



Fisiopatologia da Asma Grave

Physiopathology of severe asthma

Ana Todo-Bom¹, Anabela Mota Pinto²

Resumo

A história natural da asma e as condições determinantes de evolução para formas moderadas ou graves não estão completamente estabelecidas. Contudo, quer os fatores genéticos quer os fatores ambientais serão determinantes na fisiopatologia e no prognóstico da doença. Nesta revisão são apresentados os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da asma grave

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2006; 29(3):113-116 asma, asma grave, fisiopatologia, citocinas, quimocinas

Abstract

The natural history of asthma and the determinant factors involved in its evolution from moderate to severe forms are not completely established. However, genetic and environmental factors will be determinant in asthma physiopathology and its prognosis. In this review are introduced the mechanisms involved in the physiopathology of severe asthma.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2006; 29(3):113-116 asthma, severe asthma, physiopathology, cytokines, chemokines

Introdução

A história natural da asma e as condições determinantes de evolução para formas moderadas ou graves não estão completamente estabelecidas. Contudo, quer os fatores genéticos quer os fatores ambientais serão determinantes na fisiopatologia e no prognóstico da doença. A asma é, por definição, uma doença inflamatória crônica das vias aéreas caracterizada por obstrução brônquica generalizada, mas variável que é pelo menos parcialmente reversível espontaneamente ou por intervenção farmacológica, e que está associada a aumento de reatividade a vários estímulos¹. Desse modo, são o grau de inflamação e de broncoespasmo, assim como a intensidade dos fenômenos de remodelamento que ocorrem nas vias aéreas que irão determinar a classificação da doença quanto à sua gravidade. Em todo este processo existe lesão de órgão prontamente reparada pela intervenção de mecanismos de defesa, reguladores da resposta em curso. É fundamentalmente dos equilíbrios dinâmicos que se vão estabelecendo neste cenário que deve ser situada a fisiopatologia da asma grave.

A patogênese da asma associa-se a mecanismos moleculares e celulares da inflamação das vias aéreas. Na asma alérgica essa inflamação é amplamente dependente da sensibilização pela IgE: No primeiro contato do alérgeno com o organismo, este é apresentado no contexto do Complexo Maior de Histocompatibilidade aos linfócitos T auxiliares (LT *helper* – Th) que sintetizam citocinas que, por sua vez, promovem a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos produtores de imunoglobulina E (IgE) específica ao alérgeno sensibilizante.

Posteriormente as IgEs produzidas irão ligar-se aos receptores de alta afinidade para a IgE, que se encontram na membrana celular de mastócitos e de basófilos, ricos em mediadores da inflamação. No segundo contato com o mesmo alérgeno com a submucosa, este liga-se a IgEs presentes na superfície dos mastócitos e basófilos, através

de uma reação antígeno-anticorpo, provocando a desgranulação destas células e a liberação de mediadores pré-formados (histamina) e derivados dos fosfolípidos de membrana (serotonina, leucotrienos, prostaglandinas), capazes de causar contração do músculo liso brônquico e inflamação da mucosa respiratória ou seja, provocar broncoespasmo e edema. Existe simultaneamente a ativação rápida dos macrófagos presentes nas vias aéreas e produção de espécies Reativas de Oxigênio (ROS). Os linfócitos Th₂, presentes na mucosa brônquica na asma, induzem a síntese de IgEs pelos plasmócitos, pela ação de citocinas como a interleucina (IL)-4 e a IL-13 e favorecem a diferenciação e ativação dos eosinófilos pela ação da IL-5. A intervenção do fator de crescimento GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) tem capacidade amplificadora sobre este efeito. A resposta tardia ocorre como consequência da regulação positiva de citocinas, quimocinas e de moléculas de adesão que motivam a ativação e o recrutamento de células inflamatórias, em particular dos linfócitos, basófilos e eosinófilos e ainda neutrófilos e macrófagos para o local onde ocorreu o contato. Os eosinófilos que infiltram a mucosa brônquica fixam também IgEs na sua membrana e respondem ao contato com o alérgeno libertando mediadores. O acúmulo de eosinófilos gera quimocinas pró-inflamatórias e enzimas citolíticas incluindo a proteína catiônica eosinofílica e a proteína básica principal que provocam ruptura da integridade do epitélio das vias aéreas. De fato três tipos celulares principais estão envolvidos no processo alérgico: eosinófilos, basófilos e linfócitos Th₂, aparecendo conseqüentemente como fundamentais a expressão dos receptores CCR3, CCR4 e CCR8 para quimotaxinas, eotaxinas e RANTES (*Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*).

