

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

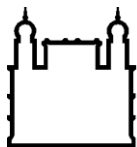
**Efeito do extrato etanólico e frações de  
*Nidularium procerum* Lindman sobre a  
resposta alérgica pulmonar em  
camundongos.**

**Alessandra Mendonça Siqueira**

**Orientador:** Prof. Dr.: Valber da Silva Frutuoso

RIO DE JANEIRO

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Alessandra Mendonça Siqueira**

**Efeito do extrato etanólico e frações de *Nidularium procerum* Lindman sobre a resposta alérgica pulmonar em camundongos.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Biologia Celular e Molecular.

**Orientador:** Prof. Dr.: Valber da Silva Frutuoso

**RIO DE JANEIRO**

2013

ii

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S618 Siqueira, Alessandra Mendonça

Efeito do extrato etanólico e frações de *Nidularium procerum* Lindman sobre a resposta alérgica pulmonar em camundongos / Alessandra Mendonça Siqueira. – Rio de Janeiro, 2013.

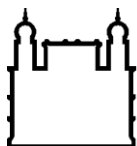
xxiii, 151 f.: il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2013.

Bibliografia: f. 129-151

1. Asthma. 2. Inflamação alérgica pulmonar. 3. *Nidularium procerum*. 4. Produtos naturais. I. Título.

CDD 616.238



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Alessandra Mendonça Siqueira**

**Efeito do extrato etanólico e frações de *Nidularium procerum* Lindman sobre a resposta alérgica pulmonar em camundongos.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr.: Valber da Silva Frutuoso**

**Aprovada em: 26/08/2013**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra.:** Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins

**Prof. Dra.:** Christianne Bandeira de Melo

**Prof. Dra.:** Edna Alves dos Anjos Valotta

**Prof. Dra.:** Carmen Penido Monteiro (revisora e suplente)

**Prof. Dra.:** Monica Farah Pereira (suplente)

Rio de Janeiro, 26 de agosto de 2013.

## Agradecimentos

Á Deus, por tudo que representa na minha vida, pela força nos momentos que eu pensei em desistir e pela sua proteção.

A minha família: aos meus pais e irmãos, pelo apoio, nessa minha jornada. Não tenho palavras para agradecer tudo que vocês fizeram e ainda fazem por mim. Ao meu marido, pelo apóio e paciência. Amo muito todos vocês.

Ao meu orientador Dr. Valber da Silva Frutuoso por me permitir realizar esta tese pela confiança e imensa paciência.

Ao Dr. Hugo Castro de Faria-Neto e á Dra. Patrícia Torres Bozza, por terem me permitindo ingressar no laboratório e realizar este trabalho.

A todos os componentes do laboratório de imunofarmacologia, em especial a galera dos produtos naturais pelas dicas e pela ajuda preciosa durante este trabalho, Diogo Dibo do Nascimento, Andrea Surrage, Cristiane Zanon, Julliana Azevedo, Nathália Costa, Ana Karina Furtado, Diego Mendes. Vou sentir falta da companhia e das gordices.

A Dra. Maria Raquel Figueiredo e a Ms. Cristiane Cardoso dos Santos e Flávia da Cunha Camillo do laboratório de produtos naturais três, em Farmanguinhos pela colaboração e fornecimento dos extratos de *Nidularium procerum*. Muito obrigada.

Ao laboratório de inflamação pelas dicas com os experimentos, por prontamente esclarecem muitas dúvidas que tive. Em especial, Dra. Priscila Olsen, Dra. Tatiana Paula Teixeira Ferreira, Rafaele Rodrigues de Almeida, Daiana Cristina Oliveira dos Santos, Ana Carolina Santos de Arantes, Dr. Vinicius de Frias Carvalho, Dr. Marco Aurélio Martins e Dra. Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins.

A Dra. Christianne Bandeira de Melo, Dra. Tatiana Luna e Rafaele Samico pelos experimentos com os eosinófilos. Obrigado pela pronta ajuda e por eu ter aprendido muito com vocês.

A Dra. Marcia Oliveira pelos experimentos com os mastócitos, obrigada por compartilhar seus conhecimentos e pela simpatia.

Aos meus amigos pela força, carinho e companheirismo.

A pós-graduação de Biologia Celular e Molecular, pelo ensino e apoio. A secretária Daniele Lobato e ao coordenador Dra. Leila Mendonça Lima pela competência com relação aos alunos.

A CAPES, FINEP, CNPq, Fiocruz e as instituições de fomento pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que colaboraram direta e indiretamente para esse trabalho.

Que Deus abençoe a todos vocês, e mais uma vez muito obrigada!!!!

Um ao outro ajudou, e ao seu companheiro disse: Esforça-te. Isaías 41:6.

**“Os planos fracassam por falta de conselho, mas  
são bem-sucedidos quando há muitos  
conselheiros.”**

**Provérbios 15:22**

## Lista de tabelas

		Página
Tabela 1	Classificação taxonômica de <i>Nidularium procerum</i> .	17
Tabela 2	Grupos de animais para o tratamento oral.	25
Tabela 3	Grupos de animais para o tratamento via areolização.	26
Tabela 4	Quantidade de endotoxina nos extratos/subfrações.	69
Tabela 5	Resumo do efeito do extrato/subfrações nos experimentos <i>in vitro</i> .	90



## Lista de figuras

	Página
Figura 1	Quadro ilustrativo do manejo da asma. 9
Figura 2	Distribuição geográfica da família Bromeliaceae. 16
Figura 3	Distribuição geográfica do gênero <i>Nidularium</i> no Brasil. 17
Figura 4	<i>Nidularium procerum</i> . 17
Figura 5	Esquema de protocolo e análises no modelo de inflamação alérgica pulmonar. 23
Figura 6	Esquema de protocolo e análises no modelo de Inflamação Alérgica Pulmonar, asma estabelecida, caracterização. 24
Figura 7	Esquema de protocolo e análises no modelo de Inflamação Alérgica Pulmonar, asma estabelecida, caracterização e tratamento. 24
Figura 8	Esquema de protocolo e análises no modelo de Inflamação Alérgica Pulmonar Crônica. 25
Figura 9	Esquema de protocolo e análises do cultivo de esplenócitos. 31
Figura 10	Esquema de protocolo e análises do cultivo de mastócitos. 32
Figura 11	Esquema de protocolo e análises do cultivo de eosinófilos. 34
Figura 12	Efeito de NpEt sobre a celularidade no lavado bronco alveolar (BAL) de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica. 39
Figura 13	Efeito do tratamento com NpEt sobre o acúmulo de proteínas no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica. 40
Figura 14	Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica (coloração com H&E). 41
Figura 15	Análise do infiltrado peribronquiolar nos pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica (coloração com H&E). 42
Figura 16	Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica (coloração com PAS). 43
Figura 17	Análise da produção de muco em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica (coloração com PAS). 43

Figura 18	Efeito do tratamento com NpEt sobre a hiperreatividade brônquica em camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, através do sistema de BUXCO invasivo.	44
Figura 19	Efeito de NpEt sobre a celularidade na medula de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica.	45
Figura 20	Efeito de NpEt sobre a celularidade no sangue de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica.	46
Figura 21	Efeito de NpEt sobre da liberação de IgE no soro de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica.	47
Figura22	Análise da celularidade no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, após três dias de aerolização.	48
Figura 23	Análise do acúmulo de proteínas no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, após três dias de aerolização.	49
Figura 24	Análise de EPO no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, após três dias de aerolização.	49
Figura 25	Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica por coloração com H&E, após três dias de aerolização.	50
Figura 26	Análise do infiltrado celular nos pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica por coloração com H&E, após três dias de aerolização.	50
Figura 27	Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica por coloração com PAS, após três dias de aerolização.	51
Figura 28	Análise da produção de muco em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica por coloração com PAS, após três dias de aerolização.	51
Figura 29	Análise da liberação de citocinas e da quimiocina RANTES no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, após três dias de aerolização.	53
Figura 30	Análise da liberação de eotaxina, CisLt e PGD <sub>2</sub> no BAL em camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar, após	54

	três dias de aerolização.	
Figura 31	Análise da celularidade na medula de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, após três dias de aerolização.	55
Figura 32	Análise da celularidade no sangue de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, após três dias de aerolização.	55
Figura 33	Análise hiperreatividade brônquica em camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar, através do sistema de BUXCO não invasivo, após três dias de aerolização.	56
Figura 34	Análise da liberação de IgE no soro de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, após três dias de aerolização.	56
Figura 35	Efeito de NpEt sobre a celularidade no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica de camundongos e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x).	58
Figura 36	Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com H&E).	59
Figura 37	Análise do infiltrado peribronquiolar em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com H&E).	60
Figura 38	Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com PAS).	61
Figura 39	Análise da produção de muco em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com PAS).	61
Figura 40	Efeito de NpEt sobre a celularidade no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica de camundongos e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis	62

	dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h (1x) e 8h (2x) após (6x).	
Figura 41	Efeito de NpEt sobre a liberação de EPO no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h (1x) e 8h (2x) após (6x).	62
Figura 42	Efeito de NpEt sobre a celularidade no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x).	64
Figura 43	Efeito de NpEt sobre a liberação de EPO no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x).	64
Figura 44	Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com H&E).	65
Figura 45	Análise do infiltrado peribronquiolar nos pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com H&E).	66
Figura 46	Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com PAS).	67
Figura 47	Análise da produção de muco em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com PAS).	67
Figura 48	Efeito de NpEt sobre a celularidade no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica de e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após por aerolização (6x).	68
Figura 49	Perfil Químico por HPLC do Extrato Etanólico de <i>Nidularium procerum</i> e frações.	70

Figura 50	Avaliação do efeito citotóxico de NpEt e subfrações sobre os esplenócitos pelo método de MTT.	72
Figura 51	Avaliação do efeito citotóxico de NpEt e subfrações sobre os esplenócitos estimulados com OVA pelo método de MTT.	74
Figura 52	Efeito de NpEt e subfrações sobre a contagem de esplenócitos estimulados com OVA.	75
Figura 53	Análise citofluorimétrica do efeito de NpEt/Subfrações sobre os esplenócitos estimulados com OVA.	76
Figura 54	Efeito de NpEt e subfrações sobre o número relativo de esplenócitos estimulados com OVA.	77
Figura 55	Efeito de NpEt e subfrações sobre a contagem de esplenócitos estimulados com OVA.	78
Figura 56	Análise citofluorimétrica do efeito de NpEt/Subfrações sobre os esplenócitos estimulados com OVA.	79 e 80
Figura 57	Efeito de NpEt e subfrações sobre o número relativo de esplenócitos estimulados com OVA.	81
Figura 58	Efeito de NpEt e subfrações sobre a liberação de citocinas de esplenócitos estimulados com OVA.	83
Figura 59	Avaliação do efeito citotóxico de NpEt e subfrações sobre as células HMC-1 pelo método de MTT.	84
Figura 60	Efeito de NpEt e subfrações sobre a liberação de citocinas das células HMC-1 estimulados com A23187 e PMA.	85
Figura 61	Efeito de NpEt e subfrações sobre a expressão de COX2 nas células HMC-1 estimulados com A23187 e PMA pelo método de <i>western blotting</i> .	86
Figura 62	Efeito de NpEt e subfrações sobre na formação de corpúsculos em eosinófilos estimulados com eotaxina.	87
Figura 63	Análise citofluorimétrica de eosinófilos tratados por 1h e 30 min com NpEt e subfrações.	88
Figura 64	Avaliação do efeito citotóxico de NpEt e subfrações sobre as células HepG2 pelo método de MTT.	89
Figura 65	Efeito de NpEtFAe sobre a celularidade no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados	92

	partir do 4º dia de desafio 1h após (6x).	
Figura 66	Efeito de NpEtFAe sobre a liberação de EPO no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x).	93
Figura 67	Efeito de NpEtFAe sobre a liberação de citocinas no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x).	94
Figura 68	Efeito de NpEtFAe sobre a liberação de eotaxina e PGD <sub>2</sub> nos pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por 3 dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x).	95
Figura 69	Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com H&E).	96
Figura 70	Análise do infiltrado peribronquiolar nos pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com H&E).	97
Figura 71	Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica aerolizados e por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com PAS).	98
Figura 72	Análise da produção de muco em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica aerolizados e por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com PAS).	98
Figura 73	Análise hiperreatividade brônquica em camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar, através do sistema de BUXCO invasivo. Camundongos foram aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x).	99
Figura 74	Efeito de NpEtFAe sobre a celularidade na medula de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e	100

	aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x).	
Figura 75	Efeito de NpEtFAe sobre a celularidade no sangue de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por 3 dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x).	101
Figura 76	Efeito de NpEtFAe sobre da liberação de IgE no soro de camundongos submetidos ao modelo inflamação pulmonar alérgica de camundongos e por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x).	101
Figura 77	Análise da celularidade no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica, após três dias de instilação.	103
Figura 78	Efeito de NpEtFAe sobre a celularidade no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica.	104
Figura 79	Efeito de NpEtFAe sobre o peso corporal de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica.	105
Figura 80	Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica (por coloração de H&E).	106
Figura 81	Análise do infiltrado peribronquiolar nos pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica (por coloração de H&E).	107
Figura 82	Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica (coloração com PAS).	108
Figura 83	Análise da produção de muco em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica (coloração com PAS).	108
Figura 84	Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica (coloração de picrossírius).	109
Figura 85	Análise da deposição de colágeno em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica.	110

(coloração de picrossírius).

Figura 86 Análise hiperreatividade brônquica em camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar crônica, através do sistema de BUXCO invasivo. 111

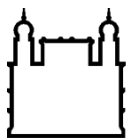


## Lista de siglas e abreviaturas

IL-5R $\alpha$	Subunidade $\alpha$ do receptor de interleucina 5
5-Lo	5-Lipoxigenase
AAS	Ácido acetil salicílico
Ag	Antígeno
AHR	Hiperreatividade das vias aéreas
Al(OH) <sub>3</sub>	Hidróxido de alumínio
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMT	3-amino-1,2,4-triazol
LFA 1	Antígeno 1 associado à função linfocítica
CTLA 4	Antígeno 4 de linfócito T citotóxico
AP-1	Ativador de proteína 1
APC	Células apresentadoras de antígeno
ARM	Atividade redutora mitocondrial
BAL	Lavado broncoalveolar
CCL	Ligante de quimiocinas da família CC
CCR	Receptores de quimiocinas
CD	<i>Cluster Designation</i> , que seguido de um número, determina diferentes moléculas ou arranjo das mesmas na superfície das células
CisLT	Leucotrienos cisteinados
CisLTR1	Receptor 1 de leucotrienos cisteinados
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
C3a	Componente do complemento 3a
COX <sub>2</sub>	Ciclooxigenase 2
cpm	Contagem por minuto
DC	Células dendríticas
Dexa	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPM	Desvio padrão da média
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ECP	Proteína catiônica eosinofílica

ED <sub>50</sub>	Dose que produz efeito terapêutico em 50% dos indivíduos
EDN	Neurotoxina derivada de eosinófilo
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELISA	Ensaio imunoenzimático indireto
EPO	Peroxidase eosinofílica
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade
FLAP	Proteína de ativação de 5-lipoxigenase
fMLP	Formil-Metionina-Leucina-Fenilalanina
Fox P3	"Forkhead box" P3
GATA	Proteína 3 que se liga a sequência genética "GATA"
GM-CSF	Fator de estimulação de colônia granulócito/macrófago
H	Receptores de histamina
i. p.	Via intraperitoneal
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IRF	Fator de regulação 1 de interferon
LABA	Agonistas de receptor β <sub>2</sub> de vida longa
LAL	Lisado de amebócitos do limulus
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
mA	Mili ampére
MBP	Proteína básica maior
MCP	Proteína quimioatratora de monócito
MDC	Quimiocina derivada de macrófago
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MTT	Brometo 3(4,5- dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NET	Armadilha extracelular neutrofilica
NF-κB	Fator nuclear κB
NK	Células matadoras naturais, do inglês "natural killers"
NpEt	Extrato etanólico de folhas de <i>Nidularium procerum</i>
OPD	Dicloridrato de o-fenilenodiamina

OMS	Organização mundial da saúde
OVA	Ovoalbumina
PAF	Fator de ativação de plaqueta
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PDE	Fosfodiesterase
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PKA	Proteína quinase A
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
RANTES	“Regulated on activation, normal T expressed and secreted”
ROR	Receptores órfãos relacionados ao ácido retinóico
rpm	Rotações por minuto
SABA	Agonistas de receptor β <sub>2</sub> de vida curta
SCF	Fator de célula embrionária
SCIT	Imunoterapia subcutânea
SIGLEC	Lectina semelhante à imunoglobulina ligante de ácido siálico
SIT	Imunoterapia alérgeno específico
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
SUS	Sistema único de saúde
TARC	Quimiocina ativada e regulada pelo timo
TBS	Tampão contendo tris-HCl.
TGF-β	Fator β de crescimento e transformação
T <sub>h</sub>	Células T ajudantes, do inglês "helper"
TMB	3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TR	Tempo de retenção
T <sub>reg</sub>	Células T regulatórias
Tris-HCl	Hidrocloreto de (hidroximetil) aminometano
TSLP	Linfopoetina tímica estromal
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
TXS <sub>1</sub>	Tromboxano sintase
VCAM	Moléculas de adesão a células vasculares



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

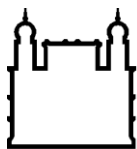
Efeito do extrato etanólico e frações de *Nidularium procerum* Lindman sobre a resposta alérgica.

### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO

#### Alessandra Mendonça Siqueira

A asma é uma desordem de caráter alérgico que vem atingindo muitas pessoas por todo mundo. Embora existam muitos tratamentos para essa doença, novas terapias são necessárias, pois muitos dos tratamentos típicos causam efeitos colaterais para o paciente. *Nidularium procerum* (Np) é uma Bromeliaceae, encontrada principalmente no estado do Rio de Janeiro. Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que as folhas de Np, possuem atividade antialérgica, anti-inflamatória e antinociceptiva. No modelo de inflamação alérgica pulmonar, o extrato etanólico de *N. procerum* (NpEt) se mostrou eficiente em inibir a migração de eosinófilos para os pulmões em 58 % na dose de 1 mg/kg. Para verificar a real eficácia do extrato testamos esta dose no modelo de asma estabelecida. Após a instalação da doença, o tratamento (uma ou duas vezes ao dia) com NpEt, via oral, nas doses de 1 e 10 mg/kg não inibiu a migração de eosinófilos. O tratamento via aerolização com NpEt também não foi eficaz. Ao aumentarmos a dose para 100 e 500 mg/kg, observamos tendência de inibição da migração de eosinófilos, porém com pouca eficácia. Por isso, NpEt foi fracionado com solventes em doses crescentes de polaridade dando origem as frações hexânica (NpEtFH), diclorometânica (NpEtFHD), acetato de etila (NpEtFAe), butanólica (NpEtFB) e aquosa (NpEtFAq). Foram realizados experimentos *in vitro* com linfócitos T, mastócitos e eosinófilos. As frações NpEtFB e NpEtFAq não apresentaram efeito sobre os linfócitos T. NpEtFD inibiu todas as características estudadas, porém devido á sua toxicidade, conforme demonstrado no ensaio de apoptose. NpEtFAe foi a que inibiu a proliferação e liberação de citocinas, sem toxicidade. NpEt não impediu a proliferação destas células, mas modulou a liberação de IFN- $\gamma$ . Com relação aos mastócitos, os extratos/subfrações não foram tóxicos para estas células, algumas frações modularam negativamente a liberação de IL-8, e todos inibiram a expressão de COX2, após 8h de cultura. Analisando os eosinófilos, observamos que todos foram capazes de inibir, nas doses de 10  $\mu$ g/mL e/ou 50  $\mu$ g/mL, a produção de corpúsculos lipídicos sem toxicidade. Visto que a subfração NpEtFAe foi a que modulou negativamente todas as células analisadas, testamos sua eficácia no modelo de asma estabelecida. Observamos que NpEtFAe foi capaz de inibir a migração de eosinófilos e a liberação de IgE, entretanto, NpEtFAe não interviu na hiperreatividade. Como NpEtFAe foi eficaz de impedir algumas das características da asma, mesmo com a mesma já instalada, testamos a mesma no modelo de asma crônica. O tratamento com NpEtFAe causou redução do número de eosinófilos (não foi significativo devido ao baixo número de animais), sem efeito na hiperreatividade, o que indica que outros experimentos são necessários, para melhor caracterização dos resultados. Com estes dados sugerimos que a fração NpEtFAe pode ser uma boa alternativa terapêutica para o controle da asma.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Efeito do extrato etanólico e frações de *Nidularium procerum* Lindman sobre a resposta alérgica.

### **ABSTRACT**

#### **TESE DE DOUTORADO**

**Alessandra Mendonça Siqueira**

Asthma is an allergic disorder that has incidence worldwide. Although many treatments are available, new therapies are necessary, because most of them cause strong side-effects to the patients. *Nidularium procerum* (Np) is a Bromeliaceae, localized mainly in Rio de Janeiro state. Studies performed in our laboratory demonstrated that treatment with Np leaves in mice, inhibited allergy, inflammation and nociception. In the model of murine allergic inflammation, the ethanol extract of *N. procerum* leaves (NpEt), v. o., was effective in inhibiting eosinophils migration to the lungs in 58 % at a dose of 1 mg/kg. To determine the true efficacy of the extract, we tested this dose in a model of established asthma. NpEt treatment with doses of 1 and 10 mg/kg (one or twice daily), after the onset of the disease, had no effect on eosinophil migration, the treatment with aerosolization were not effective either. Increasing the dose to 100 and 500 mg/kg resulted in an indication of inhibition, but with low efficiency. So, NpEt was fractionated using solvents of increasing polarity giving hexane (NpEtFH), dichloromethane (NpEtFD), ethyl acetate (NpEtFAe), butane (NpEtFB) and aqueous (NpEtFAq) fractions. *In vitro* experiments were performed with T lymphocytes, mast cells and eosinophils. NpEtFB and NpEtFAq did not have effect on lymphocytes. NpEtFD inhibited all the studied aspects but due to its toxicity, demonstrated by apoptosis assay. NpEtFAe was the one which inhibited the proliferation and cytokine release, without toxicity. NpEt did not impair T cell proliferation, but it modulated negatively the release of IFN- $\gamma$ . Regarding to mast cells, neither the extract nor the fractions was toxic, some of them modulated IL-8 release and all inhibited the expression of COX2 in a 8-hour culture. Analyzing eosinophils, we found that all fractions were able to inhibit lipid bodies production at 10  $\mu\text{g/mL}$  and/or 50  $\mu\text{g/mL}$ . Since NpEtFAe negatively modulated all the cells tested, we verified its efficacy in the model of established asthma. We observed that NpEtFAe was able to inhibit the migration of eosinophils and the release of IgE significantly, however, NpEtFAe did not interfere in hyperreactivity. As NpEtFAe was effective to prevent some asthma features, even in the established asthma, we tested it in the model of chronic asthma. NpEtFAe treatment decreased eosinophils number in the lungs (it was no significant due to animal number) and it had no effect on hyperreactivity. Other experiments are necessary to better elucidate the results. With this data, we suggest the NpEtFAe, can be a good alternative to asthma treatment.

# Índice

	Página
1- Introdução	1
1.1 - Alergia	1
1.2 - Tratamento da Asma	9
1.3 - Plantas medicinais	12
1.4 - Metabólitos de plantas	14
1.5 - Bromeliaceae	15
1.5.1 - <i>Nidularium</i>	16
1.5.1.1 - <i>Nidularum procerum</i>	17
2 - Objetivos	20
2.1 - Objetivos gerais	20
2.2 - Objetivos específicos	20
3 - Métodos	21
3.1 - Animais	21
3.2 - Preparo do extrato etanólico e subfrações	21
3.3 - Análise cromatográfica	22
3.4 - Estudos <i>in vivo</i>	22
3.4.1 – Inflamação alérgica pulmonar	22
3.4.2 - Inflamação alérgica pulmonar, doença estabelecida	23
3.4.3 – Inflamação alérgica pulmonar crônica	24
3.4.4 – Tratamentos e análises	25
3.4.5 – Contagem de leucócitos	26
3.4.6 – Dosagem de proteína	27
3.4.7 – Dosagem de EPO	27
3.4.8- Análise da hiperreatividade brônquica	27
3.4.9 – Sobrenadante pulmonar	28
3.9.10 – Análise histológica	28
3.5 – Estudos <i>in vitro</i>	29
3.5.1 – Obtenção de esplenócitos	29
3.5.2 - Ensaio de citotoxicidade, apoptose e ciclo celular de esplenócitos	29
3.5.3 - Ativação de mastócitos	31
3.5.4 - Western blotting	32

3.5.5 – Cultura de eosinófilos	33
3.5.6 – Análise da ativação dos eosinófilos	33
3.5.7 – Coloração e contagem de corpúsculo lipídico	34
3.5.8 – Cultura de HepG2	34
3.6 – Dosagem de mediadores inflamatórios	35
3.6.1 - ELISA	35
3.6.2 – Dosagem de IgE total	35
3.6.3 – Dosagem de Eotaxina/CCL11	36
3.6.4 – Dosagem de CisLt e PGD <sub>2</sub>	36
3.7 - Análise Estatística	37
4 - Resultados	38
4.1- Inflamação alérgica pulmonar: curva dose resposta de NpEt	38
4.2 - Inflamação alérgica pulmonar: caracterização da asma estabelecida	47
4.3- Experimentos <i>in vitro</i> : efeito de NpEt/subfrações sobre a ativação de linfócitos T	68
4.4- Experimentos <i>in vitro</i> : efeito de NpEt/subfrações sobre a ativação de mastócitos	84
4.5- Experimentos <i>in vitro</i> : efeito de NpEt/subfrações sobre a ativação de eosinófilos	86
4.6- Experimentos <i>in vitro</i> : efeito de NpEt/subfrações sobre hepatócitos	89
4.7 - Inflamação alérgica pulmonar, asma estabelecida: Análise do efeito da subfração NpEtFAe	91
4.8 - Inflamação alérgica pulmonar crônica: Análise do efeito da subfração NpEtFAe	102
5 - Discussão	112
6 - Conclusões	128
7 - Referências Bibliográficas	129

# 1- Introdução

## 1.1- Alergia

Doenças alérgicas ocorrem devido à capacidade do organismo de produzir imunoglobulina do tipo E (IgE) contra um antígeno ambiental normalmente inócuo. A alergia é altamente indivíduo-específico e inclui asma, rinoconjuntivite, sinusite, alergia a alimento, drogas e/ou picadas de insetos, dermatite atópica, angioedema, urticária e anafilaxia, todas essas podendo ocorrer sozinhas ou associadas (Holgate e Polosa, 2008).

O recente aumento de incidência doenças alérgicas têm sido descritas como epidemia em muitas partes do mundo e é associado aos hábitos ocidentais. Neste contexto, podemos destacar em especial as doenças respiratórias, que representam um grave problema de saúde pública em todo o mundo e vem crescendo gradativamente. Estima-se que há mais de 300 milhões de asmáticos em todo o mundo, variando de 1 a 18% em alguns países (WHO, 2006). No Brasil, trata-se de uma doença muito comum, que afeta aproximadamente 7-10% da população. Segundo dados do International Study for Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC), estima-se que a prevalência no Brasil seja em torno de 20% em crianças. Nos Estados Unidos, uma pesquisa epidemiológica realizada em 2012, revelou que por volta de 18,9 milhões de adultos e 7,1 milhões das crianças são asmáticos, sendo que no ano de 2007 este número era menor: 15,7 milhões de adultos e 6,5 milhões de crianças (<http://www.cdc.gov/nchs/fastats/asthma.htm>). A asma é responsável, em nosso país, por aproximadamente 350.000 internações hospitalares no SUS por ano. Em 2011, do total de 177,8 mil internações no Sistema Único de Saúde (SUS) - em decorrência da doença - 77,1 mil foram crianças. Dados da Pesquisa Vigitel (Vigilância de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), do Ministério da Saúde, indicam que a asma causa a morte de 2,5 mil pessoas por ano no país. Devido a estes fatos três novos medicamentos foram incluídos para a asma no programa Saúde Não Tem Preço, ação integrante do Programa Farmácia Popular são eles: brometo de ipratrópio, dirpoprionato de beclometasona e sulfato de salbutamol, resultando em um crescimento de 443% no acesso a medicamentos para o controle da doença (<http://portal.saude.gov.br>).

A asma é considerada uma doença inflamatória crônica dos pulmões caracterizada por uma sensibilidade aumentada ao estímulo (como a inalação de um alérgeno), conhecido como atopia, que é uma tendência do organismo de produzir anticorpos específicos, como



imunoglobulina (Ig) E para antígenos ambientais. A produção de IgE é responsável não só pelo desenvolvimento da asma, mas também rinite, dermatite atópica e a anafilaxia.

