aerolizar as drogas, mas sem medicamento, e, por isso, sem efeito medicamentoso. Você será orientado e poderá usar outros medicamentos adequados ao seu caso, sempre que for necessário.

Durante o período do estudo, você virá uma vez por semana ao laboratório de função pulmonar. Em cada visita, você será examinado e seus sintomas serão avaliados, bem como fará uma espirometria simples antes de cada teste de exercício.

Amostras de sangue venoso serão coletadas pré e pós-exercício com o objetivo de dosar os mediadores inflamatórios envolvidos na asma induzida pelo exercício.

**Participação e interrupção:** Sua participação nesse estudo é voluntária; sendo assim, você pode se recusar a participar. Caso venha a aceitar esse convite, você poderá mudar de idéia a qualquer instante e interromper sua participação no estudo, sem ser penalizado de maneira alguma. Sua participação no estudo poderá ser interrompida pelo seu médico, se assim ele julgar melhor. Em qualquer um dos casos, você será convocado a fazer uma avaliação final na clínica e prosseguirá a ser tratado normalmente.

**Benefícios, riscos e confidencialidade:** Caso você aceite participar desse estudo, você poderá ser beneficiado com a melhora de seus sintomas (controle dos sintomas induzidos pelo exercício). Além disso, esse estudo

---

poderá servir de base para ampliar o conhecimento a respeito do mecanismo da asma induzida pelo exercício. Você receberá gratuitamente o medicamento do estudo.

Todo tratamento possui um risco potencial de causar efeitos colaterais. Se você apresentar qualquer efeito colateral, piora da sua asma ou alguma dúvida com relação ao seu tratamento, poderá entrar em contato com as médicas envolvidas no estudo, através do laboratório de função pulmonar do hospital São Lucas da PUCRS, pelo telefone 3203000, ramal 2753, ou comparecer imediatamente ao serviço de emergência do hospital.

Durante o estudo, você será informado de qualquer novidade sobre esse medicamento, mesmo que possa modificar sua vontade de participar do estudo.

Sua identidade será mantida confidencial.

**Declaro que li as informações que me foram transmitidas acima e concordo em participar do estudo:**

**Local e data:**

**Nome do paciente:**

**Assinatura do paciente:**

**Nome do pesquisador:**

**Testemunha (se necessário) :**