As células epiteliais, endoteliais e os macrófagos são as principais fontes de eotaxinas, de RANTES e de *Monocyte Chemotactic Protein* (MCP3 e MCP4) pelo que intervêm definitivamente no processo alérgico²⁻⁴.

1. Assistente graduada em Imunoalergologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, Portugal

2. Professora de Patologia Geral da Faculdade de Medicina de Coimbra, Portugal

O epitélio brônquico desempenha duplo papel na imunopatogenia da asma. Por um lado, as células colunares são lesadas e destacam-se, originando o desnudamento epitelial que, abre caminho à penetração do alérgeno. E ao seu contato com células especializadas, células dendríticas. As células dendríticas captam o alérgeno e apresentam-no aos LTh2 e expõem fibras não-mielinizadas do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) que contém neuropeptídeos pró-inflamatórios, nomeadamente a Substância P (SP). Pode ainda ocorrer falência de metabolização de agonistas específicos destes receptores do SNA e das enzimas responsáveis pela degradação de neuropeptídeos. A SP tem ações pró-inflamatórias e na broncomotricidade que podem contribuir para as alterações nas vias aéreas dos asmáticos por terem capacidade de provocar a desgranulação dos mastócitos, por ativação direta nas proteínas G de membrana. Também os linfócitos e os macrófagos, expressam receptores para a SP que os pode estimular a produzir citocinas. Este fato, associado à capacidade que as células inflamatórias têm para produzirem SP pode conduzir a mecanismos de auto entretenimento do processo inflamatório. A ativação de células polimorfonucleares humanas pela substância P induz a produção de ROS, de IL-8 e liberação de mieloperoxidase⁵⁻⁸.

Por outro lado, as células epiteliais quando ativadas podem sintetizar diversos mediadores nomeadamente citocinas e fatores de crescimento biologicamente ativos. As células epiteliais são capazes de liberar quantidades importantes de óxido nítrico (NO) e de se comportar como células apresentadoras de antígenos. Outros tipos celulares envolvidos no processo inflamatório brônquico particularmente macrófagos, neutrófilos e eosinófilos produzem espécies reativas de oxigênio nos períodos de agudização, provocando um desequilíbrio no balanço oxidante/antioxidante que tende a persistir^{9,10}. O receptor da eotaxina CCR3 expresso em eosinófilos, basófilos e LTh2 além da função de atração para estes grupos celulares é também um potente activador do *burst* oxidativo. Para fazer face a estas agressões oxidativas as células estão equipadas com um extenso repertório de enzimas antioxidantes. Os antioxidantes enzimáticos, como a Superóxido Dismutase, a Glutaciona Peroxidase e a Catalase bem como os não enzimáticos como a Vitamina C, a Vitamina E e a Glutaciona reduzida terão papel fundamental na limitação da agressão provocada pelos radicais de oxigênio. A ação destes radicais sobre a membrana celular pode ser testemunhado pelo aumento dos níveis plasmáticos do malonildialdeído. Este balanço pode eventualmente ser comprometido no caso de ocorrer redução da capacidade antioxidativa, nomeadamente da capacidade antioxidante Total do Plasma, conforme tem sido observado em doentes com asma grave¹¹.

As células inflamatórias originadas na medula óssea, após maturação e diferenciação, são libertadas para a circulação e dirigem-se preferencialmente para as vias aéreas onde ocorre a resposta inflamatória.