A etiologia da asma é multifatorial, ou seja, envolve a interação de fatores genéticos, obesidade, sexo e ambientais como: diversos alérgenos, infecções principalmente virais, exposição à fumaça de cigarro, poluição e dieta. Clinicamente ela se apresenta através de sintomas episódicos, principalmente dispnéia, sibilância, tosse seca e sensação de aperto torácico. Estes sintomas são caracterizados pelo aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, contração do músculo liso, eosinofilia tecidual, aumento na produção de muco pelas células goblet com obstrução das vias aéreas. Outras características como perda do epitélio de superfície, espessamento da membrana basal, hipertrofia da musculatura lisa e aumento das glândulas submucosas, são também, achados anátomos-patológicos importantes no quadro asmático (Busse e cols., 2001).

Recentemente, pesquisadores vêm tentando caracterizar a asma em diferentes fenótipos baseados em vários aspectos observados clinicamente como, gênero, idade, obesidade, resposta a tratamento a certos fármacos, função pulmonar, presença e/ou ausência de certos tipos de células inflamatórias dentre outros. Baseado nisso, Agache e cols., 2012 resume os fenótipos da asma em:

- Asma alérgica, onde há participação de eosinófilos, inflamação do tipo  $T_H2$  e responsividade aos tratamentos com corticosteróides, anticorpos anti-IgE e anti-citocinas (IL-5 e IL-13).

- Asma intrínseca, com a participação de neutrófilos e eosinófilos, associado com auto-antígenos e/ou superantígenos, podendo ser ou não esteróide resistente.

- Asma neutrofílica, é considerada asma grave, pois é esteróide resistente, tem participação das células  $Th17$ , mas é responsiva a antioxidantes, antibióticos além de anticorpos anti-TNF- $\alpha$ .

- Asma induzida por aspirina, que é predominantemente eosinofílica, com participação dos leucotrienos  $C_4$ ,  $D_4$  e  $E_4$ , os pacientes são responsivos a esteróides e antagonistas de receptores de leucotrienos.

- Asma com remodelamento extensivo, na qual, embora não haja inflamação, ocorre um extensivo remodelamento das vias aéreas com presença de anormalidades do músculo liso, ativação anormal das células mesenquimais e epiteliais. O tratamento com esteróides não é muito eficaz, mas este tipo de asma pode ser tratado com fármacos que tem como alvos componentes responsáveis pelo remodelamento, como o músculo liso das vias aéreas, metaloproteinases e a angiogênese.

No Brasil, a asma é classificada em intermitente, persistente leve, persistente moderada, persistente grave considerando-se dois fatores principais: a frequência e a intensidade dos sintomas e os parâmetros da função pulmonar (Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2012).

No quadro asmático a resposta inflamatória alérgica é precedida por uma reação de sensibilização do indivíduo com quantidades diminutas do alérgeno solúvel intacto na superfície mucosa do trato respiratório, favorecendo a captação deste alérgeno por células apresentadoras de antígeno (APC). As células dendríticas (DC) são as principais APC que interagem com linfócitos T. Os antígenos (Ag) são processados no compartimento endossomo-lisossomal e apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHCII). Ao mesmo tempo em que o antígeno está sendo apresentado ocorre à estimulação das APCs para expressarem altos níveis de moléculas co-estimuladoras, tais como as proteínas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que enviam segundos sinais para a ativação da célula T através da ligação ao CD28 expresso em sua membrana. Além disso, quimiocinas da família CC (CCL) como CCL19 e CCL21, interagem com receptor de quimiocinas da família CC (CCR) CCR7, agem nas APCs, direcionando-as, com o antígeno para os linfonodos drenantes, onde elas podem interagir com as células T “naive” específicas (Marsland e cols., 2005). Ativadas, as células T passam a expressar CD40L, o qual se liga ao CD40 nas APCs, contribuindo para a ativação destas células.

Células CD4<sup>+</sup> *naive* podem se diferenciar em T<sub>h</sub>1, T<sub>h</sub>2, T<sub>h</sub>9 ou T<sub>h</sub>17 baseado no estímulo micro ambiental no qual estas células são expostas na presença do antígeno (Lloyd e Hessel, 2010). A diferenciação das células T em T<sub>h</sub>1 ocorre quando as APCs, estimuladas por produtos microbianos, secretam citocinas tais como IL-12 e interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Estas citocinas induzem a expressão do fator de transcrição transdutor de sinal e ativador de transcrição do tipo quatro (STAT 4), estimulando a diferenciação das células T em T<sub>h</sub>1. Estas células produzem linfotóxina- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , que agem sobre os macrófagos estimulando suas funções microbidas e aumentando a produção de IL-12. A IL-12 estimula a produção adicional de IL-2 pelas células T<sub>h</sub>1 aumentando a proliferação destas. Essa ativação celular ocorre pela interação CD40L-CD40, entre célula T e APC, respectivamente, e pela citocina IFN- $\gamma$ , que estimula a expressão dos fatores de transcrição, como o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), ativador de proteína 1 (AP-1), STAT-1 e fator de regulação 1 de interferon (IRF-1). As células T<sub>h</sub>1, por seu perfil de secreção de citocinas, são características de doenças autoimunes como artrite reumatóide, diabetes mellitus imunodependente e outras (Dong e cols., 2000).

A diferenciação das células T em T<sub>h</sub>2 é induzida principalmente pela IL-4, que ativa o fator de transcrição STAT-6, este fator induz a expressão da proteína 3 que se liga a seqüência

genética “GATA” (GATA3). IL-4 é produzida não só pelas próprias  $T_H2$ , mas também por outros tipos celulares como mastócitos, basófilos e células matadoras naturais (NK) (Dong e cols., 2000). As células  $T_H2$  efectoras, em contraste com as  $T_H1$ , produzem as citocinas IL-4, IL-5, IL-13 etc. As citocinas IL-4 e IL-13 promovem a produção de IgE (Pawankar e cols. 1997), agem diretamente no epitélio das vias aéreas para induzir hiperreatividade das vias aéreas (AHR) e metaplasia das células globet (Lutz e cols., 2002) e recrutam mastócitos (IL-9 também). A IL-13 também medeia à produção de fator  $\beta$  de crescimento e transformação (TGF- $\beta$ ) pelos macrófagos, transformando fibroblastos em miofibroblastos, alterações estas, cruciais para iniciar o processo de remodelamento das vias aéreas (Davies e cols., 2003). IL-3, IL-5 e GM-CSF ajudam na maturação de eosinófilos ativando-os na função microbicida (combate a helmintos, por exemplo), estando ainda envolvidas em reações alérgicas como a asma (Holgate e cols., 2008).

Alguns alérgenos induzem a liberação de linfopoetina estromal tímica (TSLP), IL-25 e IL-33 pelas células epiteliais. Estas citocinas programam as células dendríticas para se tornarem indutoras de células  $T_H2$ . As DCs expressam o receptor de IgE de alta afinidade (Fc $\epsilon$ RI) que podem mediar à apresentação do antígeno as células T. A presença de IgE ligada no receptor Fc $\epsilon$ RI nas DC diminui o limiar de reconhecimento pelas células  $T_H2$ . As próprias DCs liberam quimiocinas que atraem as células  $T_H2$  como CCL17 ou TARC e MDC ou CCL22 (Lambrecht e Hammad, 2012).

O desbalanço entre as respostas  $T_H2$  e  $T_H1$  tem sido à base do entendimento para a tendência a exarcebação alérgica por mais de duas décadas (Romagnani 2006), Estudos envolvendo a administração de IFN- $\gamma$  (que é uma citocina liberada pelas células  $T_H1$ ) em pacientes asmáticos, não evidenciou claramente esta correlação, uma vez que foi observado melhora significativa dos sintomas (Boguniewicz e cols., 1995). Hoje em dia, a atopia também é caracterizada pelo desbalanço entre  $T_H2$  e T regulatórias ( $T_{reg}$ ) (Bacchetta e cols., 2007; Larché, 2007). Nas vias aéreas de crianças asmáticas a porcentagem de células  $CD4^+CD25^+$  é menor em relação a crianças saudáveis. Estas células estão também correlacionadas positivamente com volume forçado respiratório em 1 segundo (FEV1) e o tratamento com corticosteróides aumentou a presença das mesmas em pulmões de asmáticos (Hartl e cols., 2007).

Os linfócitos  $T_{reg}$  são outro tipo de célula T  $CD4^+$  que são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição “Forkhead box” P3 (Fox P3) e da presença do receptor de IL-2 (CD25) (Wing e cols., 2008). Estas células têm participação não só na alergia, como também em outras reações inflamatórias. Estudos com camundongos têm revelado a

participação das  $T_{reg}$  na supressão de reações alérgicas, e tem sido descrito evidências mostrando que estas células também controlam a resposta alérgica em humanos de forma indireta através da secreção das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  (Maloy e cols., 2003). Além disso, estas células expressam moléculas inibitórias como antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA4) e induz a diminuição de MHC II, CD80 e CD86 nas células apresentadoras de antígeno. As células  $T_{reg}$  suprimem as DC via contato direto: As  $T_{reg}$  formam agregados com as DC por uma via dependente de antígeno 1 associado à função linfocítica (LFA-1), o que leva a regulação negativa das DC (Cederbom e cols., 2000; Wing e cols., 2008).

$T_{h17}$  é uma linhagem distinta dos  $CD4^+$ , estas células liberam IL-17 e expressam fatores de transcrição chave que são receptores órfãos relacionados ao ácido retinóico  $\gamma$ t e  $\alpha$  (ROR $\gamma$ t e ROR $\alpha$ ). Em camundongos, TGF- $\beta$ , IL-6, IL-21, IL-23 parecem ser cruciais no desenvolvimento deste subtipo de linfócitos, entretanto este fato ainda não está claro em humanos (Alcorn e cols., 2010). IL-17A está aumentada em pulmões de pacientes com asma e este aumento está correlacionado com a severidade da doença, principalmente em pessoas com asma neutrofílica e resistente a esteróides (Park e cols., 2005). Em modelos murinos o bloqueio da IL-17 durante a sensibilização tem um efeito protetor, enquanto que o tratamento com IL-17A durante o re-desafio diminui a inflamação, sugerindo um efeito regulatório também para esta citocina em pulmões alérgicos (Murdoch e cols., 2010).

Há outra população de  $CD4^+$  que secreta IL-9 e depende de TGF- $\beta$  para seu desenvolvimento. A geração destas células requer o fator de transcrição PU.1 e a secreção da citocina IL-9 é estimulada por IL-25. Esta citocina é detectada em biopsia de pacientes asmáticos. Outras células como mastócitos e eosinófilos produzem IL-9 (Angkasekwinai e cols., 2010). Estudos em camundongos sugerem a participação da IL-9 na regulação do número de mastócitos nos pulmões, assim como no remodelamento dos mesmos (Kearley e cols., 2011).

Outros tipos de linfócitos como os  $CD8^+$ , NK e  $\gamma\delta$  têm demonstrado participarem de reações alérgicas. Estes linfócitos produzem IL-4, IL-5 além de IFN- $\gamma$ , estas células também participam na reação de hiperreatividade (Cho e cols., 2005). Os nuócitos (células linfóides do tipo  $T_{h2}$ ) produzem citocinas como IL-25, IL-33 e TSLP que também podem induzir muitas características da asma incluindo eosinofilia, produção de citocinas e IgE (Neil e cols., 2010).

Uma vez que um indivíduo é sensibilizado a um alérgeno em particular, o encontro subsequente com o mesmo causa a ligação da IgE ao seu receptor de alta afinidade (Fc $\epsilon$ RI), encontrado principalmente nos mastócitos e basófilos, para promover a liberação de mediadores presentes nos grânulos. Esses mediadores são responsáveis pela reação alérgica

imediate, que ocorre de 1 a 30 minutos após o estímulo, junto com a liberação de citocinas e quimiocinas que recrutam macrófagos, neutrófilos, linfócitos T, eosinófilos e basófilos, o que compreende uma fase mais tardia (6 a 72 horas) (Cockcroft e cols., 2007). Os mediadores autacóides (compostos endógenos que participam na inflamação) como histamina e leucotrienos cisteinados (CisLTs) aumentam a expressão endotelial de P-selectina e E-selectina, para iniciar a adesão e rolamento dos leucócitos, seguida pela expressão de ICAM-1 e VCAM-1, que interagem com os receptores de integrinas para permitir a passagem dos leucócitos entre as células endoteliais, em direção ao espaço perivascular. As quimiocinas, CCL2/ MCP1 (proteína quimioatratora de monócito), CCL7/MCP2, CCL8/MCP3 e CCL13/MCP4 atraem e ativam principalmente os linfócitos T, enquanto que as quimiocinas CCL11/eotaxina1, CCL24/ eotaxina2, CCL26/ eotaxina 3 e CCL5/RANTES (*Regulated on activation, normal T expressed and secreted*), direcionam e ativam os eosinófilos (Palmqvist e cols., 2007), as principais células efetoras da resposta inflamatória alérgica.

Os eosinófilos são leucócitos com núcleo bilobado (humanos), cromatina altamente condensada e vários grânulos nos seu citoplasma. Estas células participam em vários processos inflamatórios como invasão helmíntica, infecções bacterianas e virais, danos teciduais, imunidade tumoral e doenças alérgicas (Rothenberg, 1998). Eles se desenvolvem e maturam na medula óssea a partir de células progenitoras mielóides CD34<sup>+</sup>. Em resposta a um estímulo são liberados no sangue periférico e trafegam para o tecido alvo, atraídos por moléculas como CCL11, CCL5, fator de ativação de plaquetas (PAF), leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), e IL-5, dentre outras, tendo a meia-vida no sangue periférico de 8 a 18h. Embora em quantidades menores que os linfócitos, os eosinófilos também são capazes de produzir várias citocinas, além de quimiocinas como: IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-12, IL-13, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CCL11, CCL5, fatores de crescimento e fibrinogênicos, espécies reativas de oxigênio e mediadores lipídicos como CisLTs, PAF e PGD<sub>2</sub> (Kay, 2012).

O citoplasma dos eosinófilos contém quatro tipos de organelas secretórias: grânulos cristalóides, grânulos primários que contêm uma proteína cristalizada chamada Charcot-Leyden, também conhecida como galectina 10 e lisofosfolipase eosinofílica, grânulos pequenos, corpúsculos lipídicos, que são sítios de síntese de cisteinil leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas (Bozza e cols., 1997) e vesículas secretórias (Rosenberg e cols., 2012). As maiores organelas secretórias são os grânulos cristalóides que estocam a maioria das proteínas presentes nos eosinófilos. Destas proteínas podemos citar a proteína básica maior (MBP), peroxidase eosinofílica (EPO), proteína catiônica eosinofílica (ECP) e neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN) (Egsten e cols., 1986). A maioria delas compartilham

propriedades citotóxicas e importantes no mecanismo do dano tecidual (Butterworth e cols., 1984, Lehrer e cols., 1989, Ackerman e cols., 1985, Rosenberg e Domachowske, 2001 e Wang e Slungaard, 2006), porém todas apresentam atividades específicas.

A proteína MBP corresponde a mais de cinquenta por cento dos grânulos e está relacionada a hiperreatividade e broncoconstricção (Uchida e cols., 1993), ativação de fatores de remodelamento (Pégorier e cols., 2006), estimulação de mastócitos, neutrófilos e basófilos (Shenoy e cols., 2003) e citotoxicidade das vias aéreas, que pode ser parcialmente responsável pelo dano causado as mucosas brônquicas associada à infiltração de eosinófilos (Furuta e cols., 2005). Embora mais fraca do que o EDN (Slifman e cols., 1986), a ECP possui atividade ribonuclease, e promove a degranulação de mastócitos (Zheutlin e cols., 1984). O mecanismo de ação da ECP também está envolvido na formação de poros na membrana-alvo (Young e cols., 1986). A EPO é tóxica para células de mamíferos, possui a capacidade de degradar tecido conjuntivo (Pégorier e cols., 2006) e induz dano oxidativo e mutagênese de DNA e RNA (Henderson e cols., 2001).

Previamente, assumia-se que a liberação de mediadores ocorria primariamente por degranulação citosólica, que é um mecanismo no qual os eosinófilos liberam proteínas ou grânulos intactos, resultando no completo esvaziamento do conteúdo pré-formado de proteínas catiônicas, tornando-se células não viáveis (Dovrak e cols., 1994). Porém, análises de micrografias eletrônicas revelaram que a degranulação ocorre por um processo mais elaborado chamado de degranulação *piecemeal*, através do qual, a liberação dos mediadores ocorre através de grânulos citoplasmáticos que são transportados para superfície celular em vesículas citoplasmáticas ligadas a membrana, este mecanismo permite que as células permaneçam viáveis e responsivas a estímulos subseqüentes. Como exemplo, podemos citar eosinófilos que em resposta ao IFN- $\gamma$  e CCL11, desenvolvem vesículas secretórias citoplasmáticas, chamadas de vesículas sombreros (Melo e cols., 2005).

Os eosinófilos possuem vários receptores, dentre os que caracterizam estas células podemos destacar: a subunidade  $\alpha$  do receptor de IL-5 (IL-5R $\alpha$ ), o receptor três de quimiocina CC (CCR3) e também lectina oito semelhante à imunoglobulina ligante de ácido siálico (SIGLEC-8 em humanos, e SIGLEC-5 ou F em camundongos),(Rosenberg e cols., 2013).

Embora células apresentadoras de antígenos não “profissionais”, estas células podem expressar componentes da superfície celular como MHC II, CD80 e CD86. Além de poderem processar antígenos, os eosinófilos podem estimular células T de forma antígeno-específico (pela ligação do CD80/86 com o CD28), permitindo com que estes linfócitos migrem para o

sítio inflamatório e interajam com DC (através das quimiocinas CCL17 e 22), proliferem e liberem citocinas como IL-4, IL-13 e IFN- $\gamma$  (Wang e cols., 2007 e Jacobsen e cols., 2011).

Recentemente foi descoberto que os eosinófilos liberam estruturas semelhante às armadilhas extracelulares neutrofilicas (NET), estas estruturas são compostas de DNA mitocondrial, MBP e ECP, estas estruturas são liberadas mediante a uma ameaça bactericida (Von köckritz-Blickwede e cols., 2009). Também descobriu-se que durante a inflamação alérgica, as citocinas linfopoetina tímica estromal (TSLP), IL-25 (também conhecida por IL-17E) e IL-33, promovem a eosinofilia por induzir a produção de IL-5 (Wong e colaboradores, 2010).

Outras células importantes na resposta alérgica são os mastócitos. Estas células são residentes na pele e são derivadas de progenitores CD13<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup> que migram da medula óssea (Metcalf e cols., 1997). Estas células possuem receptores para diversos ligantes como adenosina, componente do complemento três a (C3a), quimiocinas, citocinas, padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) dentre outros (Migalovich-Sheikhet e cols., 2012). As manifestações das reações alérgicas derivadas dos mastócitos são principalmente como consequência da agregação induzida dos Fc $\epsilon$ RI que são expressos na superfície destas células com os antígenos, seguida liberação de mediadores pró-inflamatórios já que em pessoas alérgicas os Fc $\epsilon$ RI já estão ligados ao IgE. Estas células possuem produtos pré-estocados em grânulos citoplasmáticos como histamina, serotonina, proteases como triptase, quimase e /ou carboxipeptidase A3 e proteoglicanos (sulfato de heparina e ou condroitina). Para sua ativação, proteínas como fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), como as ERKs, p38, janus quinases (JNK), fator nuclear de linfócitos T ativados (NFAT) dentre outras, participam deste processo (Lorentz e cols., 2003).

Mastócitos também liberam citocinas como IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , dentro de minutos após o estímulo antigênico, além de mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico como PGD<sub>2</sub>, e leucotrienos cisteinados (Galli e cols., 2012). O ácido araquidônico é liberado pela fosfolipase A2, é convertido pelas enzimas COX e PGD sintase em PGD<sub>2</sub> (não produzido por basófilos), ou pela via da 5-lipoxigenase em conjunto com a proteína de ativação de 5-lipoxigenase (FLAP) para leucotrieno em LTA<sub>4</sub>, que é convertido em LTB<sub>4</sub> ou conjugado com glutatona para formar os cisteinil leucotrienos (CisLTs). Os CisLTs ligados dos os seus receptores, CisLT1 e CisLT2, agem como broncoconstritores potentes, para promover a permeabilidade vascular, induzir a produção de muco e atrair eosinófilos. PGD<sub>2</sub> é também um broncoconstritor e atrai eosinófilos e basófilos, e seu metabólito ativo (9-A, 11-B-PGF<sub>2</sub>) é um

constritor das artérias coronárias. TNF- $\alpha$  é uma das principais citocinas armazenada e liberada pelos mastócitos, ele regula positivamente moléculas de adesão endoteliais e epiteliais.

O Diagnóstico da asma é baseado em condições clínicas e funcionais:

- Diagnóstico clínico, que se caracteriza pela presença de um ou mais dos seguintes sintomas: falta de ar (dispnéia), tosse crônica, chiado no peito (sibilância), aperto ou desconforto no peito, principalmente à noite ou nas primeiras horas da manhã. Além da análise dos sintomas, são realizadas perguntas ao paciente como presença dos sintomas relacionados anteriormente.

- Diagnóstico funcional onde realizado o exame de espirometria, onde é verificado a presença de obstrução das vias aéreas caracterizada pela redução do volume expiratório forçado cronometrado de primeiro segundo (VEF1) e da relação VEF1/CVF (capacidade vital forçada). Quando VEF1 for inferior a 80% e VEF1/CVF for menor que 75%, é caracterizado obstrução das vias aéreas (J Bras Pneumol. 2012;38(supl.1:S4).

## 1.2 - Tratamento da asma

Os tratamentos mais comuns da asma são realizados de acordo com a severidade da doença que o paciente se encontra, como mostra o quadro a seguir retirado do Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2012:

**Quadro 8 - Manejo da asma baseado no nível de controle para maiores de cinco anos.**

NÍVEL DO CONTROLE		AÇÃO	
CONTROLADA	↓ ↑	Manter o tratamento e identificar a menor dose para manter o controle	
PARCIALMENTE CONTROLADA		Considerar aumentar a dose para atingir o controle	
NÃO CONTROLADA		Aumentar etapas até conseguir controle	
EXACERBAÇÃO		Tratar como exacerbação	

ETAPAS DO TRATAMENTO*				
ETAPA 1	ETAPA 2	ETAPA 3	ETAPA 4	ETAPA 5
EDUCAÇÃO E CONTROLE AMBIENTAL				
BD de curta ação por demanda		BD de curta ação por demanda		
Opções de medicamentos controladores para as etapas 2 a 5 <sup>b</sup>	Selecione uma das opções abaixo	Selecione uma das opções abaixo	Selecione uma das opções abaixo	Adicionar um ou mais em relação à etapa 4
	<i>Dose baixa de CI</i> Antileucotrienos	<i>Dose baixa de CI + LABA</i> Dose média ou alta de CI  Dose baixa de CI + teofilina de liberação lenta	<i>Dose moderada ou alta de CI + LABA</i> Dose moderada ou alta de CI + LABA + antileucotrienos  Dose moderada ou alta de CI + LABA + teofilina de liberação lenta	Corticoide oral na dose mais baixa possível  Tratamento com anti-IgE

BD: broncodilatador; CI: corticoide inalatório; e LABA: *long-acting beta agonist* ( $\beta_2$ -agonista de ação prolongada). \*Os apêndices I e II discriminam a equipotência de medicamentos e de medicações controladoras; os medicamentos de resgate são comentados na Parte 5. <sup>b</sup>As opções preferenciais para as etapas 2, 3 e 4 estão evidenciadas em negrito e itálico.

Figura 1: Quadro ilustrativo do manejo da asma.  
Fonte: Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2012. Página S12.



Em termos gerais, com base no quadro anterior temos os seguintes fármacos, utilizados para o tratamento e alívio dos sintomas da asma.

- Agonistas de adrenoreceptores  $\beta_2$ : podem ser de vida curta e de vida longa. Os SABAs, que são os agonistas de ação curta, como salbutamol e terbutalina (são inalados). O SABAs são os broncodilatadores mais disponíveis, atualmente para alívio rápido dos sintomas da asma. Depois da ligação destes agonistas ao adrenoreceptor  $\beta_2$  (densamente localizado nos músculo liso), a adenilato ciclase é estimulada, através da proteína G transdutora de sinal, para aumentar a produção de 3' 5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), ativando então a proteína quinase A (PKA) e Epac, que é um fator de troca do nucleotídeo guanina. Este processo medeia o relaxamento do músculo liso pela fosforilação da miosina e abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de  $\text{K}^+$ , aliviando a broncoconstricção (Billington e cols., 2012 e 2013). Os de vida longa (LABAs) são preferencialmente usados associados quando a asma não é controlada por corticosteróides inalados, uma vez que sua monoterapia não é recomendada, pois pode mascarar uma piora na inflamação, além da diminuição de seus efeitos (Cazzola e col., 2012).

- Inibidores de fosfodiesterase: Teofilina é uma xantina com atividade inibidora de fosfodiesterase (PDE) de AMPC e um antagonista do receptor de adenosina. A Teofilina tem sido usada para tratar broncoconstricção, mas seus efeitos colaterais gastrointestinais e o surgimento de náuseas (Page e cols., 2012), têm levado a uma redução no seu uso (Boswell-Smith e cols., 2006). Roflumilast é um dos poucos novos inibidores  $\text{PDE}_4$  testados na clínica, com resultados modestos na redução no número de eosinófilos em escarros de pacientes (Gauvreau e cols., 2011).

- Corticosteróides: A supressão das reações alérgicas inflamatórias pelos corticosteróides ocorre pela inibição da expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (Barnes e cols., 1998), cujos genes são regulados por fatores de transcrição como NF $\kappa$ B e AP1. Os corticosteróides livres passam pela membrana celular, interagem com receptores citoplasmáticos, resultando na sua translocação para o núcleo, onde a atividade transcricional dos genes alvo é modulada por vários mecanismos diferentes, incluindo genes de transativação e transrepressão gênicas (Barnes e cols., 2003). Os corticosteróides são muito eficientes, mas podem acarretar vários efeitos colaterais como imunossupressão e síndrome de Cushing, e são ineficazes em exacerbações induzidas por vírus e em asmáticos fumantes. Além disso, nem a biossíntese nem a ação dos CisLts, são inibidos por corticosteróides. E ainda podemos citar que alguns indivíduos desenvolvem resistência aos glicocorticóides (Gyllfors e cols., 2006).

Alguns estudos têm identificado exarcebação em pacientes com asma 6 meses após pararem com a baixa dose de corticóide (Rank e cols., 2013).

- Antagonistas de cisteinil leucotrienos: Os CisLTs são os mais potentes constritores dos músculos das vias aéreas, apresentando também efeitos em microvasos, glândulas produtoras de muco, nervos e eosinófilos, por agir no receptor 1 de CisLTs (CisLTR1). Os antagonistas de leucotrienos orais disponíveis atualmente são antagonistas de CisLTR1, entre eles podemos citar Montelukast, Zafirlukast e Pranlukast e o inibidor de 5-lipoxigenase, Zileuton, que é tóxico para o fígado (Amirav, 2008). Alguns estudos têm sugerido uma relação entre o uso de antagonista de leucotrienos com o desenvolvimento da síndrome de Churg-Strauss (Nathani e cols., 2008).

- Terapia anti-IgE: Omalizumab, uma IgG<sub>1</sub> que se liga especificadamente a IgE humana, é recomendada para o tratamento da asma severa. Estudos têm demonstrado uma melhora no quadro de asma em indivíduos tratados subcutaneamente com este fármaco, embora seus efeitos na hiperreatividade sejam modestos (Holgate e cols., 2005). Dentre os efeitos colaterais do uso do Xolair® são reação na área da injeção e a anafilaxia (Di Domenico e cols., 2011). Novos anticorpos anti-IgE tem sido desenvolvidos com uma melhor propriedade de reduzir IgE circulante (El-Qutob e López, 2012).

- Anti-histamínicos: São antagonistas de receptores de histamina 1 (H<sub>1</sub>) e foram os primeiros fármacos usados para tratar reações alérgicas, como exemplo podemos citar a Clorofeniramina. Estes fármacos controlam bem os sintomas da alergia, mas seu efeito sedativo e anticolinérgico são problemáticos, entretanto uma nova geração de drogas tem sido desenvolvida como Cetirizina, Loratadine, entre outros, diminuindo os efeitos tóxicos (del Cuvillo e cols., 2006).

- Imunoterapia alérgeno específico (SIT): É uma terapia modificadora da resposta imune que tem sido usada na asma moderada, dentre outras doenças alérgicas. SIT diminui o recrutamento dos mastócitos, basófilos e eosinófilos depois da exposição natural ou experimental ao alérgeno, induz a formação de T<sub>reg</sub>, e diminui a necessidade do consumo de drogas (Wu e cols., 2007). A imunoterapia subcutânea (SCIT) envolve a injeção regular de extrato de alérgenos ou alérgenos recombinantes, como por exemplo, a proteína Der p 1 (para alérgicos a ácaro) com a indução da tolerância variando de vários dias a vários meses. O fator limitante na SCIT é o efeito colateral da anafilaxia que pode acometer 0,1-5% dos indivíduos, dependendo da severidade (Williams e cols., 2004). Recentemente tem sido testado bombas de infusão semelhantes às utilizadas para diabetes, para liberação subcutânea dos peptídeos (El-Qutob e López, 2012).

• Além dos tratamentos citados anteriormente, existem ainda pesquisas com novas classes de antagonistas de citocinas, como bloqueador de receptor de TNF- $\alpha$  (Etarnecep) anticorpo anti-TNF- $\alpha$  (Pawliczak, 2013), além de anticorpos contra IL-9, IL-33, TSLP (Balzar e cols., 2011), inibidores de quinases. Anticorpo anti IL-13 como, por exemplo, lebrikizumab, tem apresentado efeitos desapontadores com poucos efeitos fisiológicos nos sintomas ou exacerbações (Corren e cols., 2011). Vários trabalhos têm demonstrado interesse no desenvolvimento de um medicamento para o bloqueio de PGD<sub>2</sub>, pois foi observado que pacientes com asma severa e não controlada possuem este mediador aumentado (Balzar e cols., 2011).

• Plantas medicinais: Embora a grande maioria dos tratamentos com plantas medicinais não são comprovados cientificamente, podemos citar a *Gingko biloba* e *Ephedra sinica*, que tem como principal ingrediente a efedrina que age como broncodilatador (By Kathi e cols., 1999). Mel e alho também são muito utilizados para alívio dos sintomas da asma (Costa e cols., 2010). Há na literatura alguns estudos clínicos com plantas medicinais como Li e cols., 2009, que realizaram uma revisão sobre estudos clínicos envolvendo plantas medicinais chinesas, além de Carvalho e cols., 2012 que realizaram um estudo com a planta *Amburana cearensis*, planta esta muito utilizada no nordeste do Brasil.

Mais recentemente tem se usado a farmacogenômica para o tratamento de diversas doenças, dentre elas a asma. Farmacogenômica relaciona a variabilidade no genoma com a resposta a uma determinada terapia (Kazani e cols., 2010). Como um exemplo, podemos citar o estudo de Drazen e cols., 1999 que descreveu uma variante de deleção/adição na região promotora do gene da 5-lipoxigenase que foi associada com a variação em FEV<sub>1</sub> em resposta a 5-lipoxigenase.

Considerando todo o cenário apresentado, pode-se afirmar que a busca de novos fármacos para o controle da asma ainda constitui uma prioridade de interesse clínico e farmacêutico, já que os glicocorticóides, drogas esteroidais com emprego consagrado na terapêutica antiinflamatória e antiasmática, tem sua utilização limitada em função da gravidade dos efeitos colaterais e da resistência ao medicamento dependendo do caso. As demais terapias possíveis também não atendem a toda a demanda terapêutica, pois a asma apresenta vários fenótipos e cada indivíduo responde diferentemente a cada tratamento (Ying e cols., 2006).

### **1.3 - Plantas medicinais**

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do globo terrestre, grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua saúde, fato este reconhecido pela OMS. Sabe-se que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas (WHO, 2008). Aliás, o uso de plantas medicinais pelo homem data de pelo menos 60.000 anos, segundo dados fósseis (Solecki e cols., 1975).

O número de espécies plantas superiores (Angiospermae e Gymnospermae) neste planeta é estimado em 250.000 (Ayensu e cols., 1978) variando entre 215.000 (Cronquist A. 1981) e 500.000 (Cronquist A. 1988). Destas, apenas 6% foram avaliadas quanto às suas atividades biológicas e somente 15% foram avaliadas em estudos fitoquímicos (Verpoorte e cols., 2000), porém estima-se que este número aumente devido aos avanços tecnológicos. Os objetivos do estudo de plantas medicinais são: A) isolar substâncias bioativas para o uso direto como drogas, por exemplo: morfina e reserpina, provenientes das plantas *Papaver somniferum* e *Rauwolfia serpentina* respectivamente; B) buscar substâncias bioativas novas ou usar estruturas conhecidas como modelos para semi-síntese e assim produzir substâncias com maior atividade e/ou baixa toxicidade, como metformina, nabilona e outros analgésicos narcóticos; C) usar substâncias isoladas como ferramentas farmacológicas, como, ácido lisérgico dietilamida (LSD), usado como alucinógeno e D) usar toda a planta ou parte dela como fitoterápico, como, por exemplo, a *Gincko biloba*. Outra opção é o uso de diversas plantas de espécies diferentes na composição do fitoterápico.

Em 1991, a OMS valorizou a importante contribuição da medicina tradicional na prestação de assistência social, especialmente às populações que têm pouco acesso aos sistemas de saúde, e solicitou a interação do uso da medicina tradicional e da assistência sanitária moderna, principalmente no tocante ao emprego de remédios tradicionais de eficácia científica demonstrada, a fim de reduzir os gastos com medicamentos. Sugeriu, também, que todos esses remédios fossem aproveitados plenamente e que os produtos naturais, em particular os derivados de plantas, poderiam conduzir ao descobrimento de novas substâncias terapêuticas (WHO, 1991).

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis no mercado foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim divididos: 25% de plantas, 12% de microorganismos e 3% de animais (Calixto, 2001). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originadas de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (Rates, 2001). As plantas têm uma vantagem nesta área, baseado no uso pelo homem durante vários anos. Além disso,

nas últimas décadas, o interesse populacional pelas terapias naturais tem aumentado significativamente nos países industrializados (WHO, 2003).

No Brasil, estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões do faturamento da indústria farmacêutica, no ano de 1996, foram originados de medicamentos derivados de plantas (Guerra e cols., 2001). Considera-se também que as vendas nesse setor crescem 10% ao ano, com estimativa de terem alcançado a cifra de US\$ 550 milhões no ano de 2001 (Knapp, 2001). Embora nosso país possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas (Prance, 1977), apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos ativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (Guerra e cols., 2001).

A pesquisa com fontes naturais deve ser seguida por alguns passos básicos. A primeira etapa consiste na pesquisa sobre a planta a ser estudada, seu uso terapêutico pela medicina popular, informações sobre efeitos tóxicos, uso de pesticidas, formas de preparo, dose utilizada etc. (Yunes e cols., 2001).

#### **1.4- Metabólitos de plantas**

São vários os metabólitos encontrados em extratos de plantas com efeitos biológicos já demonstrados cientificamente. Os óleos voláteis são obtidos de diferentes partes da planta através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. As principais substâncias extraídas são da classe dos fenilpropanóides e terpenóides (Simões e cols., 2000). Como exemplo, podemos citar os óleos voláteis extraídos de espécies de Eucalipto, que possuem atividade antitumoral e antimicrobiana (Schelez, 2006).

Os polissacarídeos são polímeros de alto peso molecular resultante da polimerização de um grande número de moléculas de aldoses e cetoses. Podem ser extraídos não só de plantas, mas também de bactérias e algas. Têm sido descobertos, entre os polissacarídeos, atividades antitumoral, imunoestimulante, antiinflamatória, antiviral, dentre outras (Chattopadhyay, 2008, Wack e cols, 2008, e Jin e cols, 2008).

As substâncias fenólicas simples e heterosídeos representam uma classe de substância que possui, pelo menos, um hidrogênio substituído por um grupo hidroxila (OH) no anel aromático. Dentro dessa classe são encontrados os ácidos fenólicos, os derivados da cumarina, ligninas e os taninos. Os taninos são substâncias fenólicas solúveis em água e são classificados em hidrolisáveis e condensados. São famosos por curar feridas, queimaduras e inflamações. Eles também possuem a propriedade de se ligar a proteínas e vários atuam como captadores de

radicais. Outras propriedades têm sido descobertas como, por exemplo, antioxidante (Zhang e cols., 2008). Para alguns componentes dessa classe têm sido relatadas atividades antioxidante, antibacteriana, antiviral e inibição da 5-lipoxigenase (Simões e cols., 2000).

Os flavonóides representam importante classe de polifenóis que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros). São indicados no tratamento de doenças circulatórias, cardíacas, câncer (Middleton e cols., 2000). Além disso, muitos possuem atividade imunomodulatória. Recentes estudos relatam a importância dos flavonóides, como resveratrol e quercetina, na dieta para a diminuição do desenvolvimento da asma (Tanaka 2013).

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou terpenos policíclicos. Possuem uma parte lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares). Sua característica marcante é a formação de espuma em solução aquosa. Algumas saponinas têm ação sobre membranas celulares, principalmente de hemáceas, possuem ação antifúngica, e redutora de colesterol sérico e anticancerígena (Simões e cols., 2000).

Os alcalóides são substâncias nitrogenadas, na sua maioria de caráter alcalino. São substâncias orgânicas cíclicas contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativa. Os alcalóides verdadeiros são aqueles que contêm um átomo de nitrogênio em anel heterosídeo. Alguns alcalóides são bastante conhecidos, como a cafeína (estimulante do sistema nervoso central), a morfina (analgésico) e a codeína (antitussígeno e analgésico) (Simões e cols., 2000).

Estes metabólitos secundários estão amplamente distribuídos nas diferentes famílias vegetais e constituem-se em uma rica fonte para o estudo e obtenção de novos agentes com atividade terapêutica importante, de modo a atender a demanda atual de busca e desenvolvimento de novos fármacos.

## **1.5 – Bromeliaceae**

A família Bromeliaceae compreende 56 gêneros, com aproximadamente 2.700 espécies, subdivididas em três subfamílias: Bromelioideae, Pitcainoideae e Tillandsioideae. A maioria das plantas são nativas da América tropical (figura 2) com apenas uma espécie a *Pitcarnia feliciana* no oeste da África (Benzing, 2000). A maioria das Bromeliaceae são plantas epífitas, mas algumas são xerófitas, encontradas basicamente em três grandes regiões da América tropical: nos Andes, do México às Antilhas, no Planalto das Guianas e na Mata Atlântica do leste brasileiro (Smith e Dows, 1974). A floresta Pluvial Costeira é o habitat preferido de

Bromeliaceae (81,8% do total de táxons). Nesse habitat encontram-se diversos gêneros, com seu maior grau de endemismo (26,4%) (Chedier e Kaplan, 1996).

Uma das plantas mais conhecidas desta família e de maior importância econômica é o abacaxi *Ananas comosus* e *Ananas sativus*, deste último foi isolado a bromelina, uma cisteína protease, que em diversos estudos demonstrou atividade antialérgica (Secor e cols., 2008), antiinflamatória (Fitzhugh e cols., 2008), cardioprotetora (Juhasz e cols., 2008), dentre outras. Dos frutos de *Ananas comosus* identificaram lignanas dietéticas provenientes dos frutos. Assim como compostos fenólicos como ácidos gálico e tânico (Yi cols., 2006 e Larrauri e cols., 1997).

Entre os metabólitos encontrados na família Bromeliaceae destacam-se os terpenóides e flavonóides, sendo encontrados em estudos feitos principalmente com plantas do gênero *Tillandsia*. Podem ainda ser encontrados, neste grupo de plantas, derivados do ácido cinâmico diterpenóides, triterpenóides e esteróides (Raffauf e cols., 1981; Takata e cols., 1976a; Harbone e cols., 1982; Harbone, 1988; Atallah e cols., 1971; Takata e cols., 1976b; Marker e cols., 1943; Borin e cols., 1993). Considerando o grande número de espécies da família Bromeliaceae, poucas delas foram estudadas tanto a nível químico quanto farmacológico.



Figura 2: Distribuição geográfica da família Bromeliaceae (em verde).

Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:WorldBromeliadDistribution.PNG>

Os gêneros *Vriesea*, *Aechmea* e *Neoregelia*, são os de maior riqueza nos domínios da Mata Atlântica, merece maior destaque ainda o gênero *Nidularium*, por ser o mais representativo em número de espécies da subfamília Bromelioidea na Mata Atlântica em especial de São Paulo e Rio de Janeiro.

### 1.5.1- *Nidularium*

É um gênero pertencente à subfamília Bromelioideae, cujo nome descreve a característica de ninho de sua inflorescência, do latim: nidus=pequeno ninho. O gênero *Nidularium* tem como seu habitat exclusivo o sub-bosque da mata atlântica, numa área compreendida entre os estados da Bahia e Rio Grande do Sul, passando por todos os estados da região sudeste do Brasil. Pode ainda ser encontrado ao nível do mar, na restinga ou em



Figura 3: Distribuição geográfica do gênero *Nidularium* no Brasil (pontos em vermelho).

áreas de transição da Mata Atlântica com manguezais, como a espécie *Nidularium procerum*. Este gênero foi descrito pela primeira vez pelo francês Charles Antonie Lemaire em 1854, sendo *Nidularium fulgens* a espécie-tipo deste gênero coletada em 1849 na cidade imperial de Petrópolis, no Rio de Janeiro.

As duas espécies mais abundantes são a *N. procerum* e *N. innocenti*. O estado que possui maior concentração de espécies é o Rio de Janeiro, com o número de espécies diminuindo à medida que se afasta do estado que é o pólo geográfico de irradiação e especiação do gênero (figura 2).

### 1.5.1.1- *Nidularium procerum*



Figura 4: *Nidularium procerum*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Divisão</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Liliopsida
<b>Ordem</b>	Poales
<b>Família</b>	Bromeliaceae
<b>Subfamília</b>	Bromelioideae
<b>Gênero</b>	<i>Nidularium</i>

Tabela 1: Classificação taxonômica de *Nidularium procerum*  
Fonte: Wikipédia



O nome da planta objeto de estudo deste trabalho originou-se do latim *procerus*, que significa “alto” ou “esbelto”, tendo referência à sua inflorescência bem elevada acima da roseta foliar (Leme, 2000). É uma bromélia epífita com até 1,80m de comprimento podendo variar de coloração e tamanho. A espécie não possui caule, suas folhas são dispostas em roseta, composta de 10 a 20 folhas enciformes, grandes e agudas, podendo chegar até 90 cm de comprimento, sendo finamente dentadas nas margens, com coloração esverdeada. Esta planta possui escalpo floral alto, circundado de brácteas de cor púrpura, grandes e agudas. As flores são azul-pálido, em grande número, dispostas em capítulos. Esta espécie é conhecida por ser a maior do gênero (Corrêa, 1984).

Estudos demonstraram efeitos analgésicos, antiinflamatórios e antialérgicos desta planta. O efeito analgésico foi demonstrado em modelo de contorção induzida por ácido acético, onde o extrato aquoso das folhas de *Nidularium procerum* (EAFNp) reduziu o número de contorções com ED<sub>50</sub> de 0,2 mg/kg, por via intraperitoneal, tendo seu efeito máximo 1h antes do estímulo com a dose de 1 mg/kg (Amendoeira e cols., 2005).

O EAFNp inibiu a hiperalgisia em ratos induzida por injeção de bradicinina na pata, na dose de 0,2 e 20 mg/kg enquanto que ácido acetil salicílico (AAS), que foi utilizado como droga controle-padrão, na dose de 140 mg/kg, não foi capaz de reduzir esta hiperalgisia. EAFNp não possui ação de efeito central, demonstrado pelo modelo de placa quente. Foi observado que a administração oral de EAFNp apresentou efeito dose dependente entre 0,1 e 10 mg/kg no modelo de contorção induzida por ácido acético. O efeito analgésico observado parece não ocorrer através do receptor opióide, reforçando a hipótese de que o efeito não ocorre via sistema nervoso central, por outro lado mecanismos envolvendo a inibição da síntese de (Prostaglandina E<sub>2</sub>) PGE<sub>2</sub> dependente COX<sub>2</sub>, parecem estar envolvidos na bioatividade de *N. procerum* (Amendoeira e cols., 2005a). A extração metanólica das folhas de *N. procerum*, mostrou atividade antinociceptiva semelhante ao EAFNp, enquanto que as extrações metanólica e aquosa dos rizomas não demonstraram efeito analgésico no modelo de contorção, demonstrando que os compostos responsáveis pela bioatividade estejam presentes nas folhas e não nos rizomas.

Foi verificado que o EAFNp não é tóxico para os camundongos, já que o tratamento por 8 dias consecutivos na dose de 100 mg/kg, dose 500 vezes maior do que o ED<sub>50</sub>, por via intraperitoneal, não alterou o peso, a celularidade sanguínea, peritoneal e da medula óssea, se comparado aos animais tratados com salina (Amendoeira e cols., 2005a).

A migração de neutrófilos para a cavidade pleural induzida pelo estímulo com LPS, também foi inibida significativamente pelo EAFNp na dose de 20 mg/kg, via i.p. Esta dose

também inibiu a liberação de citocinas como IL-1 e IL-6. Todas as doses testadas neste modelo, (0,2, 2 e 20 mg/kg) foram capazes de inibir a formação de corpúsculo lipídico (compartimentos intracelulares responsáveis pela síntese de vários mediadores inflamatórios). O EAFNp, além de ter reduzido a migração de neutrófilos pelo estímulo de LPS, apresentou o mesmo efeito com estímulos pelo Formil-Metionina-Leucina-Fenilalanina (fMLP) e PAF. PAF também foi utilizado para verificar o efeito do EAFNp na quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*, sendo o extrato capaz de inibir a quimiotaxia na concentração de 0,01 mg/mL (Amendoeira e cols., 2005).

Para a verificação do efeito antialérgico, foi utilizado o modelo de inflamação alérgica pulmonar, onde observou-se que o EAFNp, administrado via i.p. na dose de 2 mg/kg, inibiu a migração de eosinófilos para a cavidade torácica após 6h e 24h de estímulo com ovalbumina (OVA). O EAFNp também foi capaz de inibir a formação de corpúsculos lipídicos nos eosinófilos, 24h após o estímulo e liberação de eotaxina e IL-13. Este efeito antialérgico parece não ser pela via de inibição da enzima COX. *In vitro*, o extrato foi capaz de inibir diretamente a motilidade dos eosinófilos, pois o tratamento com o EAFNp inibiu a migração destas células induzida por PAF e eotaxina (Vieria-de-Abreu e cols., 2005).

Os estudos com EAFNp demonstraram um importante efeito antialérgico do mesmo quando administrado por via intraperitoneal, entretanto, o uso popular das plantas medicinais geralmente consiste na administração oral, e esta é uma via a qual devemos avaliar no contexto de nosso estudo. A inflamação alérgica pulmonar envolve um conjunto complexo de características, como alterações histopatológicas, e de função pulmonar dentre outros, que em nossos estudos iniciais não foram analisados. Outra análise interessante é a comparação entre diferentes formas de preparação do extrato, no intuito de se determinar o extrato com melhor eficiência extrativa, indicada pela maior bioatividade. Neste sentido, quando comparam-se os extratos aquoso, hidroalcoólico e etanólico de *N. procerum* no modelo de inflamação alérgica pulmonar foi observado que o extrato etanólico foi o que melhor inibiu a migração dos eosinófilos para os pulmões (Siqueira, 2008). Desta forma, considerando todo o contexto apresentado, estudos avaliando o extrato etanólico desta planta com melhor elucidação dos seus mecanismos de ação, se fazem necessários.

## 2 – Objetivos

### 2.1 - Objetivo geral

- ✓ Avaliar o efeito do extrato etanólico de *Nidularium procerum* (NpEt) e suas frações na resposta alérgica pulmonar.

### 2.2 - Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito antialérgico de NpEt no modelo murino de inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA;
- ✓ Caracterizar o modelo de asma estabelecida e verificar a manutenção do efeito antialérgico do NpEt neste modelo;
- ✓ Realizar o biomonitoramento através de modelos *in vitro* do fracionamento do NpEt, visando a determinação da fração bioativa;
- ✓ Avaliar e caracterizar o efeito *in vivo* do extrato ou da fração bioativa previamente determinada em modelos *in vitro*.

## 3 – Métodos

### 3.1 – Animais

Camundongos BALB/c, C57BL/6, DO11.10 machos ou fêmeas de 6 a 8 semanas obtidos no biotério central da FIOCRUZ foram utilizados nos diferentes modelos experimentais. Os animais foram mantidos com comida e água *ad libitum*, em uma sala com temperatura entre 22-24°C e um ciclo de 12h de claro e escuro, no biotério de experimentação do Pavilhão Osório de Almeida do IOC/FIOCRUZ. Os procedimentos experimentais foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FIOCRUZ e devidamente registrados sob o Certificado de Licença número L-33/09.

Os animais DO11.10 foram gentilmente cedidos pelo Dr. Marco Aurélio Martins, do laboratório de Inflamação, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ.

### 3.2 - Preparo do extrato etanólico e frações

Este trabalho faz parte de um Projeto de colaboração desenvolvido pelo Laboratório de Imunofarmacologia e o Laboratório de Produtos Naturais 3 (PN-3), de Farmanguinhos/FIOCRUZ. O extrato etanólico e as subfrações foram preparados por Cristiane Cardoso dos Santos e Flávia da Cunha Camillo responsáveis pelo estudo químico de *Nidularium procerum*, sob a supervisão da Dra. Maria Raquel Figueiredo, Chefe do Laboratório PN-3. As folhas de *N. procerum* foram secas em estufa a 41°C com circulação de ar. Após a secagem as folhas foram trituradas em liquidificador, uma porção de cada vez, alternando entre as velocidades alta e baixa.

Ao material vegetal triturado foi adicionado etanol absoluto, na proporção de 1:15, após quinze dias a solução teve o etanol evaporado em rotavapor, originando do extrato etanólico.

As subfrações foram obtidas adicionando solventes de polaridade crescente sendo eles: hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol, dando origem a subfração hexânica (NpEtFH), diclorometância (NpEtFD), acetato de etila (NpEtFAe), butanólcia (NpEtFB), restando um resíduo que foi denominado aquoso (NpEtFAq).

### **3.3 – Análise Cromatográfica**

Para análise do perfil químico dos extratos, utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa em coluna CLC-SIL 250x4,6 mm - 5µm e pré-coluna supelcoguarde - 2cm (Shimpack Engineering Ltd, Southall, London, Inglaterra), ambas com fase C<sub>18</sub>. A composição da fase móvel variou em gradiente linear de ácido trifluoracético 0,05% (eluente A) e acetonitrila (eluente B). Programação do gradiente: modo gradiente de eluição de 3-8% de B em 7min, mantendo 8% de B por mais 6min, de 8-13% de B em 25min, 13 a 25% de B em 40min, de 25 a 40% de B em 50min, de 40 a 60% de B em 55 min mantendo esta proporção por mais 3min, retornando a concentração inicial (3% de B) em 63 min mantendo por mais 12 min. Tempo total de corrida 75 min. A vazão de fase móvel permaneceu a 1,5mL/min. Detecção por varredura de comprimento de onda de 200 a 400 nm, com acompanhamento em 3 comprimentos de onda, 220nm, 260 nm e 340 nm. Os resultados mostram cromatogramas no comprimento de onda de 325nm.

### **3.4 - Estudos *in vivo***

#### **3.4.1 - Inflamação alérgica pulmonar**

O protocolo foi realizado de acordo com Tsuyuki e cols., 1997, com pequenas modificações. Camundongos C57/Bl6 foram sensibilizados via intraperitoneal (i.p.) com ovalbumina (OVA, grau III, Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA) 10 µg/camundongo e hidróxido de alumínio, Al(OH)<sub>3</sub> (Sanofin Synthelabo de Colômbia S. A., Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colômbia) a 10 mg/mL, em solução fisiológica estéril, no dia 1 e 10. Do dia 19 ao dia 24 após a sensibilização, os camundongos foram desafiados por aerolização (Inalamax, NS, São Paulo, SP) diariamente com OVA 2,5%, diluída em salina estéril por 20 min. Aerolização com salina estéril foi realizada como controle negativo. Os tratamentos com extrato etanólico (NpEt), via oral em diferentes doses foram realizados uma hora após cada aerolização, sendo o extrato etanólico dissolvido em etanol a 5% com tween 20 (Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA) a 1% (veículo).

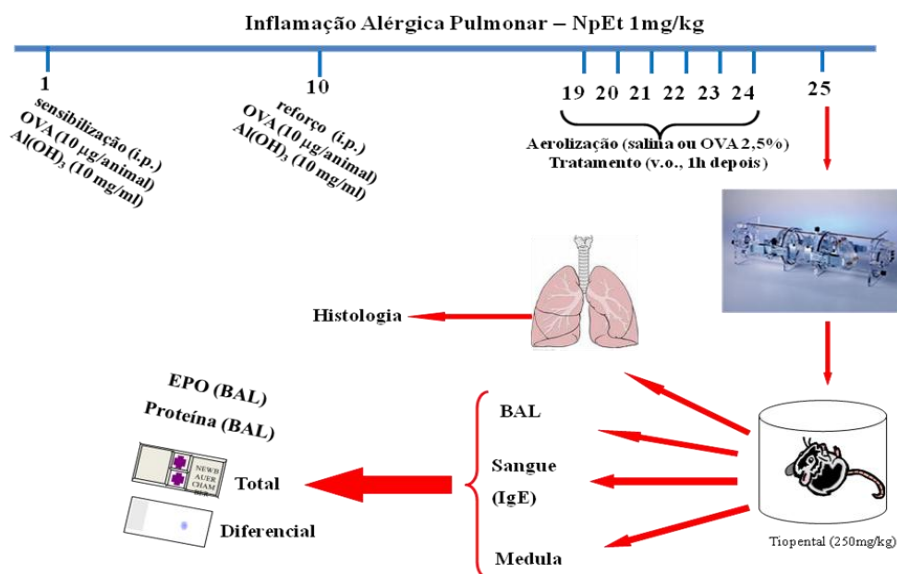


Figura 5: Esquema de protocolo e análises no modelo de Inflamação Alérgica Pulmonar

### 3.4.2 - Inflamação alérgica pulmonar: asma estabelecida

O protocolo foi semelhante ao item 3.4.1. Onde camundongos BALB/c foram sensibilizados via intraperitoneal (i. p.) com ovalbumina (OVA, grau III, Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA) 10 µg/camundongo e hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub> (Sanofin Synthelabo de Colômbia S. A., Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colômbia) a 10 mg/mL, em solução fisiológica estéril, no dia 1 e 10. Do dia 19 ao dia 21 após a sensibilização, os camundongos foram desafiados diariamente com OVA 2,5%, diluída em salina estéril a por 20 min. No dia 22, parte do grupo salina e OVA foram eutanasiados para confirmação e análise e da existência de inflamação alérgica pulmonar. Do dia 22 ao dia 24 os animais restantes continuaram a ser aerolizados, porém com o tratamento de NpEt ou NpEtFAe, uma hora após cada aerolização, sendo os mesmos dissolvidos em etanol a 5% com tween 20 (Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA) a 1% (veículo).

Os animais foram eutanasiados seis horas ou vinte quatro após a última aerolização para análises.

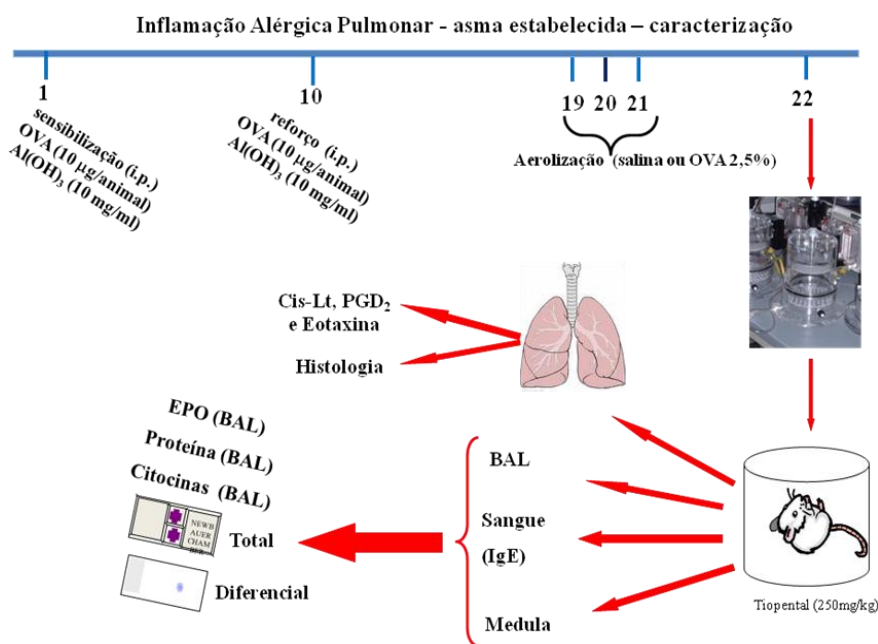


Figura 6: Esquema de protocolo e análises no modelo de Inflamação Alérgica Pulmonar, asma estabelecida, caracterização.

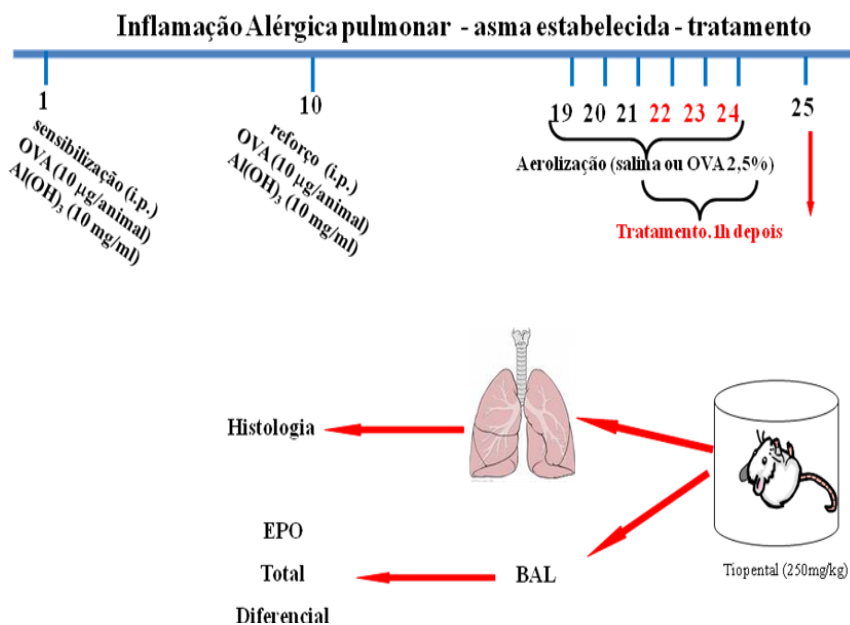


Figura 7: Esquema de protocolo e análises no modelo de inflamação alérgica pulmonar, asma estabelecida, caracterização e tratamento.