A resposta tardia, fortemente condicionada pela ação das células inflamatórias e respectivos mediadores, está associada à congestão, produção de muco e hiperreatividade brônquica¹². As alterações ocorridas na microcirculação brônquica, com ruptura da parede vascular e transudação plasmática, acentuam o edema e o estreitamento das vias aéreas. O número e dimensão dos vasos sanguíneos também estão aumentados na asma.

Já existem evidências claras que confirmam a intervenção determinante dos linfócitos T particularmente da subpopulação Th2, quer na asma alérgica atópica quer na não atópica e na ocupacional. Está demonstrado que mesmo na asma não alérgica se observa na mucosa brônquica valores elevados de citocinas pró-eosinofílicas, nomeadamente de IL-5. Os mecanismos de inflamação mediados pela IgE podem ocorrer na ausência de padrões de hipersensibilidade

a aeroalérgenos reconhecido, sugerindo a existência de respostas mediadas por IgE a moléculas do indivíduo, em mecanismo semelhante ao que ocorre na doença autoimune e ainda a ocorrência de respostas a fatores infecciosos que contactam a mucosa respiratória¹³. A infecção pulmonar com Vírus Sincicial Respiratório (RSV) induz a expressão mRNA para a IgE e para os seus receptores, atinge pico de IgE sérica específica 21 dias após a infecção. Este vírus promove a desgranulação mastocitária das células sensibilizadas sendo reconhecido que a IgE específica para RSV contribui para a fisiopatologia da disfunção das vias aéreas. Do mesmo modo, a IgE específica para *Chlamydia pneumoniae* está presente na asma, particularmente em idade pediátrica¹⁴⁻¹⁶.

A permanência de células inflamatórias nas vias aéreas depende em parte de fatores que favoreçam a sua sobrevivência. A apoptose ou morte programada, tem por função limitar a lesão dos tecidos, promovendo a resolução da inflamação. Na asma alterações da regulação da apoptose pode condicionar sobrevida aumentada de células inflamatórias no brônquio, nomeadamente de linfócitos e de eosinófilos¹⁷. A inflamação asmática está claramente associada ao aumento das citocinas Th2 como a IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Fatores como IL-10, IL-18, IL-16 e a IL-21 serão produzidos no decurso do processo inflamatório concomitantemente com estes ou de forma sequencial numa tentativa de atenuar este processo inflamatório. Diferenciam-se aparentemente do interferon gama (INF γ) e das proteínas do surfactante presentes em áreas pulmonares não lesadas, regulando a inflamação de forma continuada mesmo em condições basais. A proteína surfactante A (SP-A) melhora funções do macrófago alveolar e tem reconhecida ação imunomoduladora na inflamação das vias aéreas e na proteção contra a broncoconstrição. Essa ação será exercida por supressão do Fator Nuclear kB (NF-kB), reconhecido como um ativador ubiquitário transcripcional dos genes imunes.

A IL-10 tem capacidade de modular a resposta inflamatória por diminuir a síntese de citocinas associadas aos fenótipos Th1 e Th2 como a IL1 β , *Tumor Necrosis Factor* (TNF α), IL-16, IL-12, GM-CSF, G-CSF, de quimocinas pró-inflamatórias como a IL-8, *Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha* (MIP 1 α), RANTES, eotaxina e ainda de enzimas como a *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS), ciclooxigenase tipo 2 (Cox-2) e a *Matrix Metalloproteinase-2* (MMP-2)¹⁸. A IL-10 parece ter também intervenção no controle da contração do músculo liso, por aumentar a expressão do fenótipo de regulação dos LT auxiliares (L Th/CD4+), que subseqüentemente sintetizam níveis elevados de IL-10.