### 3.4.3 - Inflamação alérgica pulmonar crônica

O protocolo foi realizado de acordo com Doherty e colaboradores, 2011. Animais foram sensibilizados via intraperitoneal (i.p.) com 50 µg de ovalbumina (OVA, grau VI, Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA) e 0,5 mg de Al(OH)<sub>3</sub> (Sanofin Synthelabo de Colômbia S. A., Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colômbia) por camundongo, em solução fisiológica estéril, no dia 1 e 12. Nos dias 24, 26 e 28 após a sensibilização, os camundongos

foram inicialmente anestesiados levemente com isoflurano (cristália produtos químicos e farmacêuticos, Itapira, SP) e desafiados por instilação (20 µg de OVA diluída em 20 µL de PBS estéril. No dia 29, parte dos animais foram eutanasiados para verificação da inflamação pulmonar aguda. Outras instilações foram realizadas duas vezes por semana por quatro semanas consecutivas com a mesma quantidade de OVA para permitir a progressão da inflamação e conseqüente remodelamento das vias aéreas, sendo os animais eutanasiados 48 h após a última instilação. O tratamento com NpEtFAe foi realizado todos os dias, durante as últimas quatro semanas de desafio, a subfração foi dissolvida em etanol a 5% com tween 20 a 1% (veículo). A verificação de alteração de peso dos animais era realizada ao final de cada semana. Instilação com PBS estéril foi realizada como controle negativo.

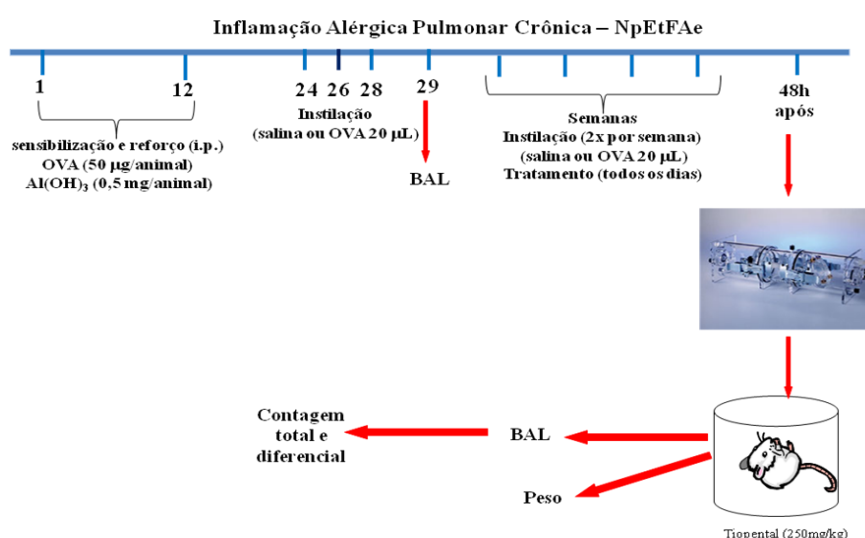


Figura 8: Esquema de protocolo e análises no modelo de inflamação alérgica pulmonar crônica.

### 3.4.4 – Tratamentos e análises

Os animais foram divididos em grupos de acordo com a tabela que se segue:

Tabela 2: Grupos dos animais para o tratamento oral.

Grupo	Sensibilização	Aerolização /instilação	Tratamento
salina	OVA/ Al(OH) <sub>3</sub>	salina	-----
OVA	OVA/ Al(OH) <sub>3</sub>	OVA	Etanol 5% + tween 20 a 1%.
Dexa (Decadron, Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A, Guarulhos, SP)	OVA/ Al(OH) <sub>3</sub>	OVA	Dexametasona (2mg/kg)
NpEt (Extrato etanólico de <i>N. procerum</i> )	OVA/ Al(OH) <sub>3</sub>	OVA	NpEt
NpEtFAe (Subfração acetato de etila )	OVA/ Al(OH) <sub>3</sub>	OVA	NpEtFAe

A próxima tabela mostra os grupos tratados por aerolização, por 20 min. uma hora após a aerolização com OVA:



Tabela 3: Grupos dos animais para o tratamento via areolização.

Grupo	Sensibilização	Aerolização	Tratamento (aerolização)
salina	OVA/ Al(OH) <sub>3</sub>	salina	-----
OVA	OVA/ Al(OH) <sub>3</sub>	OVA	-----
Etanol 1 %	OVA/ Al(OH) <sub>3</sub>	OVA	Etanol a 1%.
Dexa (Decadron, Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A, Guarulhos, SP)	OVA/ Al(OH) <sub>3</sub>	OVA	Dexametasona (2mg/kg v. o.)
NpEt - Extrato etanólico de <i>N. procerum</i>	OVA/ Al(OH) <sub>3</sub>	OVA	Extrato etanólico

Seis, vinte e quatro ou quarenta ou oito horas após a última aerolização/instilação, os animais foram submetidos à análise da hiperreatividade pulmonar. Meia hora após esta análise, os animais foram anestesiados e o sangue foi recolhido via plexo orbital, para determinação da contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos (através de esfregaço sanguíneo) e obtenção do soro (por centrifugação do sangue a 10.000 rpm por 10 min, após coagulação) para análise de IgE. Posteriormente, para análise do lavado bronco alveolar (BAL), pulmão (histologia) e da medula óssea, procedeu-se à eutanásia dos animais utilizando-se uma injeção intraperitoneal de 250 mg/kg de tiopental (cristália produtos químicos e farmacêuticos, Itapira, SP). Para a análise de citocinas os animais foram eutanasiados 6h após o último desafio.

Para obtenção do BAL, a traquéia foi cirurgicamente exposta e canulada, o BAL recolhido injetando-se por duas vezes, 750 µL de PBS com EDTA a 0,1M, num total de 1,5 mL. Para análise da medula óssea, os fêmures das patas traseiras foram extirpados e lavados com 3 mL de meio RPMI 1640 (LGC Biotecnologia, Cotia, SP).

### 3.4.5 – Contagem de leucócitos

A contagem de leucócitos totais foi realizada em câmaras de Neubauer, após a diluição de uma alíquota das amostras (sangue, BAL e medula), com solução Turk (ácido acético 2%). A contagem diferencial dos mononucleares (macrófagos e linfócitos), neutrófilos, e eosinófilos foi realizada usando citospin (Cytospin 3, Shandon Inc. Pitisburg, EUA), para a contagem do BAL e medula, e realização do esfregaço para o sangue. Todas as lâminas foram coradas com May Grünwald/Giemsa (Merck, KGaA, Darmstadt, Alemanha). Contagem foi expressa como número de células/mL.

Na contagem das células da medula, as que não foram identificadas como neutrófilo ou eosinófilos, independente do estágio de maturação, foram agrupadas como “outras”.

### **3.4.6 – Dosagem de proteína**

A dosagem de proteína dos sobrenadantes do BAL (centrifugados a 2.000 rpm por 5 min.) e do pulmão (8.000 rpm por 20 min., diluído 50 vezes em PBS), foram realizadas com o kit BCA de dosagem de proteína (Thermo scientific, Rockford, EUA), no qual as amostras foram dispostas em placas de 96 poços de fundo em U. Logo após, foi adicionado o reagente BCA (1 parte de reagente B com 50 partes de reagente A), na proporção de uma parte de amostra para oito partes de reagente. As placas foram incubadas no escuro, em estufa a 37°C por trinta minutos e lidas em leitora de placa (SpectraMax, Molecular devices, Sunnyvale, EUA) a 562 nm.

### **3.4. 7 – Dosagem de EPO**

Para dosagem da proteína eosinofílica 50 µL do sobrenadante do BAL foram colocados na placa de 96 poços. Para comprovar que a coloração desenvolvida é realmente pela EPO, uma nova alíquota do BAL de cada animal do grupo OVA, foi adicionado 3-amino 1,2,4 triazole (AMT) a 200mM em solução de Tris-HCl. O AMT é um inibidor da EPO e foi colocado nos poços na proporção de 5 µL para cada 45 µL de sobrenadante do BAL.

Foi adicionado aos sobrenadantes com ou sem AMT, 50 µL do substrato OPD (73,64 mL de solução de Tris-HCl (Hidrocloreto de [hidroximetil] aminometano) a 0,05M, pH 8,0, 1 pastilha de dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) e 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (água oxigenada) a 30%, Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA). Aguardou-se 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi parada pela adição de 50 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico) a 4M. A reação foi lida em leitora de placa (SpectraMax, Molecular devices, Sunnyvale, EUA) a 492 nm.

### **3.4.8 - Análise da hiperreatividade brônquica**

Seis, vinte quatro ou quarenta ou oito horas após o último desafio, os animais foram submetidos á análise de hiperreatividade brônquica, pelo método de pletismografia de corpo inteiro (BUXCO Electronics, Inc., Sharon, EUA).

Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao método invasivo de BUXCO, com doses crescentes de metacolina (0, 3, 9 e 27 mg/mL).

Os BALB/cs foram submetidos a método não invasivo de BUXCO com doses de metacolina de 0, 6, 12 e 25 mg/mL, para análise após o terceiro dia de aerolização e o método invasivo, como o realizado com C57BL/6, nos experimentos em que NpEtFAe foi administrada como tratamento.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Inflamação, do Instituto Oswaldo Cruz por Daiana Cristina Oliveira dos Santos, Rafaelle Rodrigues de Almeida e Ana Carolina Santos de Arantes, sob a supervisão dos Drs. Marco Aurélio de Souza Martins e Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins do laboratório de Inflamação, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ.

### **3.4.9 – Sobrenadante pulmonar**

Após a realização do BAL, os pulmões foram retirados e mantidos a -20°C até a realização da dosagem dos mediadores inflamatórios. Para a análise, os pulmões foram descongelados e macerados em solução contendo (PBS com 0,1% de triton X-100) com inibidor de protease Complete (Roche, Mannheim, Alemanha), sempre mantido no gelo. Os sobrenadantes dos pulmões foram obtidos centrifugando o macerado 20 minutos a 10.000 rpm. Os mediadores analisados foram CCL11/Eotaxina, CysLt, e PGD<sub>2</sub>.

### **3.4.10 – Análise histológica**

Os animais, que não foram submetidos ao BAL, foram anestesiados, posteriormente perfundidos com salina e seus pulmões foram retirados e fixados com solução milloning (formol 0,4%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 155 mM e 105 mM de NaOH). Os mesmos foram mantidos nesta solução até a análise histológica. Os processos de desidratação, inclusão, microtomia e coloração foram realizados pelos técnicos em histologia Wellington Nocchi e Fernando Lima.

Para avaliação do infiltrado peribronquiolar, as secções do tecido pulmonar coradas com H&E, foram analisadas com auxílio de um retículo morfométrico, de área conhecida (10<sup>4</sup>/μm<sup>2</sup> no aumento de 1000x), acoplado à ocular de um microscópio de luz (Olympus). O retículo foi ancorado nas vias aéreas de forma aleatória visando sempre à região peribrônquica, evitando regiões próximas de vasos. Em cada via aérea foram selecionadas três áreas diferentes para a contagem dos leucócitos totais e identificação dos leucócitos (eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares). Foram contadas de 6 a 8 vias aéreas de cada animal.

Para avaliação da produção de muco pelas células globet secções foram coradas com ácido periódico de Schiff (PAS), os bronquíolos foram fotografados utilizando microscópio

acoplado a uma câmara fotográfica (Olympus) em objetiva de 40x. Para a captura foi utilizado o software cell<sup>F</sup> (Olympus) e para análise das imagens foi utilizado o software Image Pro Plus, através da quantificação da coloração característica da presença de muco. O mesmo método foi utilizado para análise da deposição de colágeno peribronquiolar através da coloração de picosírius . As imagens mostradas nos resultados foram fotografadas na objetiva de 20x.

### **3.5 - Estudos *in vitro***

#### **3.5.1 - Obtenção de esplenócitos**

Camundongos DO11.10 foram sedados e, logo após, sacrificados. Os baços foram retirados e macerados em meio RPMI 1640 (LGC Biotecnologia, Cotia, SP) completo contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco., Grand Island, NY, EUA), 100 µg/mL de penicilina G, 70 µg/mL de estreptomicina, glutamina a 2 mM e 50 µM de β-mercaptoetanol (Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA). As células isoladas foram suspensas em solução hipotônica (cloreto de amônio a 145 mM, bicarbonato de potássio a 10 mM, ácido etilenodiaminotetracético a 2 mM) e meio de cultura RPMI (50:50), centrifugadas a 1.500 rpm por 5 min. e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes, sendo a última vez realizada apenas com meio.

#### **3.5.2 - Ensaio de citotoxicidade, apoptose e ciclo celular de esplenócitos**

Os esplenócitos foram suspensos em meio RPMI completo e contados em câmara de Neubauer, com azul de tripan para verificação das células viáveis. As suspensões celulares foram preparadas para concentração final de  $1 \times 10^6$  células/mL. As mesmas foram, então, cultivadas em placas de 96 poços de fundo chato, com volume total de 200 µL/poço (para os ensaios de citotoxicidade), com diferentes concentrações de NpEt e subfrações (0,1 1, 10 e 50 µg/mL), na presença ou não de OVA grade III (Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA). na concentração final de 500 µg/mL, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 72h. As soluções estoque do extrato e subfrações foram preparados em meio (NpEtFAq), etanol a 50% (NpEtFB), ou etanol absoluto (extrato de demais subfrações) e então, diluídas com meio

completo para as concentrações finais desejadas. Experimentos controle contendo etanol na concentração final de 0,0625% e dexametasona a 0,05 µg/mL foram desenvolvidos.

A citotoxicidade foi determinada pelo teste de MTT, conforme Mosman e cols., 1983. Nas últimas duas horas de cultura, foram adicionados a cada poço 10µL da solução de MTT (Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA) a 5 mg/mL (em PBS). A reação foi paralisada com a adição de 100µL de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA) a 10% com 0,01 M de HCl. A cultura permaneceu na estufa de um dia para o outro para dissolução dos cristais de formazan. A absorvância foi determinada em leitora de placa (SpectraMax, Molecular devices, Sunnyvale, EUA) no comprimento de onda de 570 nm.

A análise da apoptose foi realizada com o uso do kit I FITC Annexin V de detecção de apoptose (BD Pharmigen, Nova Jersey, EUA). Após o tempo de cultura, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 1 mL de tampão de ligação do kit (Hepes 10 mM /NaOH, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM). Após a contagem e exclusão das células mortas por azul de tripan,  $1 \times 10^5$  células foram retiradas e suspensa em 100 µL de tampão e adicionou-se 5 µL da anexina V e 5 µL de iodeto de propídeo (PI, 100 µg/mL). A solução foi misturada gentilmente, e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, foi adicionado mais 400 µL do tampão de ligação em cada tubo e no prazo de 1h as células foram analisadas por citometria de fluxo, FACScan, com laser de argônio de 488 nm (BD Biosciences, Rockville, MD, EUA), com relação ao tamanho, (*Forward scatter* –FSC) e granulosidade (*Side scatter*-SSC). Além da fluorescência para Anexina (banda  $535 \pm 15$  nm), no canal FL1 e para o PI no canal FL2 ( $585 \pm 15$  nm). Foram analisados 10.000 eventos por amostra.

Para o ciclo celular, após a cultura as células foram lavadas com PBS e contadas. Um milhão células foram centrifugadas (1.500 rpm, 5 minutos), suspensas em 500 µL de PI a 50 µg/mL em tampão citrato a pH 8,2 (43 mM de citrato e Triton X-100 0,3%). As células foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz. Após a incubação, adicionou-se 500 µL de solução de RNase a 100 µg/mL em tampão citrato, com mais 15 minutos de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz sob leve agitação. As células foram analisadas por citometria de fluxo e adquiridos 100.000 eventos de cada amostra.

Foram analisados tamanho (*Forward scatter* –FSC), granulosidade (*Side scatter*-SSC) e fluorescência do PI. Os *debris* e *doublets* de núcleos foram excluídos da análise dos dados, através da delimitação de regiões em gráficos bidimensionais (citogramas) do tipo FSC x SSC e FL3-A (área do pulso de fluorescência) x FL3-W (largura da base do pulso) (Dalmau e cols., 1999).

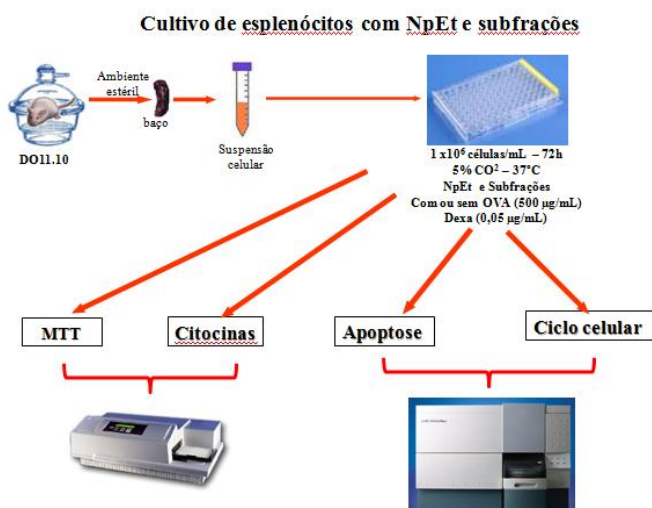


Figura 9: Esquema de protocolo e análises do cultivo de esplenócitos.

### 3.5.3 – Ativação de mastócitos

Para o estudo do potencial efeito do NpEt e subfrações sobre a ativação mastocitária foram utilizadas células da linhagem HMC-1. Após serem retiradas da garrafa, células HMC-1, foram centrifugadas a 600 rpm por 10 min com meio IMDM (Gibco., Grand Island, NY, EUA) contendo 10% d SFB (Gibco., Grand Island, NY, EUA), 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de glutamina e 1,2 mM  $\alpha$ -tioglicerol (Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA). Após a lavagem e contagem  $2 \times 10^6$  células/mL foram plaqueadas em 900 µL na placa de 24 poços. As células permaneceram na estufa, por pelo menos uma hora. Após este tempo, foram acrescentados à cultura, NpEt ou as subfrações nas dose de 50 µg/mL ou 100 µg/mL. As células foram ativadas com o ionóforo de cálcio A23187 a 1 µM e forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) a 50 nM (ambos, Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA). Células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 8 horas. Após a incubação os sobrenadantes foram recolhidos para análise das citocinas IL-6, IL-8, IL-13. E ao *pellet* foi adicionado tampão (10mM de tris-HCl, 150mM de NaCl, 0,1mM de EDTA e 10% de glicerol) para avaliação da expressão de COX2, pelo método de *western blotting*.

Para a avaliação da citotoxicidade, foi utilizado o método de MTT mencionado no item 3.5.2, onde as células foram cultivadas em HBSS contendo cálcio e magnésio com 2 mM de glutamina a  $4 \times 10^5$  células por poço, em 200 µL em placa de 96 poços de fundo chato. O MTT foi adicionado à cultura 4 horas antes do término da mesma.

### 3.5.4 – Western blotting

O *pellet* obtido no item 3.5.3 foi descongelado e sonicado por 10 min. Após este procedimento, o mesmo foi centrifugado a 13.200 rpm a 4°C e o sobrenadante foi retirado para dosagem de proteína pelo método de BCA e para a análise de *western blotting*. Foi adicionado aos sobrenadantes tampão de amostra (Tris-HCl a 156,25mM, glicerol a 25%,  $\beta$ -mercaptoetanol a 18,5% e SDS a 5% em pH 6,4) e levados a fervura em banho seco por 10 min.

As amostras foram colocadas para correr em gel de acrilamida a 10%. No sistema de transferência da BioRad (Hercules, CA, EUA). A 16 mA. Após a corrida, o sistema foi desmontado e as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em tampão de transferência (25Mm de Tris-HCl com pH 8.3, 192 mM de glicina e 20% de etanol) a 4°C, por 1 hora e 30 min. A membrana foi bloqueada com 10mL de TBS (10mM de Tris-HCl a pH 8,0, 150mM de NaCl) com tween 20 0,1% e 5% de leite desnatado por uma hora a temperatura ambiente sob leve agitação. Após este tempo, foi adicionado o anticorpo primário permanecendo durante a noite a 4°C sob leve agitação. Terminada a incubação, a membrana foi lavada 5 vezes com TBS-tween por 2 min cada lavagem, sob rápida agitação. Após a lavagem, o anticorpo secundário conjugado com Peroxidase, foi incubado por uma hora a temperatura ambiente, sob agitação. Após este período a membrana foi lavada por mais cinco vezes com TBS tween e após 3 vezes somente com TBS. As bandas de proteínas foram visualizadas com o kit de quimioluminescência PICO (Thermo scientific, Rockford, EUA).

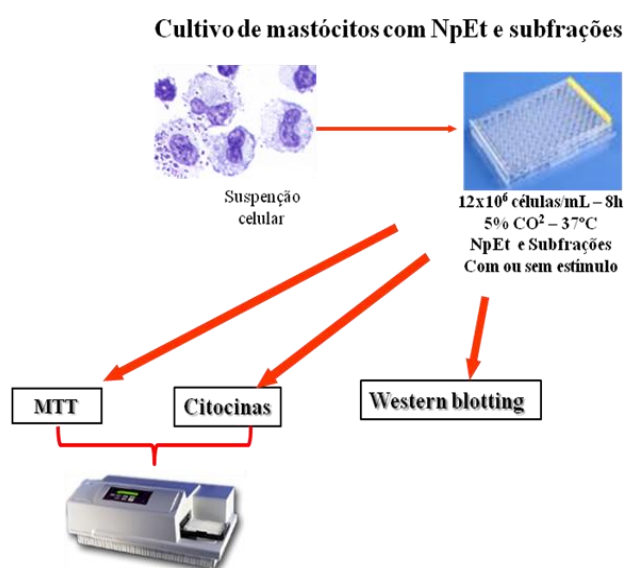


Figura 10: Esquema de protocolo e análises do cultivo de mastócitos.

### **3.5.5 – Cultura de eosinófilos**

Os eosinófilos foram diferenciados de medula óssea de camundongos BALB/c de acordo com Dyer e cols., 2008. Em ambiente estéril os fêmures e tíbias dos animais foram lavados com RPMI (Gibco., Grand Island, NY, EUA). As células foram centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos e as hemáceas foram lisadas adicionando-se primeiro água destilada e depois PBS 10x e centrifugadas novamente. As células foram então suspensas em meio completo com 20% de SFB (Gibco., Grand Island, NY, EUA), 100 IU/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de glutamina, 25 mM de HEPES, 50 µM e β-mercaptoetanol (Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA), aminoácidos não essenciais 1x (Lonza Rockland Inc, Rockland, Me, EUA) e 1mM de piruvato de sódio (Hyclone, Logan, UT, EUA). As suspensões celulares foram contadas e ajustadas a  $1 \times 10^6$  células /mL e suplementados com 100ng /mL de fator de célula embrionária (SCF) e 100 ng/mL de ligante de Tirosina quinase 3 relacionado à FMS (FLT3-L), (PeproTec, Rocky Hill, NJ,EUA), do dia 0 ao dia 4.

No dia 4 as células foram retiradas da garrafa, centrifugadas e contadas. O meio contendo SCF e FLT-3 foi substituído por meio completo fresco, contendo recombinante de IL-5 (R&D systems, Minneapolis, EUA) a 10 ng/mL e as células retornaram a garrafa de cultura de origem. No dia 8, as células foram retiradas, contadas, centrifugadas e ressuspendidas em meio RPMI completo contendo 10 ng/mL de IL-5 e incubadas em garrafa novas. Nos dias 10 e 12 metade do meio foi substituído por meio fresco contendo IL-5, sempre ajustando a  $1 \times 10^6$  células/mL. Durante as trocas de meio 50.000 células foram recolhidas e submetidas ao citospin (Cytospin 3, Shandon Inc. Pitisburg, EUA), para a verificação da maturação dos eosinófilos. Os ensaios com os eosinófilos foram realizados no dia 14.

### **3.5.6 – Análise da ativação dos eosinófilos**

Foram incubados  $3 \times 10^6$  eosinófilos/mL em 300 µL de HBSS com cálcio e magnésio (Gibco, Grand Island, NY, EUA), por 30 min em temperatura ambiente com NpEt e subfrações em diferentes concentrações. Após a incubação, eotaxina/CCL11 (R&D systems, Minneapolis, EUA), na concentração final de 10 ng/mL foi acrescentada nas amostras, permanecendo por 1h em banho-maria a 37°C, sob leve agitação. Uma alíquota das amostras foram colocadas na citospin para posterior análise da produção de corpúsculo lipídico.

Para análise da apoptose foi realizado o protocolo semelhante ao item 3.5.2.



### 3.5.7 – Coloração e contagem de corpúsculo lipídico

Ao serem retirados da citospin, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em formalina a 3,7%, pH para 7,4 e mantidas nesta solução até a coloração.

Na capela, as lâminas foram lavadas com água destilada, o excesso de água foi retirado e pingou-se uma gota de ácido cacodílico a 3% (Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA) e logo após, ósmio a 1,5% (Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA). As lâminas foram mantidas por 30 min no escuro. Após este tempo, o excesso de ósmio foi retirado e duas gotas de solução de tiocarbohidrazida (TCH, Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA) a 0,3% foi adicionada as células, permanecendo por 3 min ao abrigo da luz. Depois, o TCH foi descartado e pingou-se uma gota de ácido cacodílico e uma gota de ósmio permanecendo no escuro por 5 min. Após o processo de coloração, as lâminas foram lavadas com água destilada e secas a temperatura ambiente. Foram contadas o número de corpúsculos em 50 células de cada condição em microscópio ótico, com objetiva de 100x em óleo de imersão.

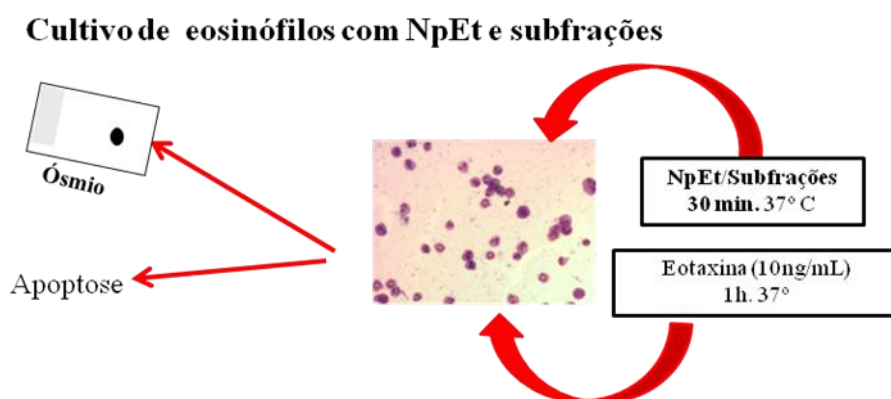


Figura 11: Esquema de protocolo e análises do cultivo de mastócitos.

### 3.5.8 – Cultura de HepG2

As células HepG2, um tipo hepatoma humano foram cultivadas em meio DMEM – com pouca glicose (LGC Biotecnologia, Cotia, SP), contendo 1% de glutamina e 10% de SFB a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após a cultura alcançar o estado de 80 a 100% de confluência, o meio foi retirado, a cultura foi lavada 3 vezes com PBS e a solução de tripsina a 0,25% (Gibco., Grand Island, NY, EUA), foi adicionada e mantida nas células por 5 min. na estufa. Ao verificarmos o completo destacamento das células da garrafa, meio com SFB foi adicionado na proporção

1:1. As células foram centrifugadas a 1.700 rpm por 8 min. e ressuspensas em meio completo e plaqueadas em placa de 96 (600.000 células em 200 µL). A cultura permaneceu na estufa por 24h. Após este período, o meio foi trocado e foi adicionado à mesma o extrato e subfrações, permanecendo na estufa por mais 24 h.

### **3.6 - Dosagem de mediadores inflamatórios**

#### **3.6.1 - ELISA**

A dosagem das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-13, IFN- $\gamma$ , RANTES, foi realizada em sobrenadantes de esplenócitos cultivados como no item 3.5.1 ou mastócitos (3.5.3), ou de sobrenadantes do BAL obtidos seis horas após a última aerolização. Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS (pH 7,4), colocados em placa de 96 poço, (50 µL/poço) e deixados de um dia para o outro em geladeira. Depois as placas foram lavadas 4 vezes com 100 µL de PBS/tween 0,05%, bloqueadas com uma solução de PBS e BSA a 1% e incubadas a temperatura ambiente por 1h. Após esta incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS/tween 0,05%. As amostras e os padrões (diluídos em PBS/BSA 1%), foram adicionados a placa (50 µL/poço) e estas incubadas novamente de um dia para o outro, a 4°C. Após este procedimento as placas foram lavadas 4 vezes com PBS/Tween e os anticorpos de detecção, biotinizados, foram adicionados à placa (50 µL/poço). Após incubação por 1h a temperatura ambiente e mais algumas lavagens, a avidina peroxidase foi diluída (1:200) em PBS/BSA/Tween, 50 µL/poço foram adicionados à placa e esta foi incubada por 30 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A placa foi revelada com 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA). A reação foi paralisada com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,4N. A placa foi lida em espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax, Molecular devices, Sunnyvale, EUA) no comprimento de onda de 450 nm.

#### **3.6.2 – Dosagem de IgE total**

A dosagem do anticorpo do tipo IgE, foi realizada em amostras de soro dos camundongos obtidos no item 3.4.1 e 3.4.2. O anticorpo de captura foi diluído em PBS (pH 7,4), colocados em placa de 96 poço, (50 µL/poço) e deixados de um dia para o outro em geladeira. Depois as placas foram lavadas 3 vezes com 100 µL de PBS/tween 0,05%,

bloqueadas com uma solução de PBS e SFB a 10% e incubadas a temperatura ambiente por 1h. Após esta incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS/tween 0,05%. As amostras e os padrões (diluídos em PBS/SFB 10%) foram adicionados a placa (50 µL/poço) e estas incubadas novamente de um dia para o outro, a 4°C. Após este procedimento as placas foram lavadas 5 vezes com PBS/Tween e os anticorpos de detecção e a enzima avidina peroxidase, foram adicionados à placa (50 µL/poço). Após incubação por 1h a temperatura ambiente, ao abrigo da luz e mais 7 lavagens. A placa foi revelada com 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo, EUA). A reação foi paralisada com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,4N. A placa foi lida em espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax, Molecular devices, Sunnyvale, EUA) no comprimento de onda de 450 nm.

### **3.6.3 – Dosagem de Eotaxina/CCL11**

A dosagem de eotaxina foi realizada em sobrenadantes de macerado de pulmões obtidos no ítem 3.4.2. Na placa de 96 poços contendo anticorpo de captura (Minneapolis,MN), foram colocados 50 µL do diluente RD1-21 em todos os poços. Após, foi adicionado 50 µL da curva padrão, controle e amostras na placa. A mesma foi deixada de um dia para o outro em geladeira. Depois as placas foram lavadas 5 vezes com 400 µL de tampão de lavagem. Terminada a lavagem, 100 µL por poço de anticorpo conjugado de eotaxina murina, foi colocado em todos os poços, a placa foi coberta e incubada por 2h em temperatura ambiente. Após esta incubação, as placas foram lavadas novamente. Após as lavagens, Adicionou-se 100 µL de solução de substrato em cada poço incubou-se a placa por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi paralisada com 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,4N. A placa foi lida em espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax, Molecular devices, Sunnyvale, EUA) no comprimento de onda de 450 nm.

### **3.6.4 - Dosagem de CisLt e PGD<sub>2</sub>**

Para a dosagem de PGD<sub>2</sub>, O padrão e as amostras foram transformados em PGD<sub>2</sub>-MOX, adicionando-se aos mesmos o reagente fornecido pelo fabricante que contém hidrocloreto de metoxilamida, na proporção de 1:1. Essa mistura foi aquecida a 60°C por 30 minutos. Nas placas contendo anticorpo de captura (Cayman, Chemical Co., Ann Arbor, MI, EUA), foram adicionadas 50 µL de tampão do ensaio imunoenzimático (EIA), 50 µL das amostras ou do padrão, 50 µL de PGD<sub>2</sub>-MOX acetil colinesterase (AChE) tracer, 50 µL de antissoro EIA PGD<sub>2</sub>-MOX.

Para a dosagem de CisLT, foram adicionadas nas placas contendo anticorpo de captura (Cayman, Chemical Co., Ann Arbor, MI), 50 µL de tampão do ensaio imunoenzimático (EIA), 50 µL das amostras ou do padrão, 50 µL de CisLT acetil colinesterase (AChE) tracer, 50 µL de anticorpo monoclonal.

Para ambos os EIAs, As placas foram cobertas e incubadas de um dia para o outro a 4°C. Após este tempo as placas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem. Depois, 200 µL do reagente de Ellman's foi adicionado e as placas foram protegidas do escuro e deixadas em agitação por até duas horas. As placas foram lidas em espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax, Molecular devices, Sunnyvale, EUA) no comprimento de onda de 405 nm.

### **3.7-Análise estatística**

A análise de variância dos resultados entre os grupos foi realizada pelo teste One-way ANOVA, sendo a significância das diferenças entre os grupos, avaliada pelo teste de Newman-Kewls-Student, Bonferroni ou test *t* de Student para os experimentos *in vivo*. Para os experimentos *in vitro*, foram utilizados os métodos de Tukey. As diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas significativas. Os resultados foram representados como média±erro padrão da média (EPM) ou média±desvio padrão da média (DP).

## 4 - Resultados

### 4.1- Inflamação alérgica pulmonar: curva dose resposta de NpEt

Para avaliar a eficácia do tratamento de NpEt, foi realizada uma curva dose-resposta, utilizando o modelo de inflamação alérgica pulmonar desenvolvido por Tsuyuki e cols., 1997, com pequenas modificações. Este modelo mimetiza algumas características da asma em humanos, como infiltrado inflamatório nos pulmões, produção de muco pelas células globet, hiperreatividade brônquica, além da liberação de diversas citocinas relacionadas a doenças alérgicas.

Quando os animais foram desafiados com OVA e tratados apenas com o veículo de diluição do extrato (etanol a 5% com tween 20 a 1%), ocorreu um aumento no número total de células (grupo OVA, 84%) em relação aos animais que foram desafiados apenas com salina (grupo salina). O tratamento com dexametasona a 2mg/Kg (grupo dexametasona) foi capaz de inibir a migração de células totais (67%) e eosinófilos em 83% para os pulmões. Neste resultado de curva dose resposta, foi observado que a dose de 1mg/kg foi a que melhor inibiu a migração das células totais (58%) em comparação a dose de 0,1 mg/kg (32,5%) e 10mg/kg (13%). Com relação aos eosinófilos, apenas a dose de 1mg/kg foi capaz de inibir significativamente a migração destas células (46%), como mostrado na figura 12.

Além da migração de células, na reação inflamatória, também ocorre o aumento da permeabilidade vascular com conseqüente extravasamento de plasma, causando edema pulmonar. Por isso, avaliamos o conteúdo total de proteínas no BAL dos camundongos. Vimos que o grupo OVA apresentou um aumento de 135% no conteúdo de proteína, comparado ao grupo salina. O tratamento com NpEt a 1 mg/kg também foi capaz de inibir o extravasamento de proteína para o BAL em 31%, enquanto que houve inibição de 42% nos animais tratados com dexametasona (figura 13). Este resultado possui perfil semelhante com o encontrado na figura 12, mostrando a relação entre extravasamento de proteína e migração de células inflamatórias para os pulmões, ou seja, NpEt foi capaz de impedir disrupção das junções entre as células epiteliais e permitir a migração das células.

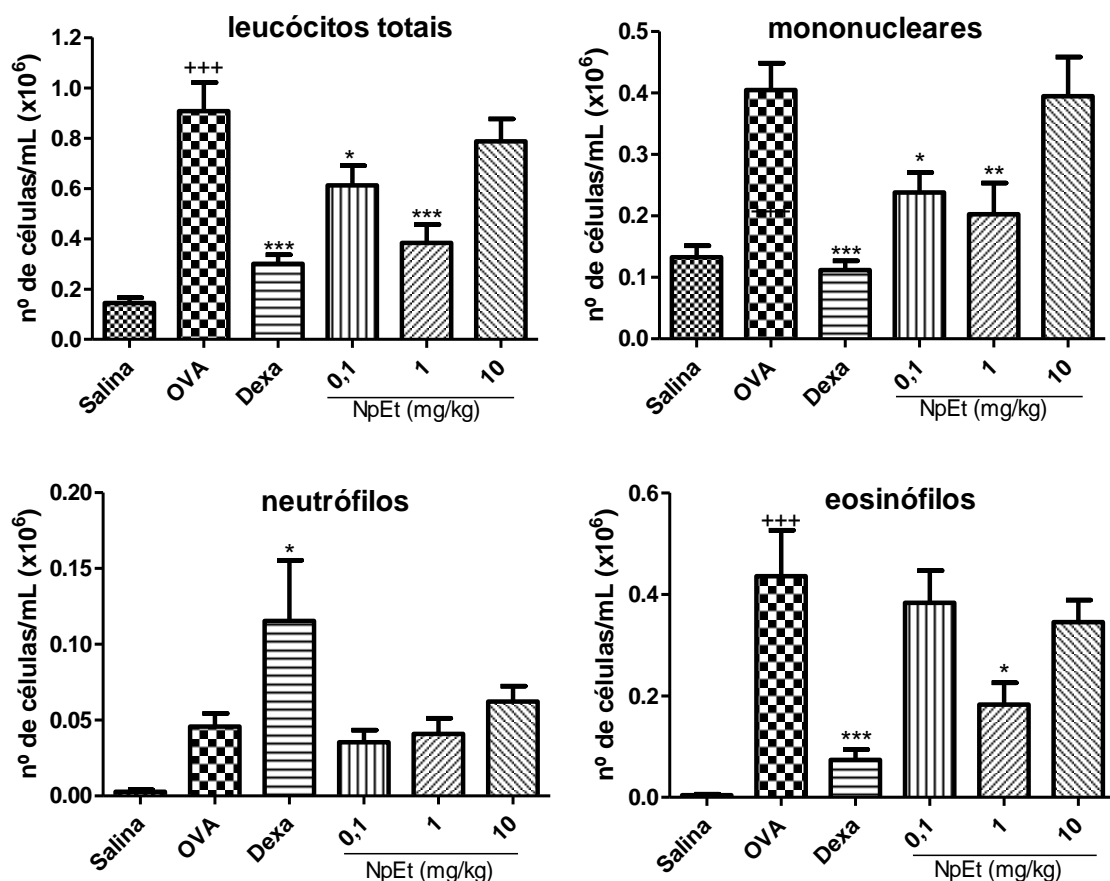


Figura 12: Efeito de NpEt sobre a celularidade no lavado bronco alveolar (BAL) de camundongos submetidos ao de modelo de inflamação pulmonar alérgica. Camundongos C57BL/6 receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu$ L) de OVA (10 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados 1h após cada desafio com diferentes doses NpEt e dexa (2m/kg), v.o. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ EPM de pelo menos dois experimentos (n de 10 a 15 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++p<0,001 em relação ao grupo salina, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo OVA.

Como a dose de 1mg/kg foi a que melhor inibiu a migração de células inflamatórias, principalmente de eosinófilos para os pulmões, utilizamos esta dose para experimentos e análises posteriores.

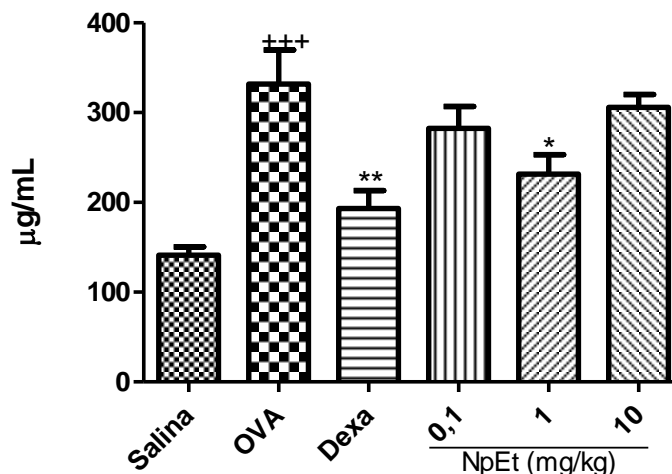


Figura 13: Efeito do tratamento com NpEt sobre o acúmulo de proteínas no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica. Camundongos C57BL/6 receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por Aerolização e tratados 1h após cada desafio com diferentes doses NpEt e dexa (2mg/kg), v.o. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de pelo menos dois experimentos (n de 10 a 15 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++p<0,001 em relação ao grupo salina, \*p<0,05, \*\*p<0,01 em relação ao grupo OVA.

Para confirmarmos a redução do número de células que migram para os pulmões, analisamos estes órgãos histologicamente (figura 14), através de coloração com hematoxilina & eosina (H&E). Com base nesta análise, observamos que houve um aumento de 23% tanto de células totais quanto de mononucleares do grupo OVA em relação ao grupo salina. Comparativamente, o tratamento com NpEt inibiu de forma mais efetiva (em torno de 25%) estes aspectos do que o tratamento com dexametasona (5%), embora não tenha se demonstrado estatisticamente significativo (figura 15). Em se tratando dos eosinófilos surpreendentemente houve um aumento destas células nos animais tratados com dexametasona, mas o tratamento com NpEt foi capaz de inibir a migração destas células em 75% (figura 15). Estes dados corroboraram com os resultados observados no BAL (figura 12). Além do infiltrado de células inflamatórias pronunciado ao redor dos bronquíolos, observamos alteração na morfologia das células epiteliais pulmonares e presença de infiltrado de células também na área perivascular. Tanto o tratamento com dexametasona quanto com NpEt inibiram estes aspectos.

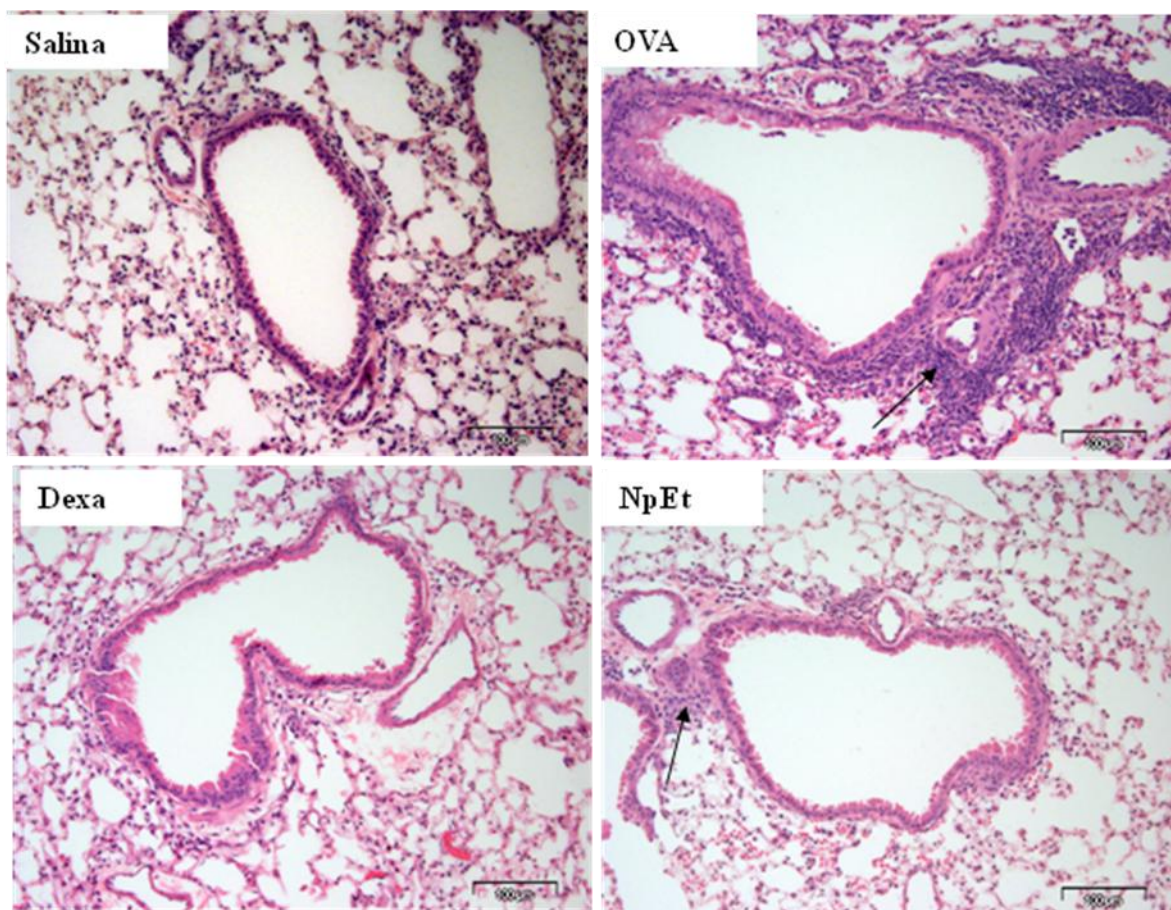


Figura 14: Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica (coloração com H&E). Camundongos C57BL/6 receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados 1h após cada desafio com NpEt (1m/kg) e dexa (2m/kg), v.o. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Imagens representativas da figura 15. Barra de escala 100 µm. Setas indicam acúmulo de células inflamatórias.

Para analisar a produção de muco pelas células globet os pulmões foram corados com ácido periódico Schiff (PAS). Na figura 16 e 17 demonstramos que o grupo OVA apresentou uma elevada quantidade de células produtoras de muco metaplásicas em relação ao grupo salina e que ambos os tratamentos inibiram a metaplasia destas células (95% para o tratamento com dexametasona e 83% para o tratamento com NpEt). A figura 17 representa fotomicrografias representativas dos gráficos da figura 16.



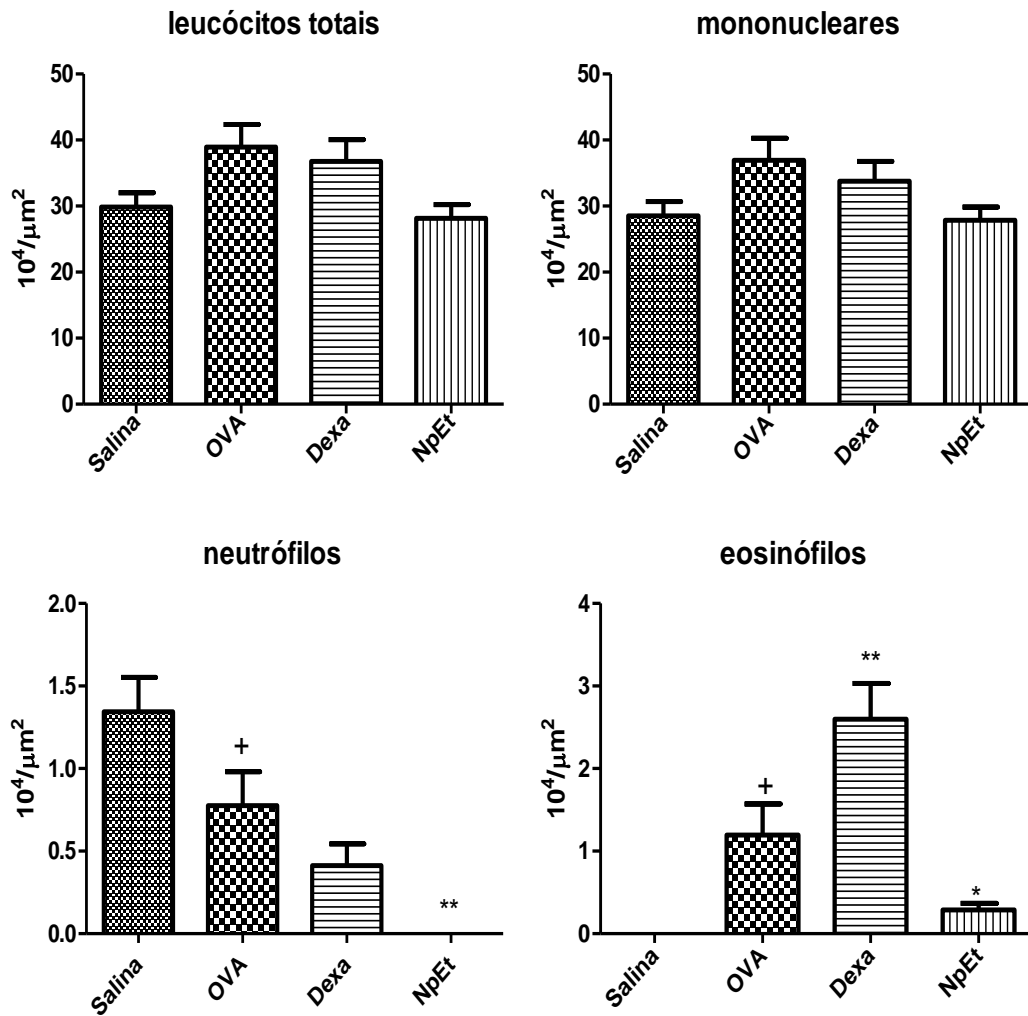


Figura 15: Análise do infiltrado peribronquiolar nos pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica (coloração com H&E). Camundongos C57BL/6 receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu\text{L}$ ) de OVA (10 $\mu\text{g}$ ) e  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados 1h após cada desafio com NpEt (1m/kg) e dexa (2m/kg), v.o. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ EPM de 3 pulmões (6 bronquíolos por pulmão). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. + $p<0,05$  em relação ao grupo salina, \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  em relação ao grupo OVA.

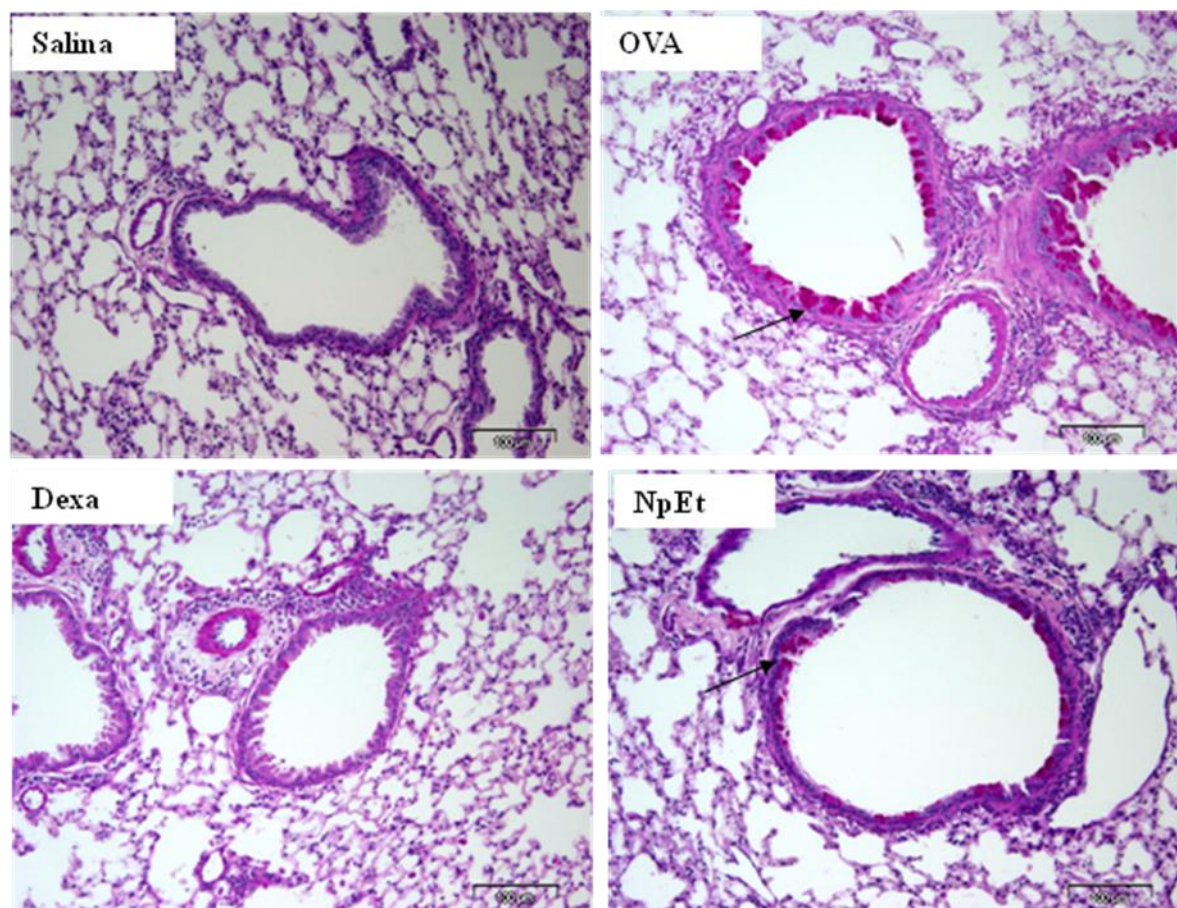


Figura 16: Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica (coloração com PAS). Camundongos C57BL/6 receberam via i. p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu$ L) de OVA (10 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados 1h após cada desafio com NpEt (1m/kg) e dexa (2m/kg), v.o. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Imagens representativas da figura 17. Barra de escala 100  $\mu$ m. Setas indicam acúmulo células globets metaplásicas.

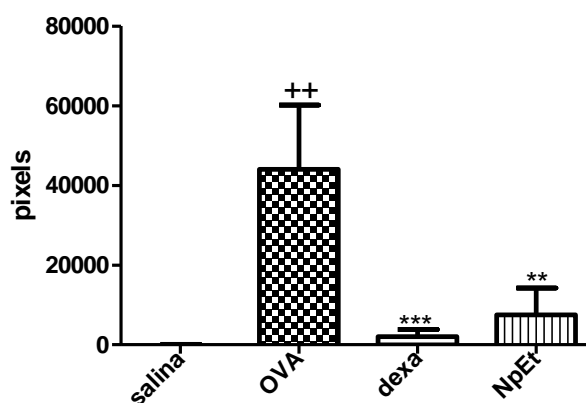


Figura 17: Análise da produção de muco em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica (coloração com PAS). Camundongos C57BL/6 receberam via i. p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu$ L) de OVA (10 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados 1h após cada desafio com NpEt (1m/kg) e dexa (2m/kg), v.o. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ EPM de 3 pulmões (mais de 10 bronquíolos por pulmão). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. ++p<0,01 em relação ao grupo salina, \*\*0p<0,01, \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo OVA.

O tratamento com NpEt também melhorou a função pulmonar dos camundongos, como mostrado na figura 18. O extrato aumentou significativamente a capacidade de expansão dos pulmões (complacência) em relação ao grupo OVA, principalmente na última dose de metacolina (27 mg/mL). Além da baixa complacência, os camundongos asmáticos (grupo OVA) apresentam pulmões também com alta resistência e elastância, ou seja, os pulmões têm dificuldade de se expandir e contrair durante a inspiração e expiração. Com relação à resistência, o tratamento com NpEt melhorou a mesma em 40,5%, melhor que o grupo tratado com dexametasona que apresentou inibição em 22%, ambos na dose de 27 mg/mL de metacolina. Com relação à elastância, NpEt apresentou efeito semelhante às outras análises: inibiu em 66% a elastância em relação ao grupo OVA, novamente mais eficaz que dexametasona (29%).

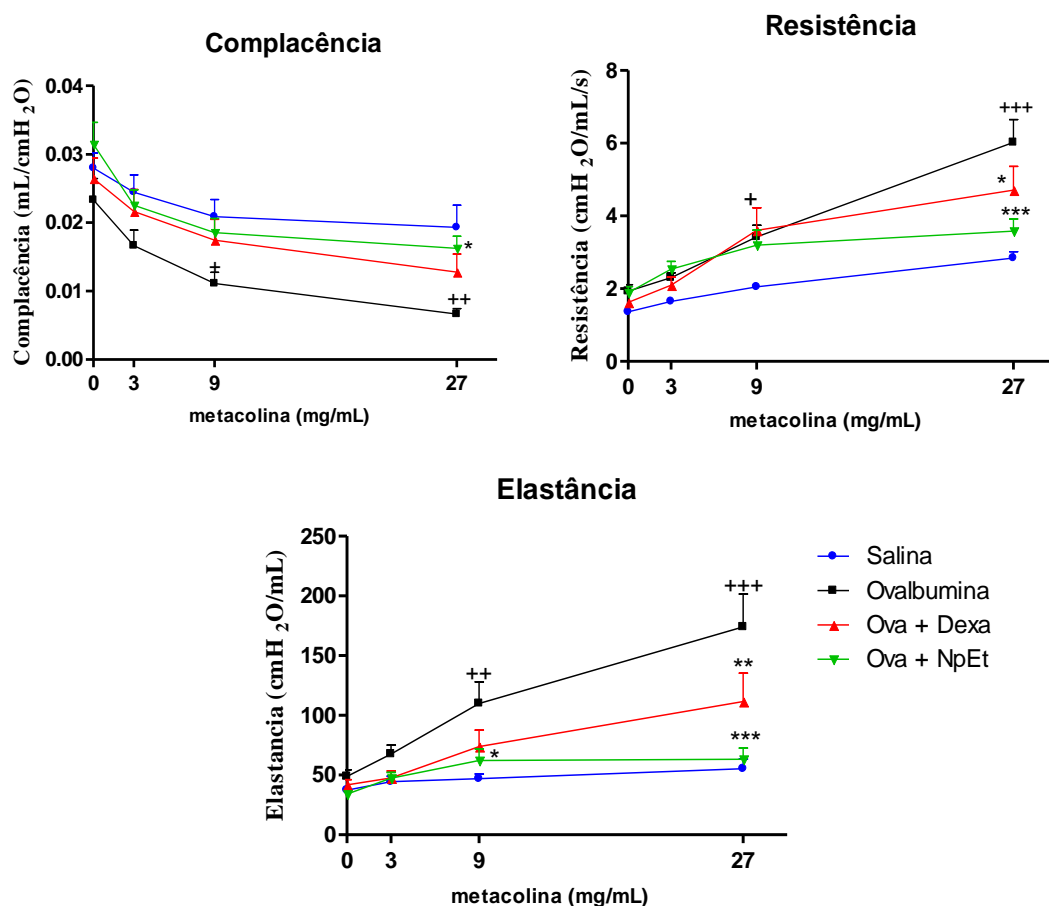


Figura 18: Efeito do tratamento com NpEt sobre a hiperreatividade brônquica em camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica através do sistema de BUXCO invasivo. Camundongos C57BL/6 receberam via i. p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu$ L) de OVA (10 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados 1h após cada desafio com NpEt (1 mg/kg) e dexa (2m/kg), v.o. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ EPM de dois experimentos (n de 10 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. + p<0,05, ++p<0,01, +++ p<0,001 em relação ao grupo salina, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo OVA.