A IL-16 é sintetizada por linfócitos T do tipo CD4+ e CD8+ em repouso, e por células epiteliais quando estimuladas em particular. Tem atividade quimiotática seletiva para os LT CD4+. O principal efeito da IL-16 nas vias aéreas é a frenagem da resposta inflamatória ao antígeno mediado por LTh2 (imunomodulação) conservando a capacidade de quimiotaxia para estas células. O receptor melhor estudado da IL-16 é o CD4 de linfócitos, eosinófilos, células dendríticas e de monócitos embora na sua ausência possa usar uma via alternativa de ativação. A magnitude da expressão de IL-16 no epitélio em resposta à estimulação antigênica correlaciona-se inversamente com a intensidade da inflamação. Na medida em que a IL-16 inibe a proliferação do linfócito T através do seu receptor (TCR), provoca a redução da produção de IL-4 e de IL-5 pelos linfócitos T sensibilizados. Com respeito ao INF γ a sua ação traduz-se em produção aumentada. De acordo com os dados disponíveis o perfil de citocinas segregadas por linfócitos submetidos à estimulação alérgica sob exposição a IL-16, é alterado sendo claramente promovido um perfil TH1, que limita a inflamação alérgica. Existe uma correlação íntima en-

tre o receptor CD4 e alguns receptores específicos de citocinas. Uma vez que o CCR5 é constitucionalmente associado ao receptor CD4, a estimulação por IL-16 das células T resulta na dessensibilização dos receptores CCR5 e CXCR4, afetando conseqüentemente a ação de quimocinas como a RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β e limitando a inflamação alérgica.

A IL-21, bem como o seu receptor IL-21R, está envolvida na promoção da atividade anti-tumoral do linfócito T e de células *Natural Killer*, desempenhando também ação muito importante na regulação das respostas do tipo Th2.

A proteína de células claras, *Clare cells* (CC16), secretada pelas células não ciliadas bronquiolares, tem ação de proteção contra o estresse oxidativo e inflamação modulando a produção e atividade de vários mediadores. Pode-se observar reduções do CC16 no LLBA após indução de inflamação, sugerindo que níveis reduzidos podem significar perda de atividade antiinflamatória e nas vias aéreas e para o aparecimento de inflamação na asma.

O *Transforming Growth Factor β* (TGF β) contribui para a inflamação das vias aéreas, para alterações estruturais do epitélio e submucosa e expressa-se por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e fibroblastos. Os seus níveis elevados correlacionam-se com hiperreatividade brônquica, inflamação, deposição de colágeno e fibrose sub-epitelial. Mais recentemente é, também, considerado um regulador negativo da inflamação das vias aéreas na asma. O TGF β secretado por linfócitos T CD4+ exercem um mecanismo de *feed back* negativo, eliminando a eosinofilia induzida por alérgeno.

As células CD4+CD25+ constituem cerca de 10% dos LT auxiliares (CD4+) totais. A presença do fator de transcrição Foxp3 afigura-se como essencial para a sua diferenciação em células T reguladoras. Estas células T reguladoras e as células Th3 (Células CD4+ que produzem TGF β) terão papel importante na regulação da asma, reduzindo a inflamação induzida por citocinas e na ativação celular imunitária. Estas células reguladoras terão uma intervenção que não se esgota na presença de alergia, sendo nestes doentes a ação de supressão preferencialmente dirigida às respostas Th1. Foi ainda observado que o fator de transcrição GATA3, associado à diferenciação Th2, ao contrário do fator de transcrição Th1 (T-bet), está fortemente expresso nas vias aéreas dos asmáticos¹⁹.

Quando os mecanismos de regulação falham ou estão alterados, o processo inflamatório e a broncoconstrição são mantidos e conseqüentemente as asma tendem a apresentar formas mais graves.

Os fatores etiológicos e desencadeantes subjacentes à asma terão também papel determinante na fisiopatologia e na evolução da doença. As crises graves de asma podem ser precipitadas por estímulos variados incluindo exposição a alérgenos, infecções e poluentes. O grau de exposição a poluentes ambientais bem como a temperaturas extremas, a existência de co-morbidades, a recorrência prévia a serviços de urgência, o estresse físico e psíquico e o estado imunitário e idade são condições importantes no prognóstico da doença. A *Alternaria alternata* é considerada um alérgeno importante em muitas comunidades. A sensibilização a este fungo é importante fator de risco para o desenvolvimento de asma grave potencialmente fatal nos picos da estação da *Alternaria*^{20,21}.