Buscando investigar melhor como NpEt inibe a migração dos eosinófilos para os pulmões, analisamos, além do BAL, a medula para verificarmos se há uma diminuição na produção destas células e o sangue para analisarmos a liberação dessas células na corrente sanguínea, nos camundongos alérgicos tratados com NpEt. Na figura 19, observamos uma diminuição de 26% do número de leucócitos totais entre o do grupo dexametasona em relação ao OVA. Em se tratando dos eosinófilos, a aerolização causou um aumento de 25% em relação ao salina, o tratamento com dexametasona diminuiu 33% e com NpEt 23% porém esses dados não foram significativos estatisticamente.

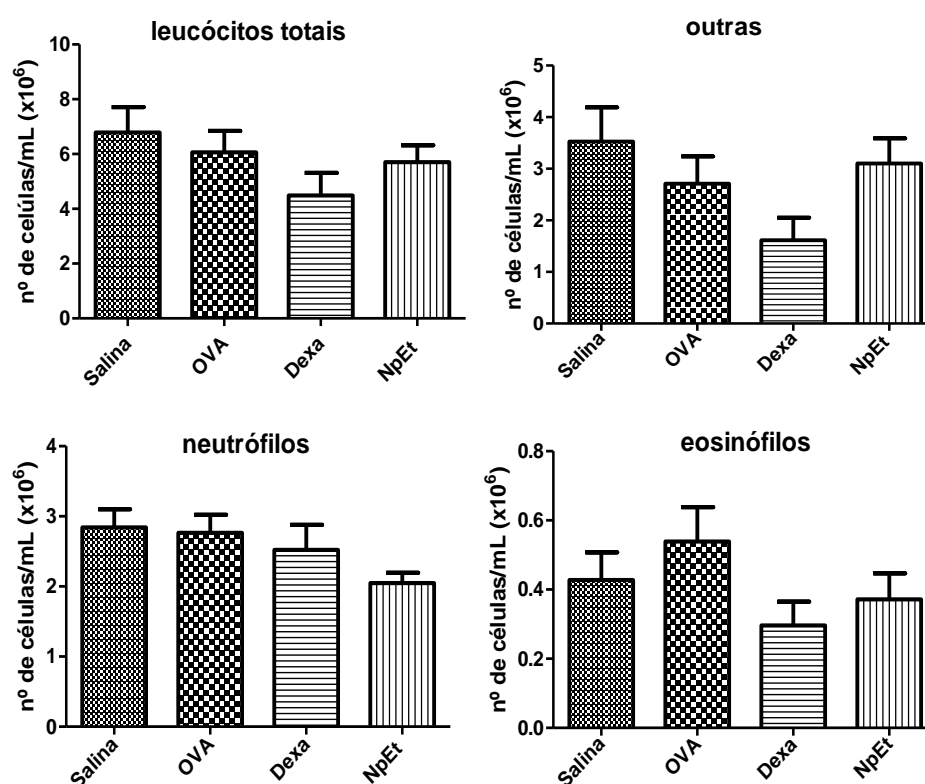


Figura 19: Efeito de NpEt sobre a celularidade na medula de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica. Camundongos C57BL/6 receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu$ L) de OVA (10 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 minutos com OVA (2,5%) por aerolização e tratados 1h após cada desafio com NpEt (1m/kg) e dexa (2m/kg), v.o. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ EPM de pelo menos dois experimentos (n de 10 a 15 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls.

No sangue, houve uma diminuição significativa de 64% dos leucócitos circulantes do grupo OVA em relação ao grupo salina, mas o tratamento com NpEt não causou mudanças no número de leucócitos na corrente sanguínea. O mesmo foi observado com relação aos eosinófilos (figura 20). O tratamento com dexametasona acarretou um aumento de neutrófilos

e eosinófilos em relação ao grupo OVA, porém NpEt não causou mudanças significativas em relação ao mesmo.

A dosagem de IgE também nos mostrou apenas uma tendência, onde a OVA induziu um aumento em 30% em relação ao salina. O tratamento com dexametasona causou uma ligeira diminuição (15%), enquanto que NpEt não alterou a liberação deste anticorpo (figura 21).

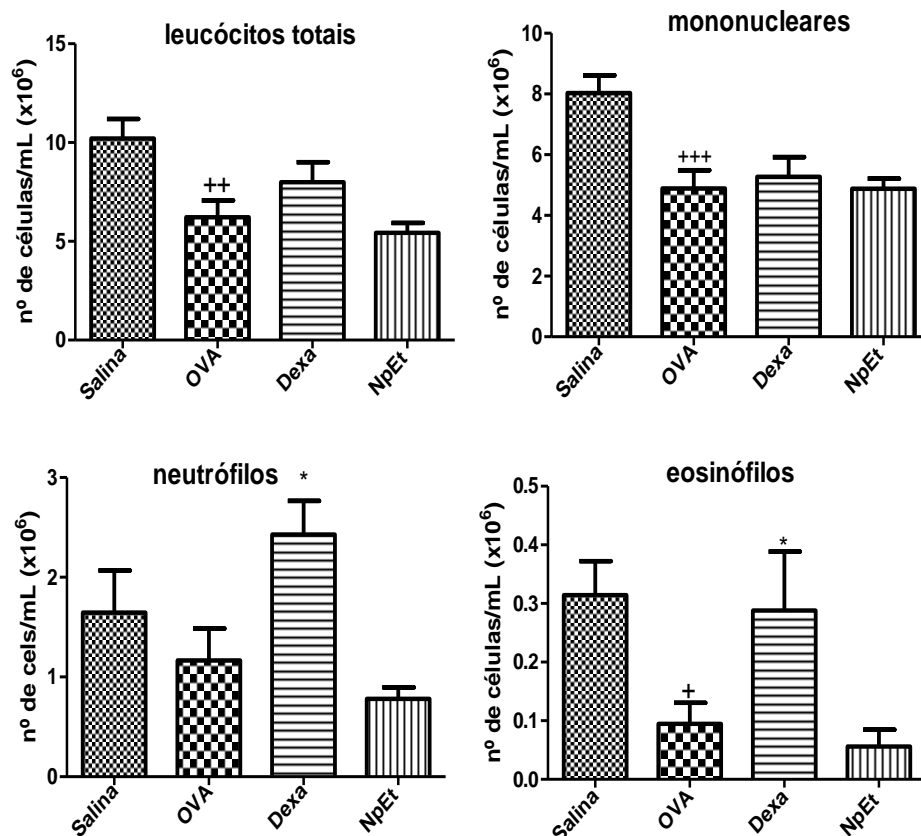


Figura 20: Efeito de NpEt sobre a celularidade no sangue de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica. Camundongos C57BL/6 receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu$ L) de OVA (10 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados 1h após cada desafio com NpEt (1m/kg) e dexa (2m/kg), v.o. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ EPM de pelo menos dois experimentos (n de 10 a 15 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++p<0,001, ++p<0,05 em relação ao grupo salina, \*p<0,05 em relação ao grupo OVA.

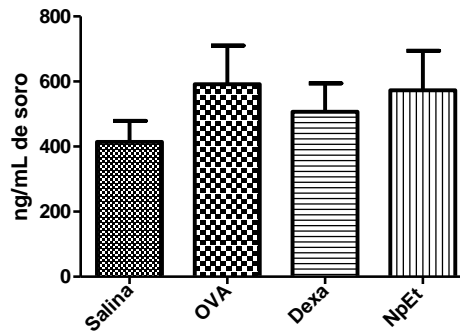


Figura 21: Efeito de NpEt sobre da liberação de IgE no soro de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica. Camundongos C57BL/6 receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu$ L) de OVA (10 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por Aerolização e tratados 1h após cada desafio com NpEt (1 m/kg) e dexta (2 m/kg), v.o. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ EPM de pelo menos dois experimentos (n de 10 a 15 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. Estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++p<0,001, +p<0,05 em relação ao grupo salina, \*p<0,05 em relação ao grupo OVA.

#### 4.2- Inflamação alérgica pulmonar: caracterização da asma estabelecida

Visto a eficiência no extrato etanólico de *N. procerum* em inibir características importantes da asma, averiguamos se o mesmo seria eficiente no modelo de asma estabelecida, para verificar se uma vez instalado o quadro de inflamação o extrato ainda possui a propriedade de inibir as principais características desta doença. Utilizamos os animais da linhagem BALB/c por estes animais responderem melhor a estímulos alérgicos. Neste modelo, os animais são aerolizados por três dias sem tratamento algum para indução da inflamação e nos últimos três dias de aerolização, os camundongos passaram a receber tratamento. Mas primeiramente, analisamos os animais 24h após o terceiro dia de desafio para verificarmos se os mesmos apresentavam realmente as reações inflamatórias características da asma. Na figura 22 após três dias de aerolização, observamos um aumento significativo no número de células no BAL dos animais que foram aerolizados com OVA em relação ao grupo salina. Podemos destacar que os valores de eosinófilos passaram de 0 no grupo salina para uma média de  $0,20 \times 10^6 \pm 0,03 \times 10^6$  células no grupo OVA. O aumento no número de eosinófilos foi correlacionado com o aumento significativo da liberação de EPO por essas células no sobrenadante do BAL em 68%, observado na figura 24. Para nos certificarmos que o aumento da D.O. seja pela EPO, utilizamos uma solução de 3-amino 1,2,4 triazole AMT, um inibidor da EPO, no BAL do grupo OVA e observamos que o BAL tratado com AMT teve a sua D.O.

reduzido ao basal, semelhante ao grupo salina, nos certificando que o aumento do D.O. é realmente EPO (dados não mostrados).

No conjunto, podemos afirmar que o aumento de células inflamatórias se correlacionou com o aumento de 43% na quantidade de proteínas contidas no BAL, ou seja, o pulmão também apresentou edema, como mostrado na figura 23.

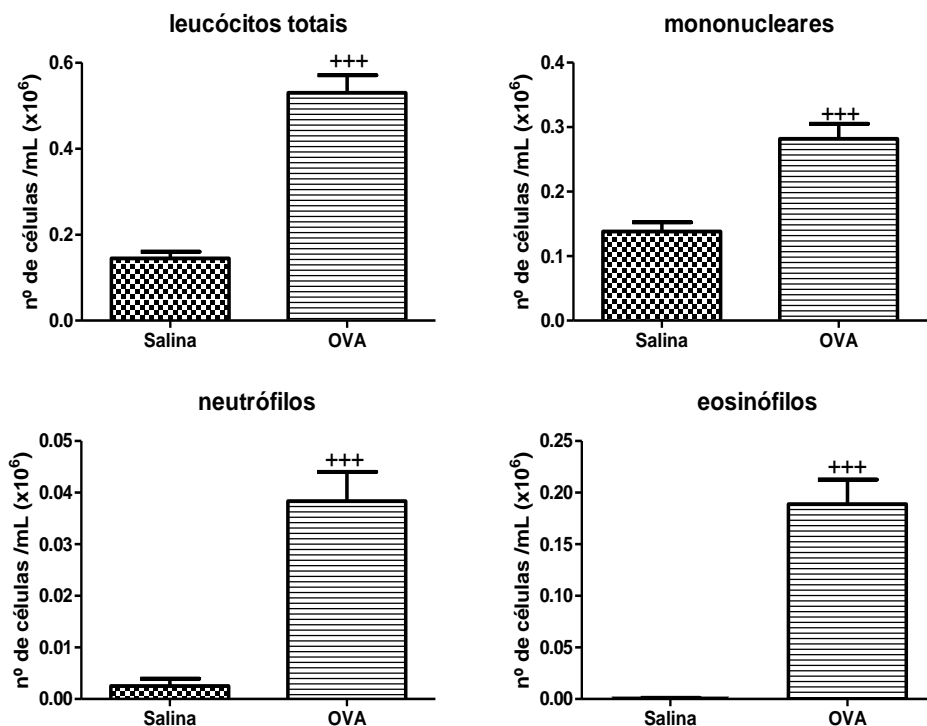


Figura 22: Análise da celularidade no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica após três dias de aerolização. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu$ L) de OVA (10 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 21, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ EPM de dois experimentos (n de 12 animais). Análise estatística realizada pelo *t-student*. +++p<0,001 em relação ao grupo salina.

O gráfico de análise histológica (figura 26) nos mostra que não houve diferença estatística na contagem de células totais ao redor dos bronquíolos. Com relação aos mononucleares, houve uma pequena (16%) porém significativa diminuição em relação ao grupo salina. Quando verificamos os eosinófilos, observamos uma maior quantidade destas células ao redor dos brônquios, no grupo OVA em relação ao salina após três dias de aerolizações, além da migração de células ao redor dos vasos sanguíneos (figura 25).

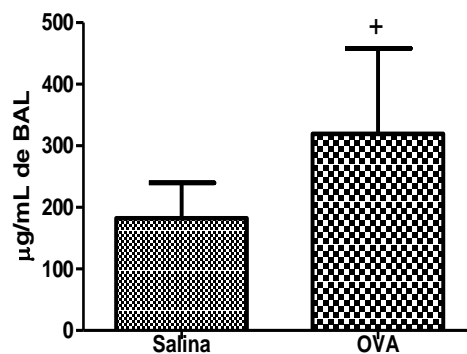


Figura 23: Análise do acúmulo de proteínas no BAL camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica após três dias de aerolização. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 21, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização. Resultados representam média±DP de um experimento representativo. A eutanásia ocorreu 6h após o último desafio. Análise estatística realizada pelo *t-student*. +p<0,05 em relação ao grupo salina.

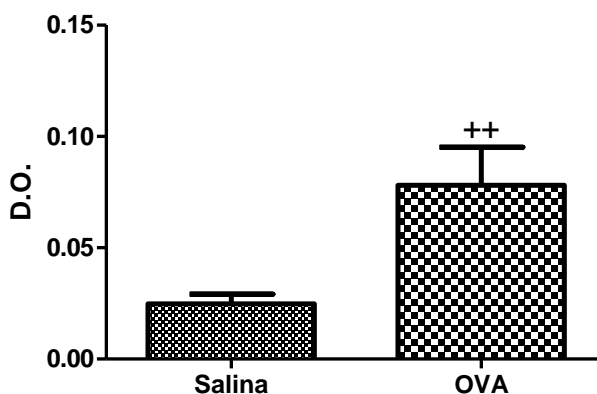


Figura 24: Análise de EPO no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica após três dias de aerolização. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 21, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de dois experimentos (n de 12 animais). Análise estatística realizada pelo *t-student*. ++p<0,01 em relação ao grupo salina.



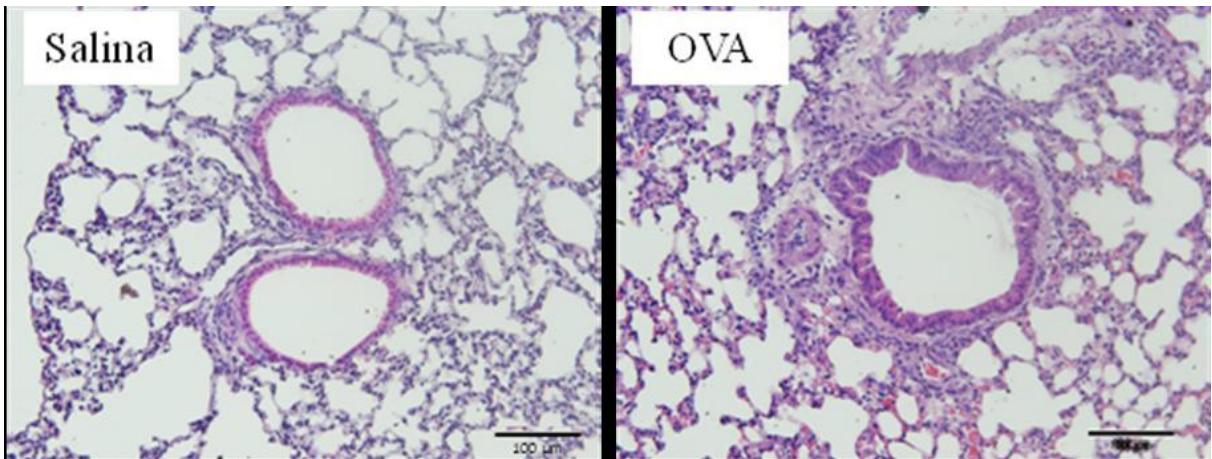


Figura 25: Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica por coloração com H&E, após três dias de aerolização. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 21, os camundongos foram desafiados por 20 minutos com OVA (2,5%) por aerolização. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Imagens representativas da figura 26. Barra de escala 100 µM. As setas indicam acúmulo de células inflamatórias.

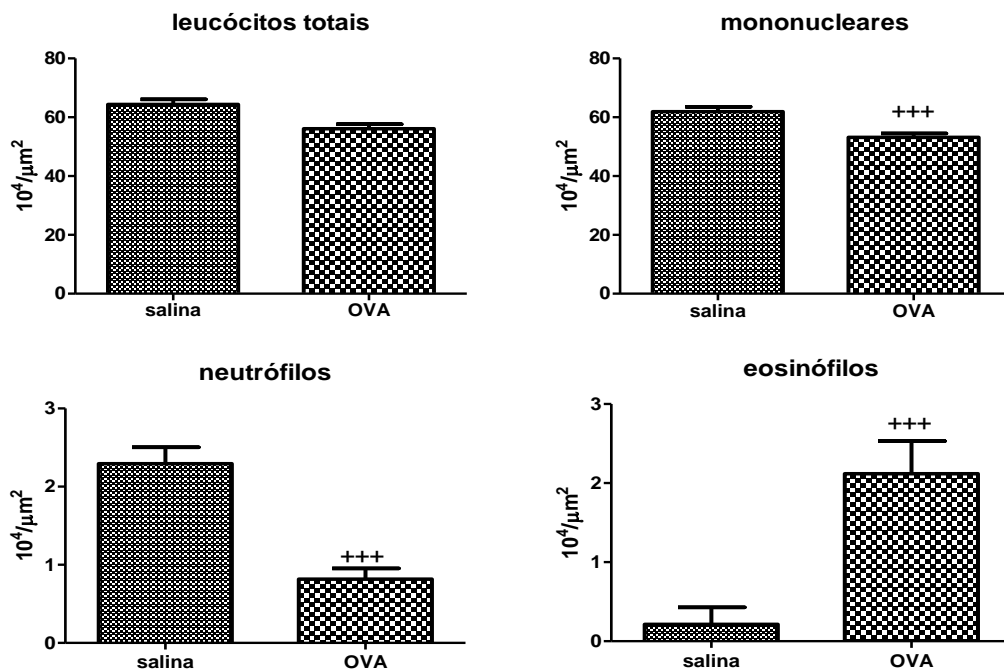


Figura 26: Análise do infiltrado celular nos pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica utilizando coloração com H&E. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 21, os camundongos foram desafiados por 20 minutos com OVA (2,5%) por aerolização. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de 6 pulmões (mais de 10 bronquíolos por pulmão). Análise estatística realizada pelo método t-student. +++p<0,001 em relação ao grupo salina.

Além do aumento no número de células tanto peribronquiolar, quanto perivascular dos animais aerolizados com OVA 24h após o terceiro dia de aerolização, os animais também apresentaram metaplasia das células globet, com um aumento de 90% como mostrado na figura 28 através de coloração com PAS. Na figura 27 estão mostradas as fotos micrografias representativas dos dados observados no gráfico.

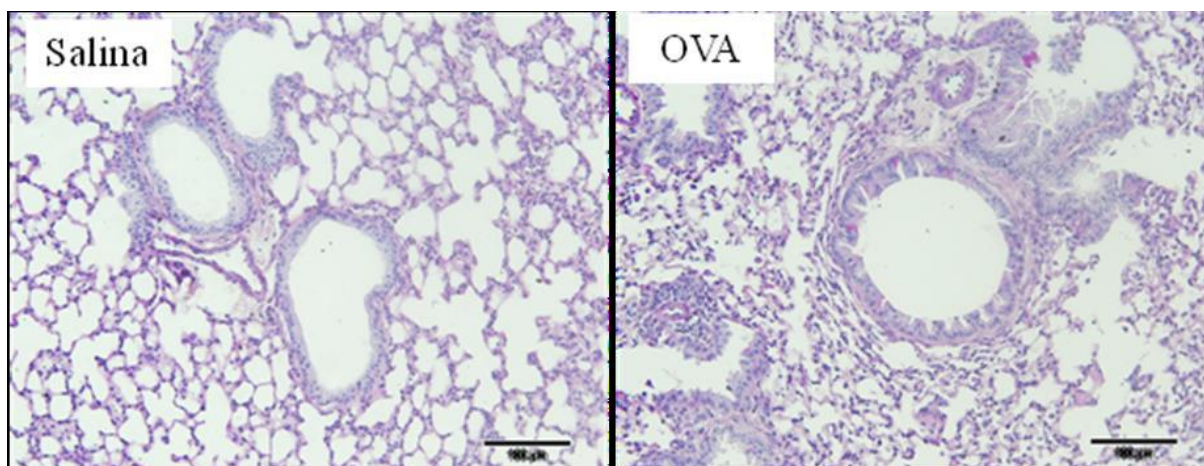


Figura 27: Imagens representativas de pulmões de camundongo submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica por coloração com PAS, após três dias de aerolização. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 21, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Imagens representativas da figura 28. Barra de escala 100 µM.

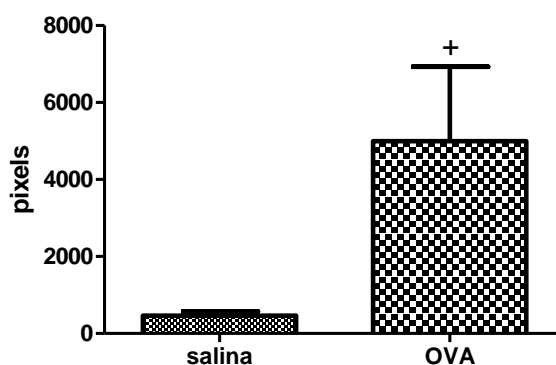


Figura 28: Análise da produção de muco em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica utilizando coloração com PAS, após três dias de aerolização. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 21, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de 6 pulmões (mais de 10 bronquíolos por pulmão). Análise estatística realizada pelo método *t-student*. + $p < 0,05$  em relação ao grupo salina.

Quando dosamos as citocinas presentes no BAL seis horas após a terceira aerolização (figura 29), observamos um aumento de todas as analisadas em torno de 90%. A IL-4 estava presente em maior quantidade: 289 pg/mL em média, seguido da IL-5 com 145 pg/mL e IL-13 com apenas 83 pg/mL. RANTES/CCL5 foi o mediador menos presente no BAL com uma média 0,46 pg/mL.

Além das citocinas, as quimiocinas (como eotaxina/CCL11), e os mediadores lipídicos também são importantes para as reações inflamatórias, como migração celular e broncoconstricção. Na figura 30 observamos um aumento significativo de 67% de eotaxina nos pulmões, que é o principal agente quimiotático dos eosinófilos. Correlacionando o aumento desta quimiocina com o aumento a presença dos destas células. CisLT e PGD<sub>2</sub> estavam presentes no BAL em maior quantidade do que eotaxina. Com relação ao CisLT, ocorreu um aumento de 29% após 3 dias de Aerolização porém este aumento ainda não foi significativo, já PGD<sub>2</sub> apresentou um aumento bem pronunciado (56%). Portanto, observamos que vinte quatro horas após a terceira aerolização os mediadores importantes para a manutenção da inflamação alérgica já estavam presentes em quantidades significativas e exercendo seus efeitos como estímulo a migração dos eosinófilos e hiperreatividade.

Como observamos um aumento de eosinófilos no BAL decidimos observar se este aumento estava presente na medula e o sangue dos mesmos animais. Na medula, figura 31, vimos que após três dias de aerolização houve um aumento do número de eosinófilos em 188% em relação aos camundongos aerolizados com salina. No sangue (figura 32), também ocorreu diferença na celularidade, justamente nos eosinófilos (122%).

Interessante lembrar que nos experimentos anteriores, realizados com os animais da linhagem C57BL/6, não houve diferença na quantidade de eosinófilos nem no BAL nem na medula, mais uma vez confirmando que os animais da linhagem BALB/c possuem uma melhor capacidade de gerar reações do tipo T<sub>H</sub>2.

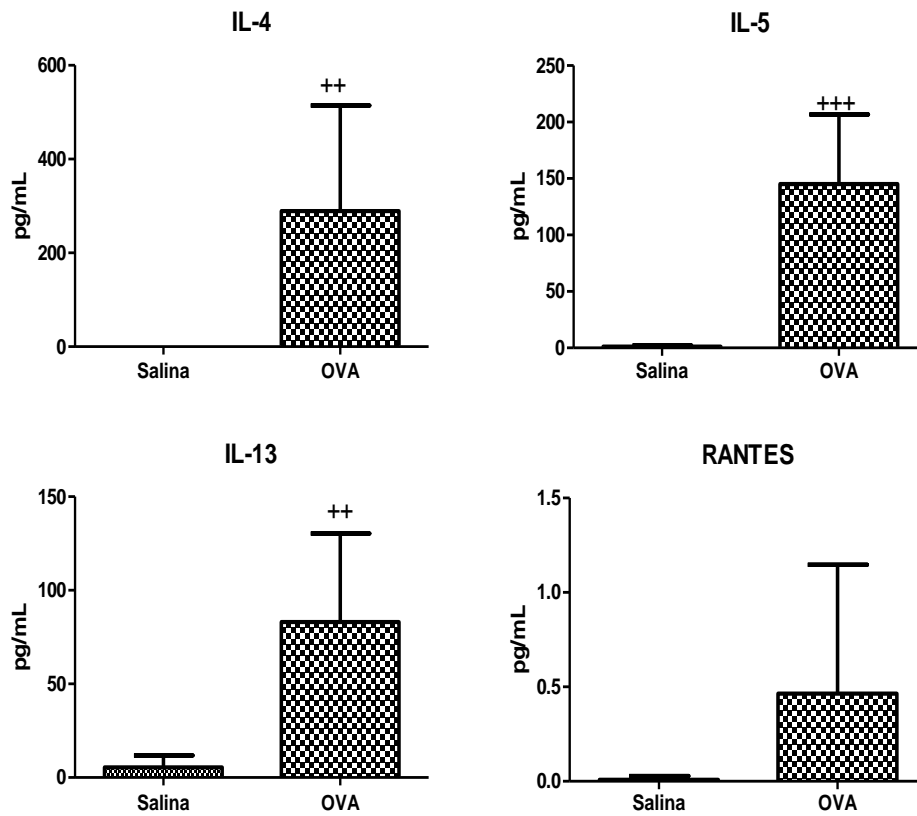


Figura 29: Análise da liberação de citocinas e da quimiocina RANTES no BAL obtidos de animais submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, após três dias de aerolização. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu$ L) de OVA (10 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 21, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização. A eutanásia ocorreu 6h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ DP de um experimento representativo. Análise estatística realizada pelo *t-student*. +++ p<0,001, p< ++ 0,01 em relação ao grupo salina.

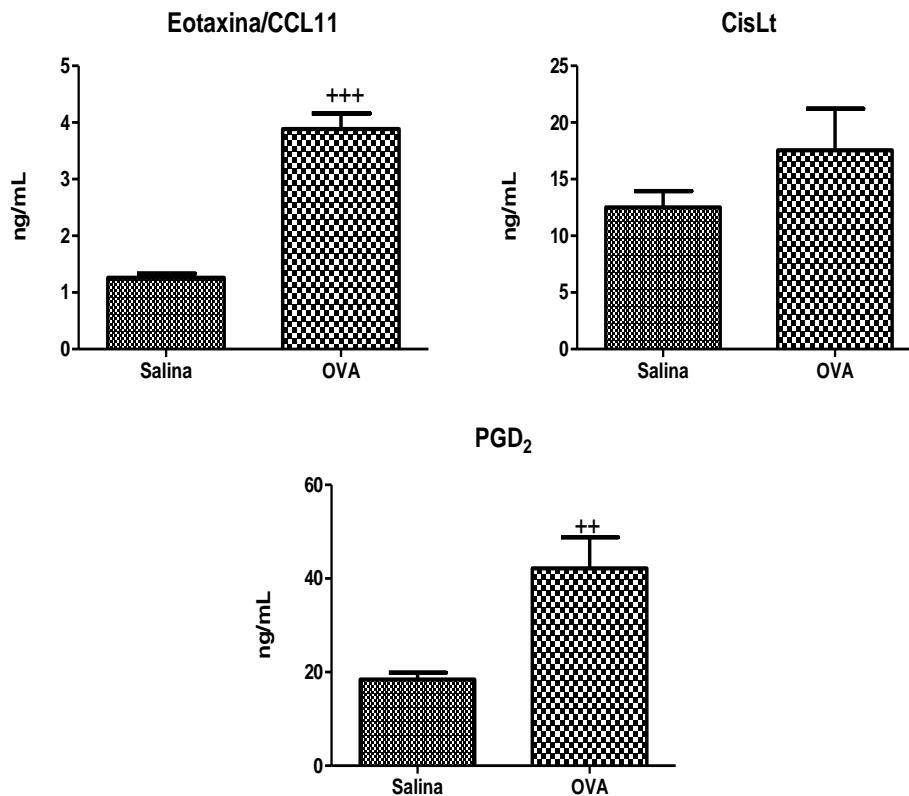


Figura 30: Análise da liberação de eotaxina, CisLt e PGD<sub>2</sub> em pulmões obtidos de animais submetidos ao modelo de inflamação pulmonar, após três dias de aerolização. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 21, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de dois experimentos (n de 8 a 12 animais). Análise estatística realizada pelo *t-student*. +++ p<0,001, p< ++ 0,01 em relação ao grupo salina.

Como observamos nestes animais um aumento no número dos eosinófilos na medula e conseqüentemente maior liberação destas células circulantes no sangue e acúmulo nos pulmões, buscamos saber também se estes estavam hiperreativos. Para isso utilizamos BUXCO não invasivo. O resultado mostrado na figura 33 indicou um aumento na pausa (Penh), que é um indicador indireto de resistência pulmonar. Os animais aerolizados com OVA apresentaram aumento significativo da hiperreatividade em 184 % em relação ao grupo salina, na última dose de metacolina, nos mostrando que os animais já apresentam um comprometimento da função pulmonar.

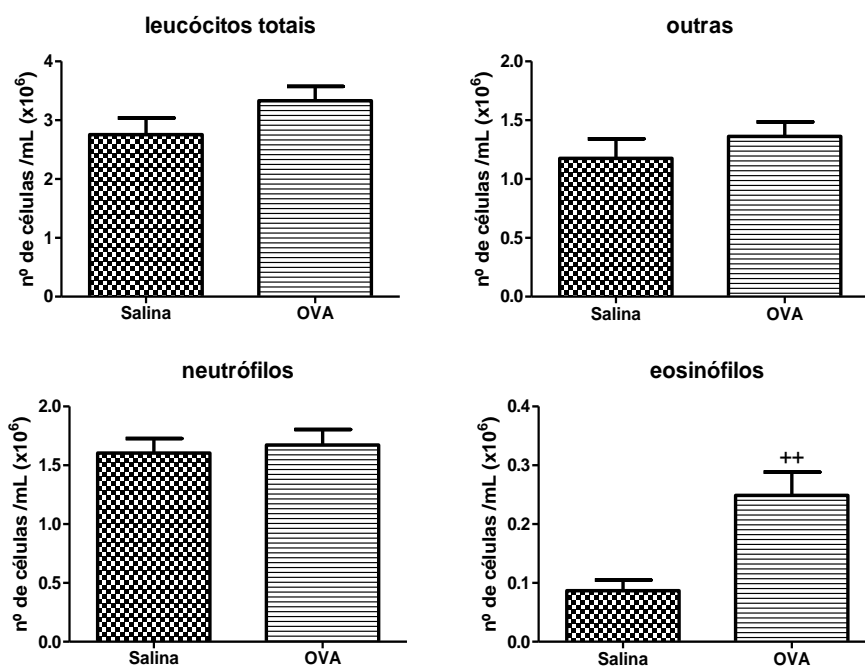


Figura 31: Análise da celularidade na medula de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, após três dias de aerolização. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu$ L) de OVA (10 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 21, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ EPM de dois experimentos. Análise estatística realizada pelo *t-student*. ++p<0,01 em relação ao grupo salina.

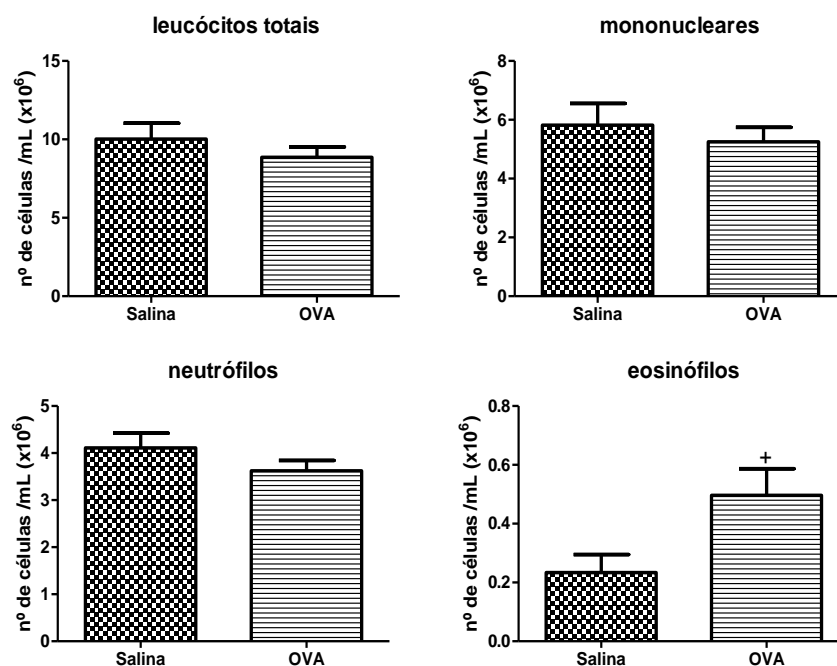


Figura 32: Análise da celularidade no sangue de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, após três dias de aerolização. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu$ L) de OVA (10 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 21, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ EPM de dois experimentos. Análise estatística realizada pelo *t-student*. +p<0,05 em relação ao grupo salina.

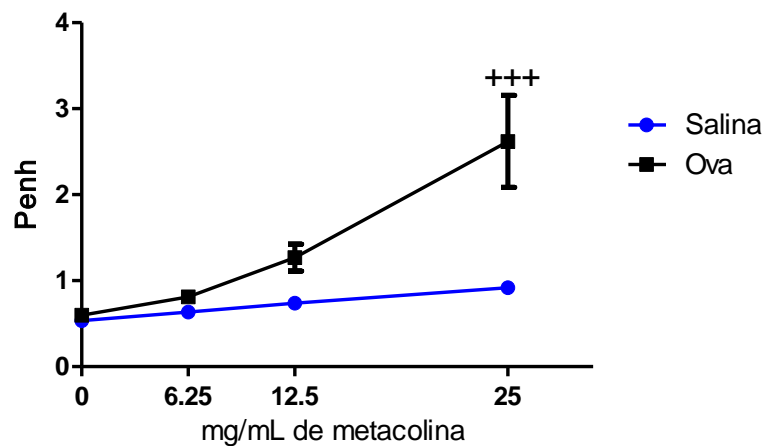


Figura 33: Análise hiperreatividade brônquica em camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar, através do sistema de BUXCO não invasivo, após três dias de aerolização. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu$ L) de OVA (10 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 21, os camundongos foram desafiados por 20 minutos com OVA (2,5%) por aerolização. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ EPM de dois experimentos. Estatística realizada pelo método de Bonferroni. +++ p<0,001 em relação ao grupo salina.

Outro parâmetro característico de indivíduo/animal alérgico é o aumento de IgE circulante. Na figura 34, vemos que os animais já apresentam uma quantidade importante do anticorpo no soro quando somente são sensibilizados com OVA mas aerolizados com salina. Porém, a aerolização por três dias não alterou a quantidade deste anticorpo circulante no sangue de forma significativa, apenas um aumento de 24%.

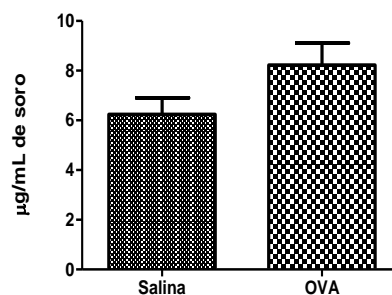


Figura 34: Análise dos níveis de IgE no soro de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, após três dias de aerolização. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu$ L) de OVA (10 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 21, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ EPM de pelo menos três experimentos (n >19 animais).

Com os resultados anteriores, podemos sugerir que após três dias de aerolização os animais já apresentam indícios de inflamação alérgica pulmonar com crescimento do número de

eosinófilos na medula, no sangue e no BAL, além do aumento das citocinas e mediadores lipídicos responsáveis pela reação alérgica e hiperreatividade das vias aéreas nos pulmões. A fim de testarmos o extrato numa situação mais relevante clinicamente, avaliamos a eficácia do NpEt em melhorar o quadro inflamatório nos camundongos com a doença já estabelecida. Na figura 35, vimos que a contínua aerolização por mais três dias praticamente dobrou o número tanto de células totais, quanto o de eosinófilos nos pulmões. Mesmo iniciando o tratamento uma hora após o quarto dia de aerolização o tratamento com dexametasona ainda foi capaz de inibir a migração dos eosinófilos em 68%, fazendo desta substância ainda uma droga antialérgica de referência como controle. Porém, o tratamento com NpEt na dose de 1mg/kg, não foi capaz de impedir a migração dos eosinófilos uma vez o quadro alérgico já instalado.

Quando analisamos estes dados no âmbito (figura 37), vimos que na análise peribronquiolar esta dose foi capaz de inibir a migração das células inflamatórias inclusive os eosinófilos (79% no grupo dexametasona e 60% no NpEt). A figura 36 mostra fotomicrografias representativas do gráfico 37.

Em se tratando da análise da produção de muco, observamos que nem a dexametasona nem NpEt foram capazes de impedir a metaplasia das células globet (figura 39).

Como NpEt apresentou resultados conflitantes entre o BAL e o infiltrado peribronquiolar na inibição da migração das células inflamatórias na dose de 1 mg/kg, com a doença já estabelecida, utilizamos outras estratégias de administração do extrato para verificar se teria alguma inibição da progressão da inflamação. Primeiramente tratamos os animais duas vezes ao dia, com intervalo de oito horas entre os tratamentos, pois muitos medicamentos são administrados desta maneira. Como controle, administramos o veículo também duas vezes ao dia, e este tratamento não foi diferente dos animais que não foram tratados, indicando que os resultados com relação aos tratamentos não é com influência do veículo. O que observamos na figura 40 é que a dose de 1mg/kg, mesmo a administrada duas vezes ao dia (2x), não foi capaz de inibir a piora da inflamação. Então aumentamos a dose de tratamento dos camundongos para 10 mg/kg, observamos uma tendência na inibição (35%) porém de forma não significativa. Ao administrarmos a mesma dose duas vezes ao dia (2x), essa tendência não se confirmou, o número de células observadas foi semelhante aos animais não tratados.



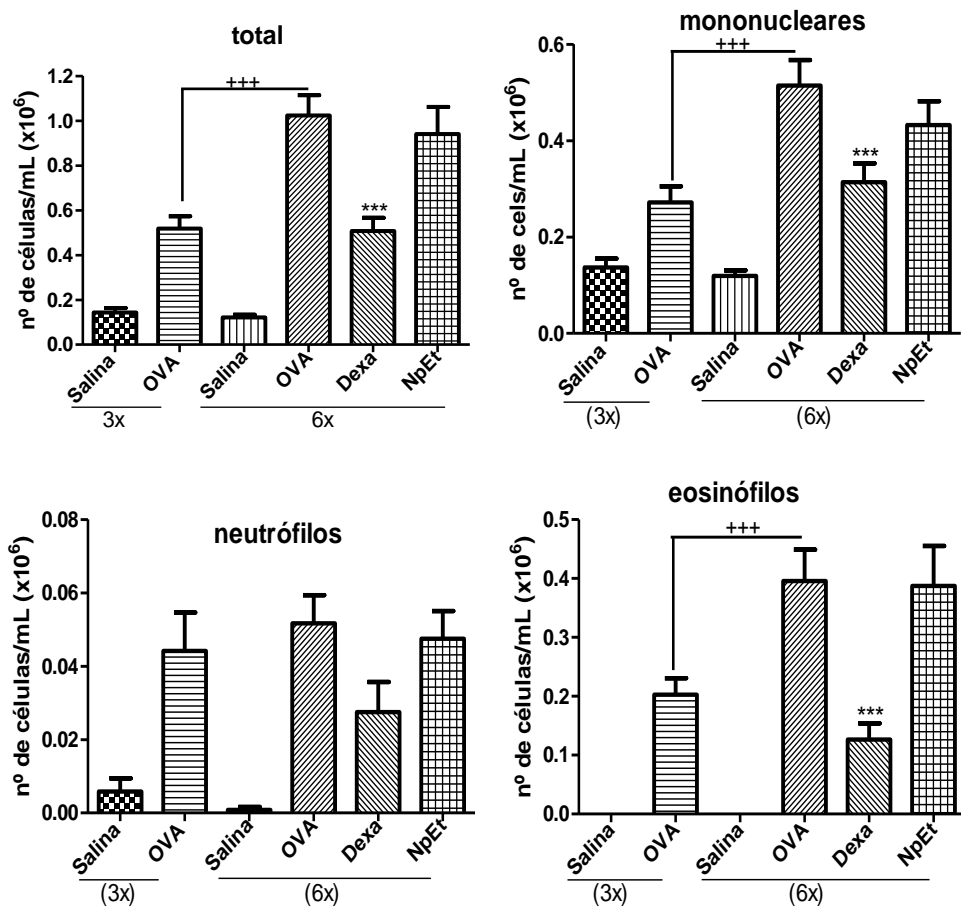


Figura 35: Efeito de NpEt sobre a celularidade no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por Aerolização e tratados v.o., com NpEt (1m/kg) ou dexa (2m/kg), v.o., a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de pelo menos dois experimentos (n > de 10 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++p<0,001 em relação ao grupo OVA (3x), \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo OVA (6x).

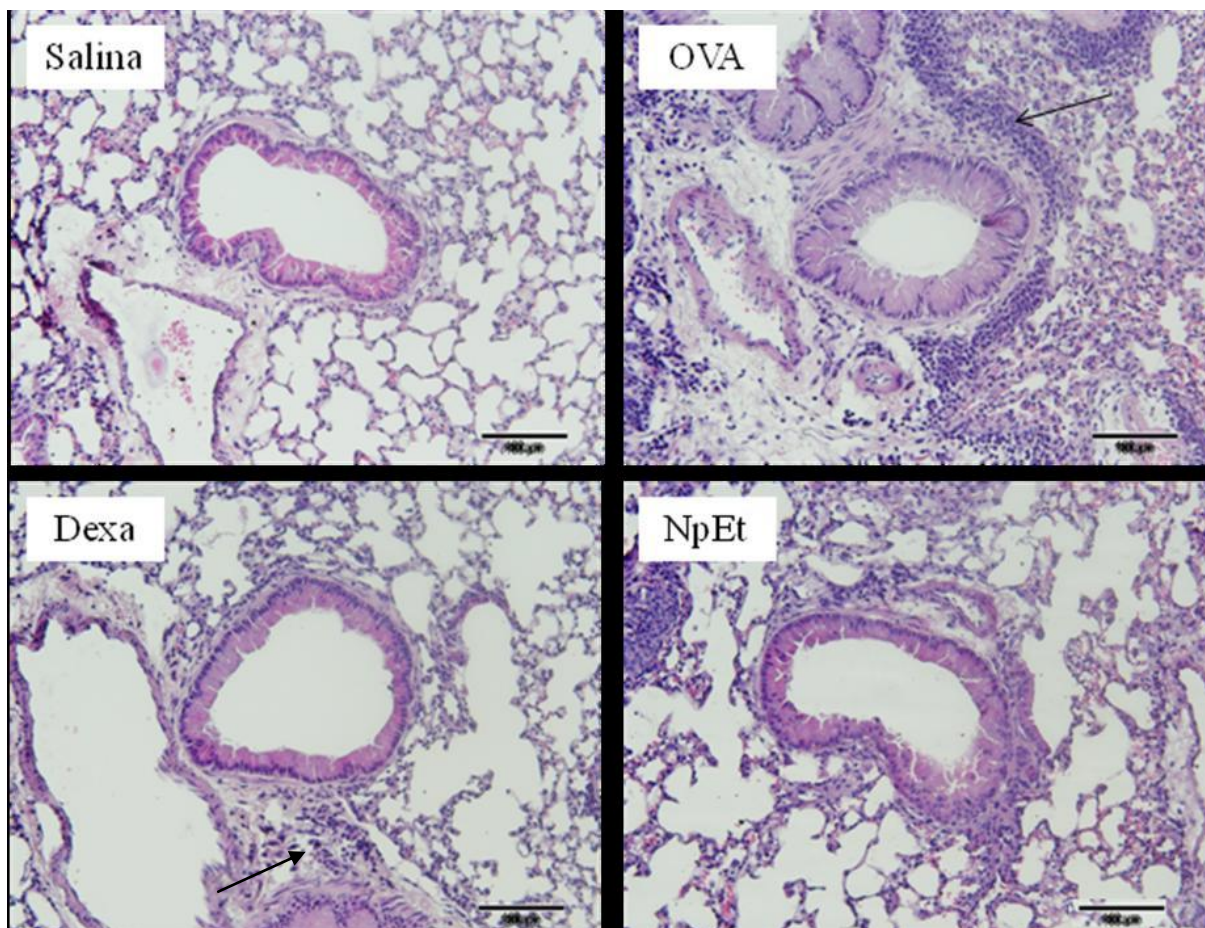


Figura 36: Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com H&E). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 minutos com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEt (1m/kg) ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Imagens representativas da figura 37. Barra de escala 100 µm. As setas indicam acúmulo de células inflamatórias.

O resultado da celularidade foi parcialmente confirmada pela análise de EPO no BAL (figura 41). Novamente não houve diferença estatística entre os animais não tratados e tratamento com o veículo duas vezes ao dia. Embora o tratamento com dexametasona e com NpEt a 1mg/kg tenham diminuído o EPO por volta de 50%, não foi significativo provavelmente por causa do baixo número de animais, no experimento. O mesmo ocorreu com o tratamento com NpEt 10 mg/kg administrado somente uma vez que inibiu EPO em 30 %. Já o tratamento com 10 mg/kg por duas vezes não foi capaz de inibir a liberação de EPO. Com esses resultados, experimentos com tratamento por duas vezes ao dia não mais foram realizados.

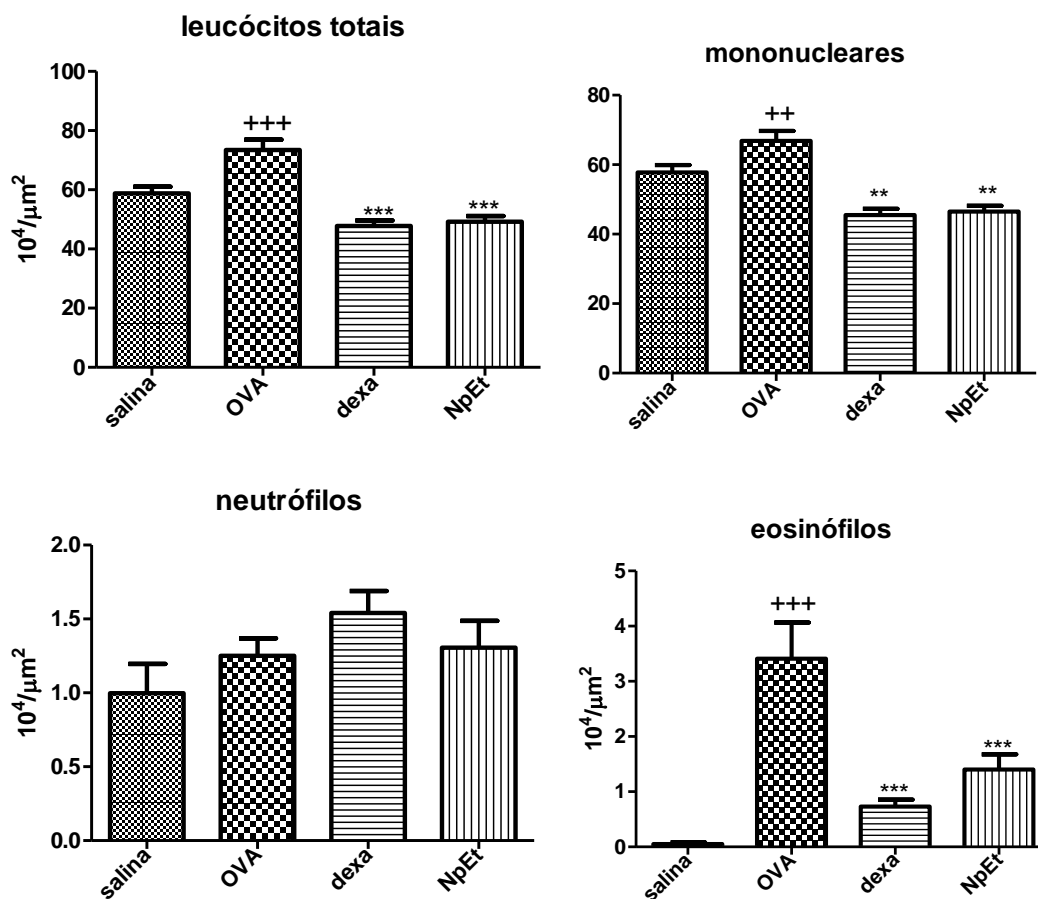


Figura 37: Análise do infiltrado peribronquiolar em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com H&E). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 μL) de OVA (10μg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 minutos com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEt (1m/kg) ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de pelo menos dois experimentos (n > de 10 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++p<0,001 em relação ao grupo OVA (3x), \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo OVA.

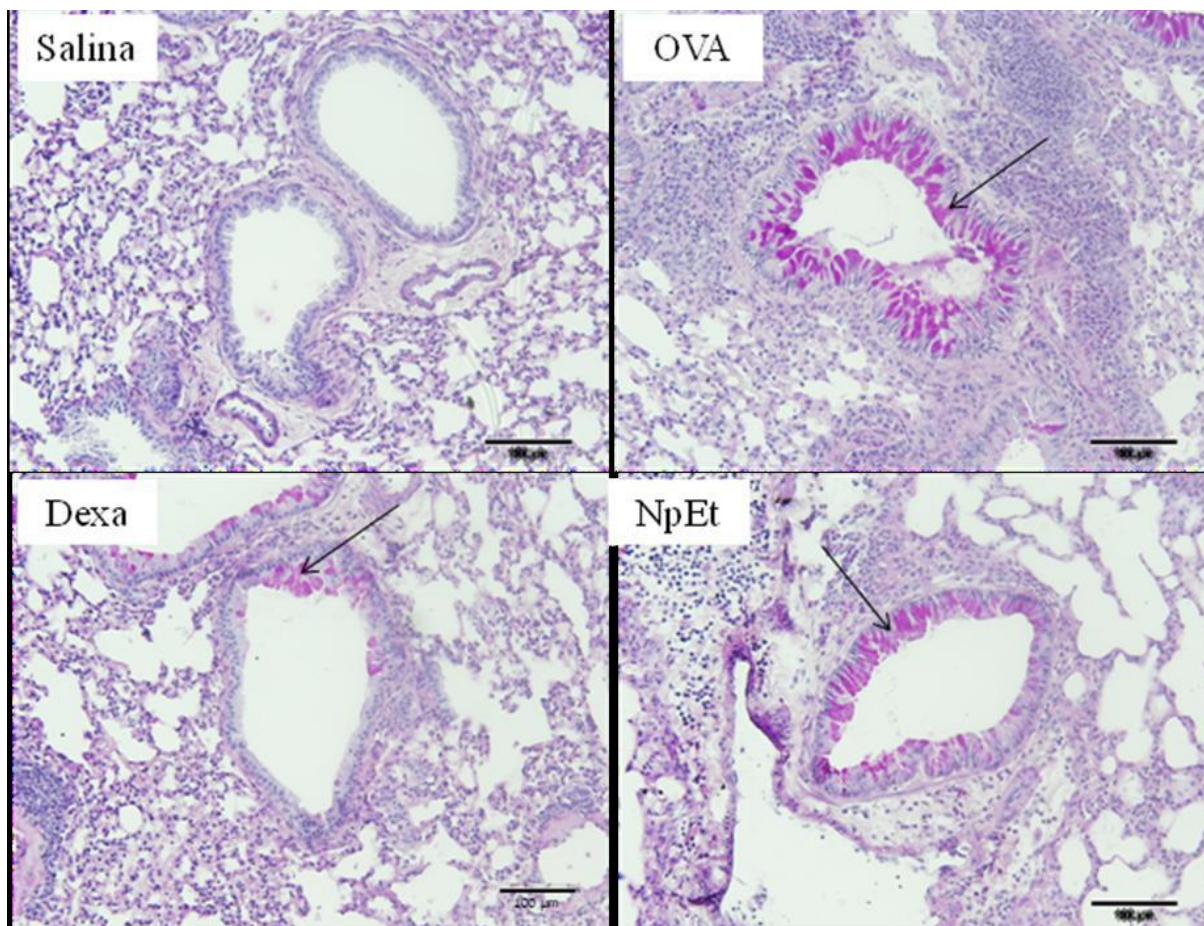


Figura 38: Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com PAS). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos são desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEt (1m/kg) ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Imagens representativas da figura 39. Barra de escala 100 µm. As setas indicam células globet metaplásicas.

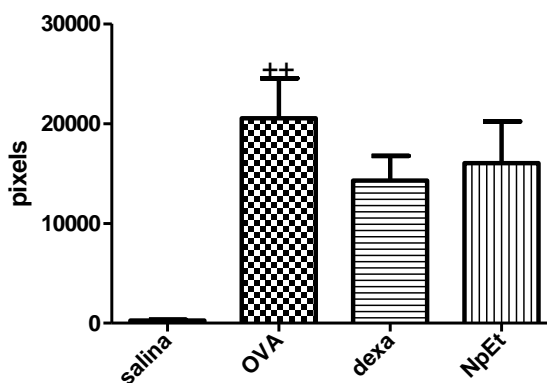


Figura 39: Análise da produção de muco em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com PAS). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos são desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEt (1m/kg) ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de 6 pulmões (mais de 10 bronquíolos por pulmão). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. ++p<0,01 em relação ao grupo salina.

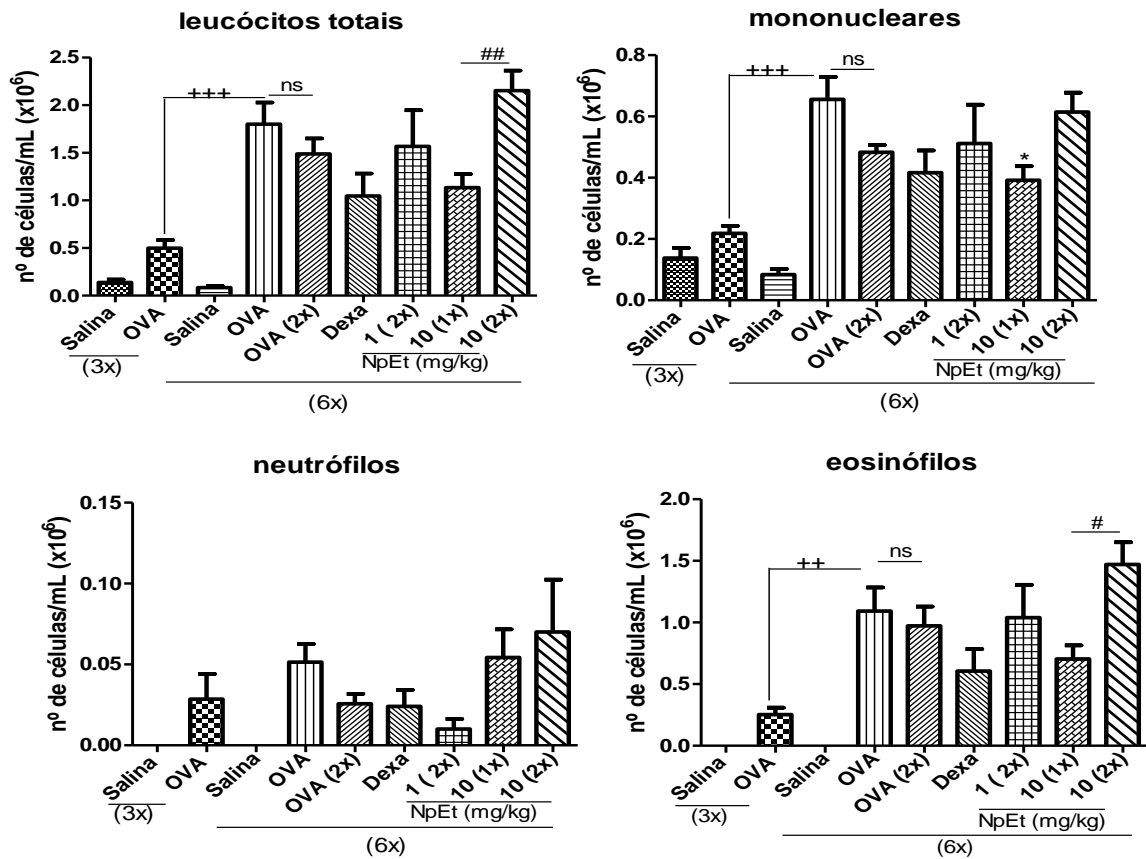


Figura 40: Efeito de NpEt sobre a celularidade no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h (1x) e 8h (2x) após (6x). Camundongos BALB/c receberam via i. p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos são desafiados por 20 minutos com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEt ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±DP de um experimento. Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++p<0,001 em relação ao grupo OVA (3x), #p<0,05 entre os tratamentos.