A agressão continuada exige processos de reparação repetidos. De novo é atribuído às células epiteliais um papel importante nesses processos de reparação tecidual. As proteínas da matrix extracelular, incluindo a fibronectina terão uma intervenção nessa reparação. Existem quantidades aumentadas de colágeno do tipo III e do tipo V, de fibronectina e de tenascina depositados debaixo do epitélio brônquico nos asmáticos. Estas proteínas estruturais são diferentes das proteínas típicas da membrana basal. Não

se trata, por isso, de um verdadeiro espessamento de membrana, mas sim de um depósito abaixo dessa membrana. Estas alterações, presentes nas vias aéreas dos asmáticos e indicativas de gravidade, só eram susceptíveis de serem observadas em autópsias. Presentemente a broncofibroscopia permite testemunhar que o brônquio do asmático se apresenta hiperemiado e edemaciado, aspectos típicos de processo inflamatório em curso. A celularidade do lavado broncoalveolar (LBA) e os estudos histológicos de biópsias brônquicas revelam a presença de mastócitos, linfócitos, eosinófilos e ainda de macrófagos ativado²². Aliás, a presença de número elevado de linfócitos CD4 no LBA é um sinal de gravidade para a asma, tal como o é a presença de LT ativado nas biópsias brônquicas²³.

Assim, os diversos meios auxiliares de diagnóstico disponíveis revelam a ocorrência de infiltrado de células inflamatórias ativadas presente nas fases precoces da doença e remodelamento das vias aéreas na fase crônica, embora os dois processos possam ocorrer simultaneamente em localizações diferentes do brônquio. O TGF β intervém no remodelamento das vias aéreas, embora a ligação mais direta entre a resposta T específica ao alérgeno em fase aguda e a remodelação crônica das vias aéreas seja feita preferencialmente pela Activina A²⁴. A lesão das células epiteliais brônquicas conduz também à produção de mediadores capazes de ativar os fibroblastos que, em resposta a outros mediadores dos mastócitos, proliferam e sintetizam colágeno levando assim à fibrose sub-epitelial. Para além dessa proliferação, algumas citocinas e mediadores produzidos por células estruturais levam à diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, que contribuem para o espessamento da membrana basal sub-epitelial, característico da asma crônica estando a fibrose sub-epitelial particularmente correlacionada com o grau de hiperreatividade brônquica a estímulos inespecíficos. A remodelação da mucosa brônquica, com deposição de colágeno, proliferação de fibroblastos e miofibroblastos, pode contribuir para a persistência da obstrução brônquica na asma. A hiperplasia e a hipertrofia do músculo liso brônquico estão intimamente associados aos fenômenos de espessamento da parede brônquica associado ao processo de remodelamento. Este espessamento, que tem tradução imaginológica em tomografia axial computadorizada de alta resolução, persiste inalterado nos estudos de imagem, mesmo com tratamento antiinflamatório direcionado, mesmo que este se revele capaz de reverter parcialmente os valores reduzidos de função ventilatória e restituir para a normalidade os valores de óxido nítrico no ar exalado. Estas alterações são mais acentuadas em formas de asma grave comparativamente a formas moderadas da doença²⁵⁻²⁷.

Referências

1. National Heart, Lung and Blood Institute. New NHLBI guidelines for the diagnosis and management of asthma. Lippincott Health Promot Lett 1997;2:8-9.
2. Wenzel S. Severe asthma in adults. Am J Respir Crit Care Med 2005; 172:149-160.
3. Schuh J, Blease K, Kunkel S, Hogaboam C. Chemokines and cytokines: axis and allies in asthma and allergy. Cytokine & growth factor Reviews 2003; 14:503-510.
4. Bousquet J, Jeffery P, Busse W, Johnson M, Vignola A. Am J Respir Crit Care Med 2000; 176:1720-1745.
5. Van der Kleij HPM, Kraneveld AD, Redegeld FAM, Gerard NP, Morteau O, Nijkamp FP. The tachykinin NK1 receptor is crucial for the development of non-atopic airway inflammation and hyperresponsiveness. Eur J Pharmacol 2003; 476:249-255.
6. Black PH. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. Brain, behaviour and Immunity 2002; 16:622-653.
7. Springer J, Groneberg DA, Pregla R, Fischer A. Inflammatory cells as source of tachykinin-induced mucus secretion in chronic bronchitis. Regul Pept 2005; 124:195-201.

8. Chu HW, Kraft M, Krause JE, Rex MD, Martin RJ. Substance P and its receptor neurokinin 1 expression in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:713-722.
9. Springer J, Pleimes D, Scholz FR, Fischer A. Substance P mediates AP-1 induction in A549 cells via reactive oxygen species. *Regul Pept* 2005; 124:99-103.
10. Henderson Jr WR, Chi EY, Teo JL, Nguyen C, Kahn M. A small molecule inhibitor of redox-regulated NF-kappa B and activatorprotein-1 transcription blocks allergic airway inflammation in a mouse asthma model. *J Immunol* 2002; 169:5294-9.
11. Todo Bom A, Proença T. O Sistema Antioxidante na Asma Brônquica: Condicionais do Processo de Envelhecimento. *Rev Port Imunoalergol* 2003; XI: 17-29
12. Pearlman DS. Pathophysiology of the inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:S132-S137.
13. Kay AB. The role of T lymphocytes in asthma. *Chem Immunol Allergy* 2006; 91:59-75.
14. Dakhama A, Park JW, Taube C, Chayama K, Balhorn A, Joetham A et al. The role of virus-specific immunoglobulin E in airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:952-9
15. Sutherland ER, Brandorff JM, Martin RJ. Atypical bacterial pneumonia and asthma risk. *J Asthma* 2004; 41:863-8.
16. Epton MJ, Hales BJ, Thompson PJ, Thomas WR. T cell cytokine responses to outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* and the house dust mite allergens Der p 1 in allergic and non-allergic subjects. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:1589-95
17. Ying S, Khan LN, Meng Q, Barnes NC, Kay AB. Cyclosporin A, apoptosis of BAL T-cells and expression of Bcl-2 in asthmatics. *Eur Respir J* 2003; 22:207-12.
18. Naclerio RM. Allergic rhinitis. *N Engl J Med* 1991; 325:860-9.
19. Karagiannidis C, Hense G, Martin C, Epstein M, Ruckert B, Mantel PY et al. Activin A is an acute allergen-responsive cytokine and provides a link to TGF-beta-mediated airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:111-8.
20. Saarinen K, Karjalainen A, Martikainen R, Uitti J, Tammilehto L, Klaukka T et al. Prevalence of work-aggravated symptoms in clinically established asthma. *Eur Respir J*. 2003; 22:305-9.
21. Bush RK, Prochnau JJ. *Alternaria*-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:227-34.
22. Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. In: Barnes PJ et al. (eds) *Asthma, Basic Mechanisms and Clinical Management*. 3rd ed, London, Academic Press, 1998; 487-506.
23. Goleva E, Dunlap A, Leung DY. Differential control of TH1 versus TH2 cell responses by the combination of low-dose steroids with beta2-adrenergic agonists. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:183-91.
24. Blaser K, Schmidt-Weber CB. Activin A is an acute allergen-responsive cytokine and provides a link to TGF-beta-mediated airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:111-8.
25. Ketaj L, Harkins M, Fiato KL, Iwamoto GK. Exhaled nitric oxide and bronchial wall thickening in asthmatics during and after acute exacerbation: evidence of bronchial wall remodeling. *J Asthma* 2005; 42:667-71.
26. Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P et al. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:544-9.
27. de Blic J, Tillie-Leblond I, Emond S, Mahut B, Dang Duy TL, Scheinmann P. High-resolution computed tomography scan and airway remodeling in children with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:750-4.

Correspondência
 Dra. Ana Todo-Bom.
 Serviço de Alergologia
 Hospitais da Universidade de Coimbra. PT
 Praceta Mota Pinto
 3000-075 - Coimbra - Portugal