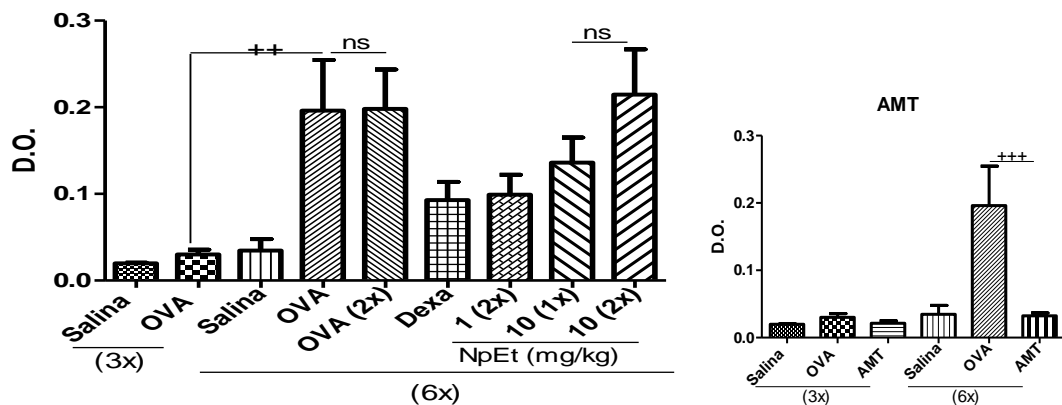


Figura 41: Efeito de NpEt sobre a liberação de EPO no BAL no modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h (1x) e 8h (2x) após (6x). Camundongos BALB/c receberam via i. p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos são desafiados por 20 minutos com OVA (2,5%) por Aerolização e tratados v.o., com NpEt ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±DP de um experimento. Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. ++p<0,01 em relação ao grupo OVA (3x), +++p<0,001 em relação ao grupo AMT.

Na literatura é descrito que muitas plantas medicinais são testadas em doses mais altas nos testes pré-clínicos, das que têm sido utilizadas até o momento (1 e 10 mg/kg). Como a dose de 10 mg/kg mostrou uma tendência de reduzir a migração celular para os pulmões, testamos NpEt nas doses de 100 e 500mg/kg que são doses encontradas na literatura com extratos de plantas com possível efeito antialérgico. Na figura 42 vemos que apenas a dose de 100 mg/kg, inibiu de forma discreta (19%) a contagem de células totais enquanto que a dose de 500 mg/kg somente inibiu a migração em 9%. A dexametasona continuou com um bom efeito imunossupressor com 62% de eficácia. Quando analisamos os mononucleares, todos os tratamentos reduziram de forma significativa a quantidade destas células em 69%, 41% e 25% para dexametasona, 100 mg/kg e 500 mg/kg respectivamente. Já com relação aos eosinófilos, apenas a dose de 100 mg/kg impediu a migração de forma significativa (31%). Dexametasona impediu em 79% o número de eosinófilos nos pulmões, enquanto que a dose de 500 mg/kg impediu em 20% sem significância estatística.

Quando verificamos o gráfico de EPO na figura 43, observamos que não houve correlação entre a quantidade de células e presença de EPO no BAL. Desta vez a dose de 500 mg/kg foi mais eficiente (32%) em inibir a liberação de EPO em relação ao grupo OVA, porém não foi estatisticamente significativo, enquanto que a dose de 100 mg/kg não apresentou efeito.

A figura 44, mostra novamente um pulmão com grande infiltrado peribronquiolar e perivascular no grupo OVA em relação ao grupo salina. Os tratamentos tanto com 100 mg/kg quanto 500 mg/kg reduziram esta migração em 39% e 29% respectivamente. A inibição da migração foi mais pronunciada em se tratando dos eosinófilos, onde o grupo de animais que receberam NpEt a 100 mg/kg obtiveram uma inibição de 84% e o grupo que recebeu NpEt a 500 mg/kg uma redução de 66%. Esta redução seguiu o padrão de BAL onde a dose de 100 mg/kg apresentou melhor efeito em relação a de 500 mg/kg embora esta diferença não seja estatisticamente significativa.

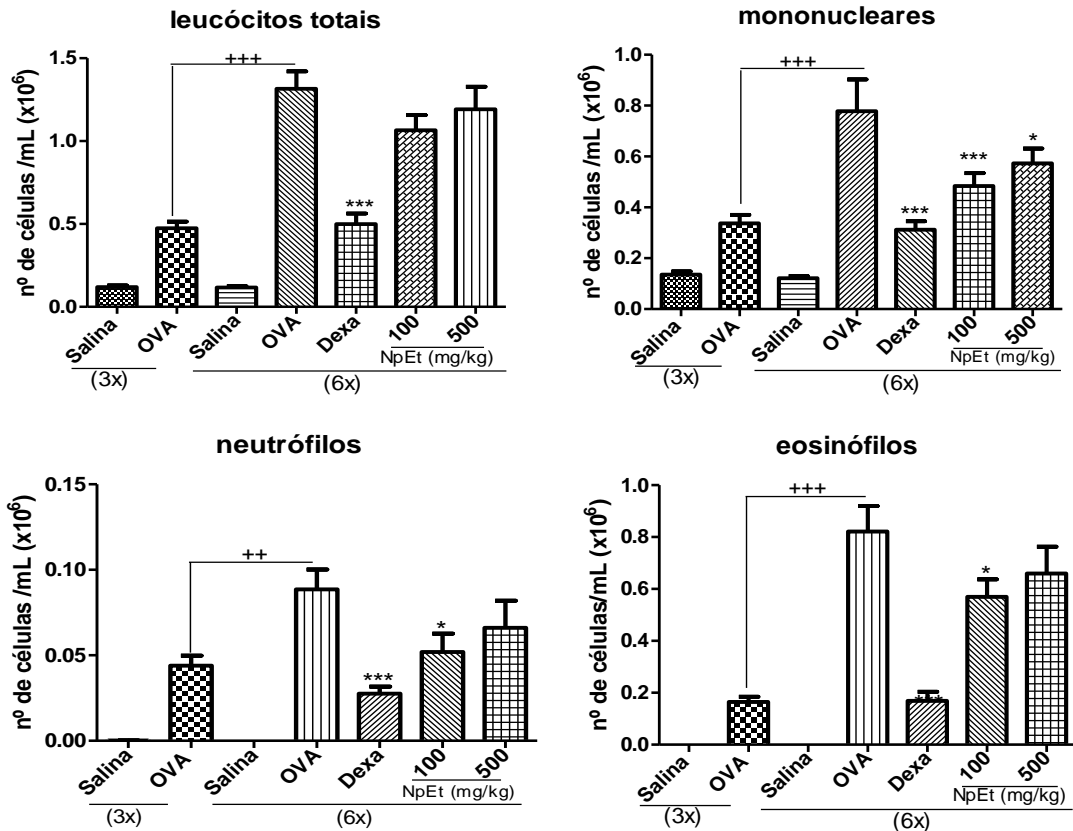


Figura 42: Efeito de NpEt sobre a celularidade no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos são desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEt ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de pelo menos dois experimentos (n > de 10 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++p<0,001 em relação ao grupo OVA (3x), \*\*\*p<0,001 e \*p<0,05 em relação ao grupo OVA (6x).

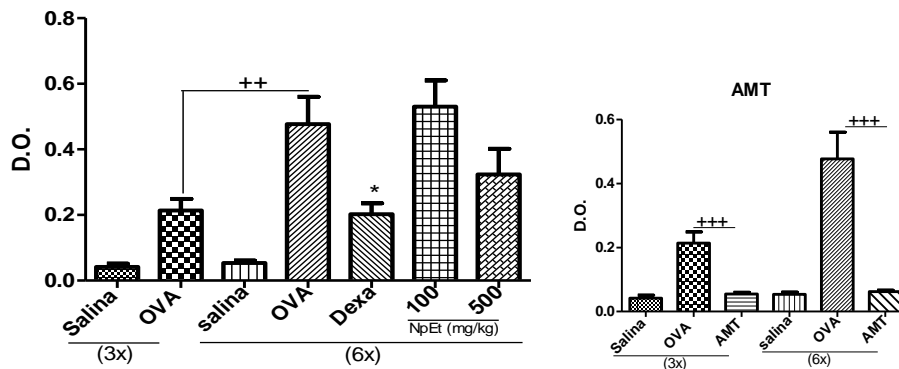


Figura 43: Efeito de NpEt sobre a liberação de EPO no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x). Camundongos BALB/c receberam via i. p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos são desafiados por 20 minutos com OVA (2,5%) por Aerolização e tratados v.o., com NpEt ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de pelo menos dois experimentos (n > de 10 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++p<0,001 em relação ao grupo OVA (3x), \*\*\*p<0,001 e \*p<0,05 em relação ao grupo OVA (6x).

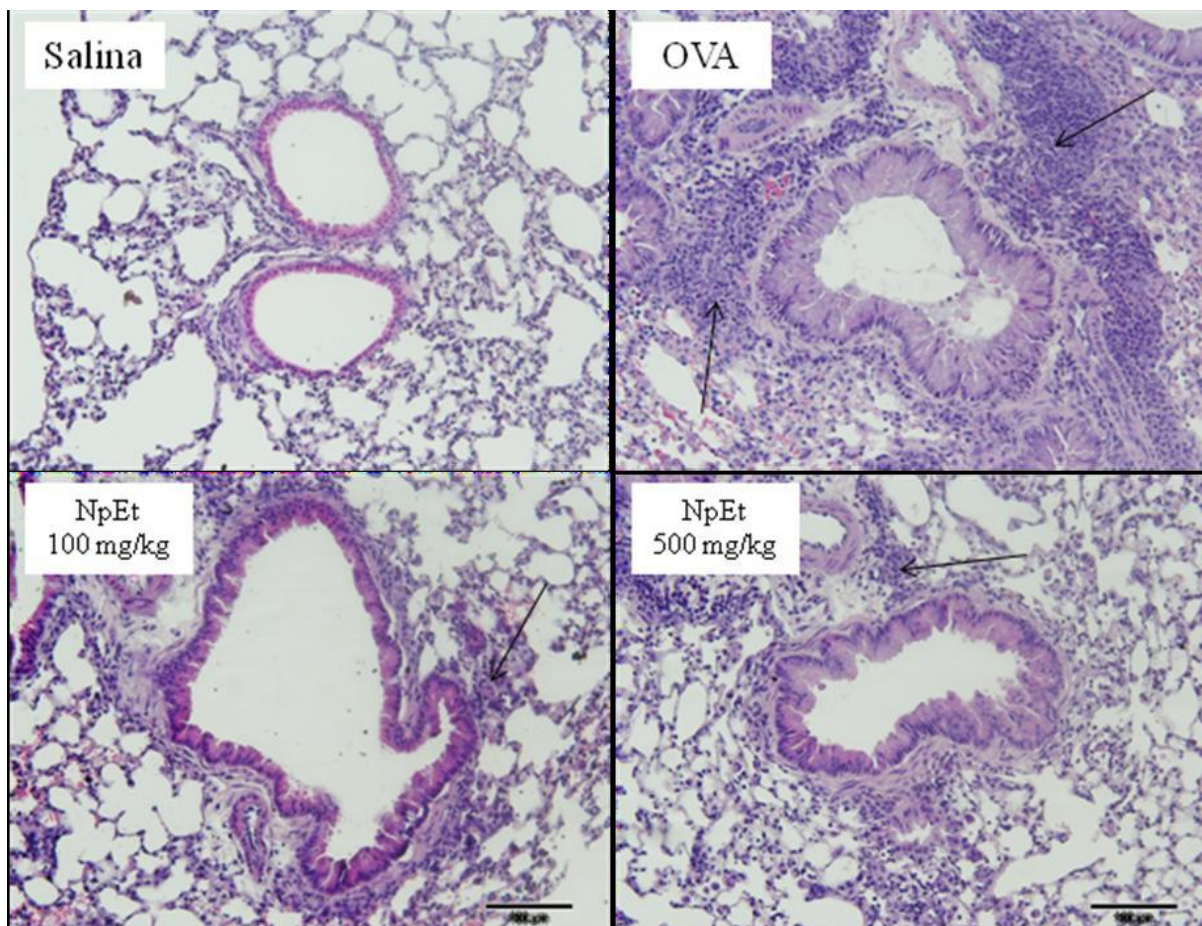


Figura 44: Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com H&E). Camundongos BALB/c receberam via i. p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos são desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEt (100 e 500 m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Imagens representativas da figura 45. Barra de escala 100 µm. As setas indicam acúmulo de células inflamatórias.

Embora estas doses tenham inibido a migração de eosinófilos para os bronquíolos, ambas não interferiram com a metaplasia celular e conseqüente com a produção de muco (figuras 46 e 47).



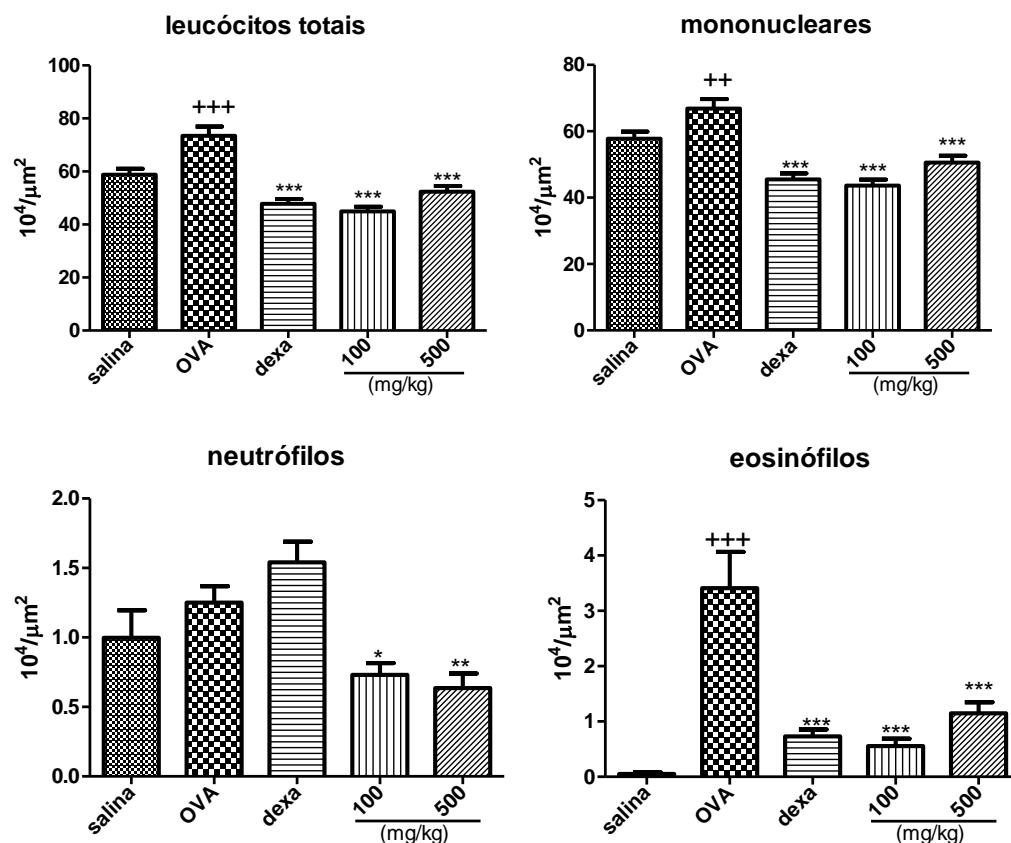


Figura 45: Análise do infiltrado peribronquiolar nos de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com H&E). Camundongos BALB/c receberam via i. p., nos dias 0 e 10, solução (200 μL) de OVA (10μg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos são desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEt (100 e 500 m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de 6 pulmões (mais de 10 bronquíolos por pulmão). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. ++p<0,01, +++p<0,001 em relação ao grupo salina, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo OVA.

Como a inibição da progressão da inflamação não foi muito pronunciada por via oral, no âmbito do BAL em conjunto com o parâmetro histológico, buscamos o tratamento por aerolização. Já que muitas substâncias sofrem metabolismo de primeira passagem, caso isto seja o que ocorra com NpEt, a administração por aerossol agiria topicamente. Este tipo de administração é utilizado em muitas substâncias antialérgicas como, por exemplo, os corticóides e os SABAS. Como controle (figura 48), aerolizamos um grupo de animais com o veículo de dissolução de NpEt (etanol a 1% diluído em salina estéril). A dexametasona permaneceu sendo administrada por via oral. Neste resultado não foi observado diferença entre os animais não tratados (grupo OVA) com os animais aerolizados com etanol a 1%, indicando que qualquer alteração na resposta inflamatória proveniente do tratamento com NpEt não foi devida ao seu diluente. Porém, vimos que nenhuma das concentrações de NpEt administradas

por aerolização foram eficazes em inibir a progressão da doença. Por isso, esta via de administração foi descartada nas futuras análises.

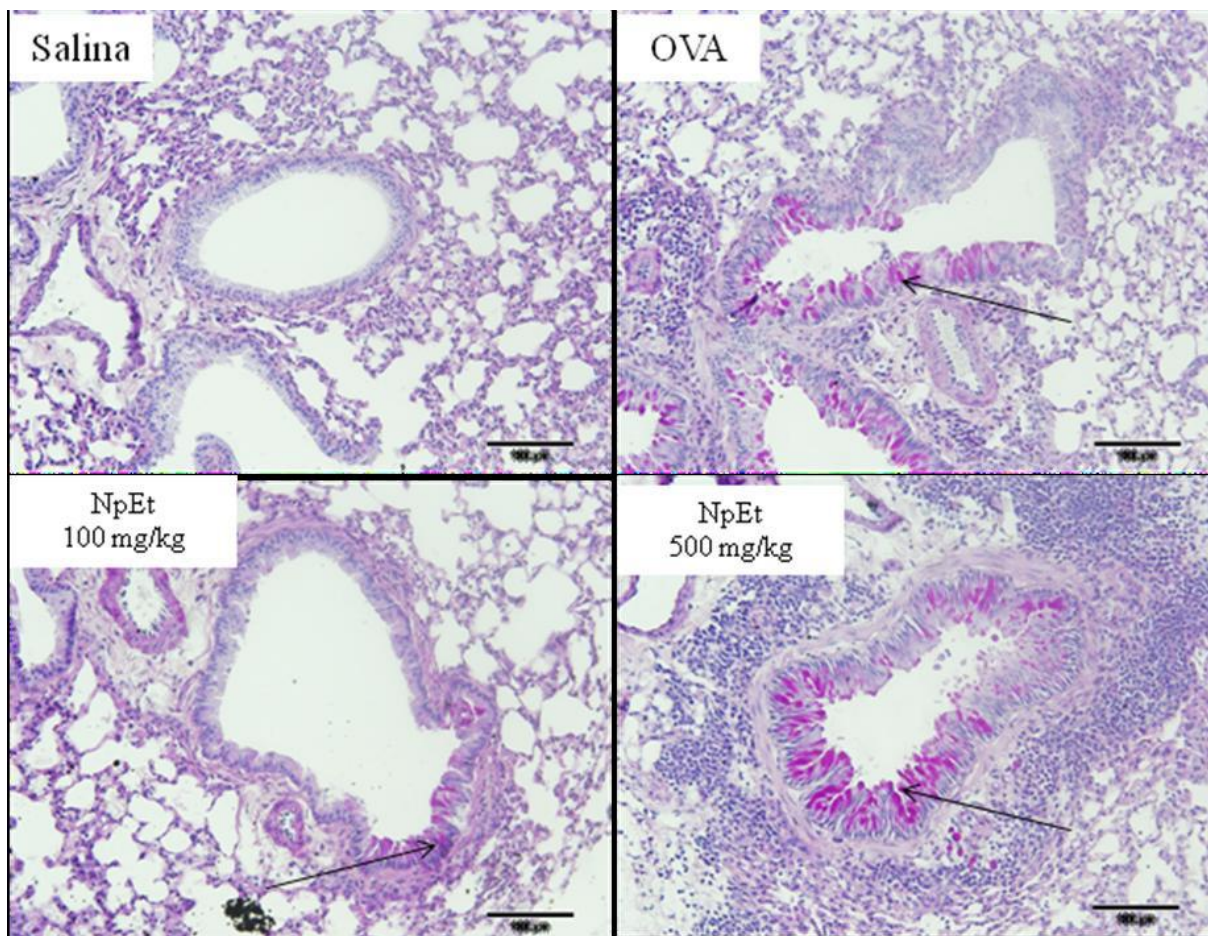


Figura 46: imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com PAS). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos são desafiados por 20 minutos com OVA (2,5%) por Aerolização e tratados v.o., com NpEt (100 e 500 m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Imagens representativas da figura 47. Barra de escala 100 µm. As setas indicam células globets metaplásicas.

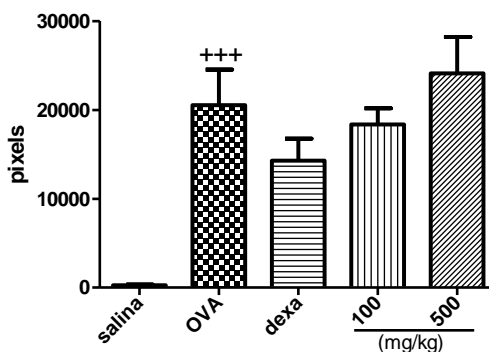


Figura 47: Análise da produção de muco em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com PAS). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos são desafiados por 20 minutos com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEt (100 ou 500 m/kg) ou dexta (2 mg/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de 6 pulmões (6 bronquíolos por pulmão). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++p<0,001 em relação ao grupo salina.

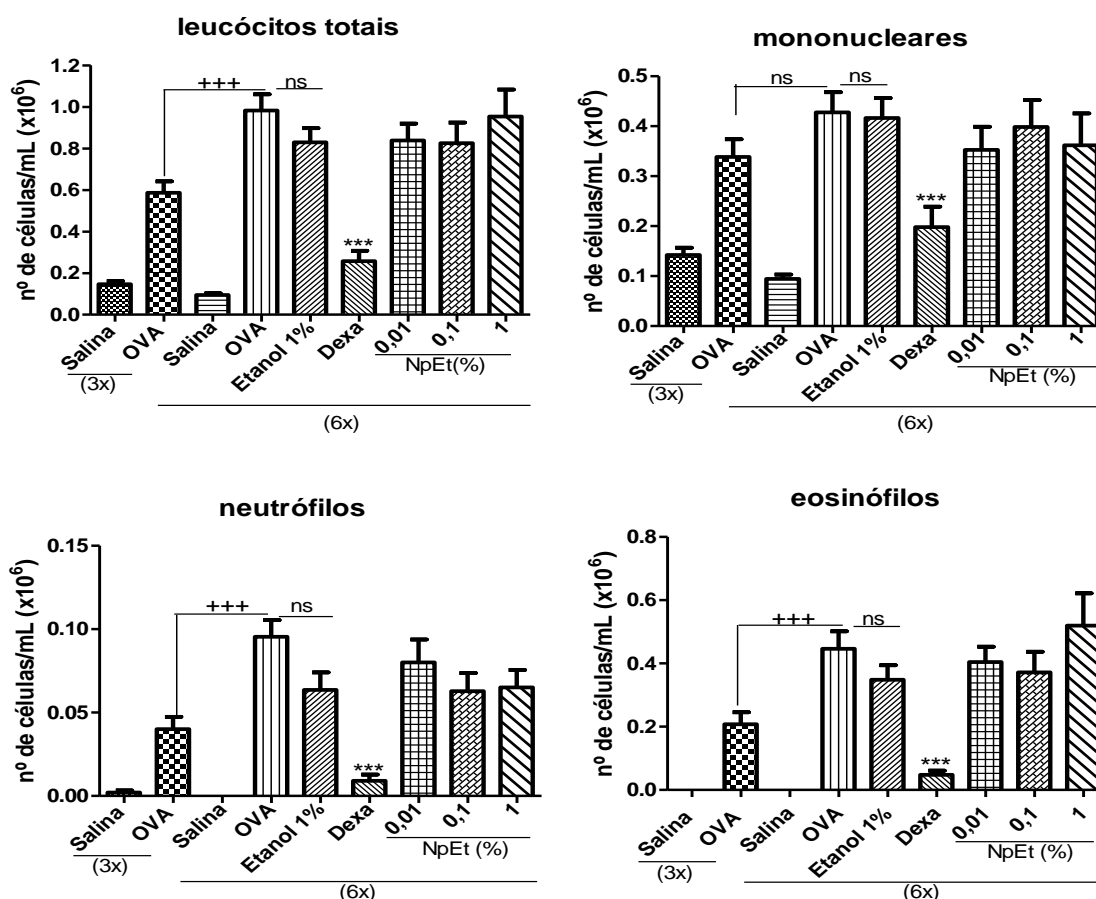


Figura 48: Efeito de NpEt sobre a celularidade no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após por Aerolização (6x). Camundongos BALB/c receberam via i. p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos são desafiados por 20 minutos com OVA (2,5%) por Aerolização e tratados v.o. com dexa (2m/kg) ou com NpEt por Aerolização (20 min) a partir do dia 22. Resultados representam média±EPM de pelo menos dois experimentos (n de 5 a 10 animais). Estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++p<0,001 em relação ao grupo OVA (3x), \*\*\*p<0,001 e \*p<0,05 em relação ao grupo etanol a 1%.

### 4.3 - Experimentos *in vitro*: efeito de NpEt/frações sobre a ativação de linfócitos T

Considerando que o NpEt mostrou discreta eficiência com o tratamento por via oral, em inibir a progressão da inflamação alérgica frente a um quadro já instalado, mas apresentou resultados iniciais promissores sobre a inflamação alérgica, investimos então no fracionamento biomonitorado do NpEt, a fim de identificar a/as fração(ões) responsável(is) pela propriedade antiinflamatória e melhorar a eficácia do efeito antialérgico com as frações de Np. Para isso, o extrato foi subfracionado pelo método de partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades: hexano (NpEtFH), diclorometano (NpEtFD), acetato de etila (NpEtFAe), Butanol (NpEtFB), restando um resíduo o qual denominamos de fração aquosa (NpEtFAq).

A figura 49 mostra o perfil cromatográfico de NpEt e frações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), através do qual podemos observar um grupo de substâncias com tempo de retenção (tr) entre 44 e 55 minutos, inclusive um pico majoritário com tr de 55,7 min, devido as suas características apolares. Podemos encontrar na fração NpEtFH um pico majoritário que possui em TR de 55,6 min. NpEtFD abriga picos semelhantes ao NpEt com trs entre 44 e 51 min porém com menor intensidade. Já na NpEtFAe podemos observar dois grupos compostos: um com trs entre 20,1 e 28,3 min, grupo este que aparece com menos intensidade no NpEt também, e outro grupo com trs entre 42,6 a 48 min. Vale destacar um pico majoritário com tr de 23,7 min. Tanto NpEtFAq e NpEtFB apresentaram compostos de maior polaridade e também com pouca intensidade.

Além da análise química, foi realizada análise da quantidade de LPS, através do método do lisado de amebócitos do limulus (LAL), realizado por Dr. Octavio Augusto França Presgrave, no INCQS/FIOCRUZ. Este método detectou a quantidade de endotoxina presente no extrato e frações. Esta análise nos mostra que NpEt possui a maior quantidade de endotoxina, seguida de NpEtFH, as outras frações apresentaram quantidades semelhantes.

Tabela 4: Quantidade de endotoxina nos extratos e frações, dosados pelo método do LAL

	EU/mL	ng/mL		
NpEt	0,418	0,04	a	0,08
NpEtFH	0,227	0,02	a	0,05
NpEtFD	0,109	0,01	a	0,02
NpEtFB	0,079	0,01	a	0,02
NpEtFAe	0,093	0,01	a	0,02

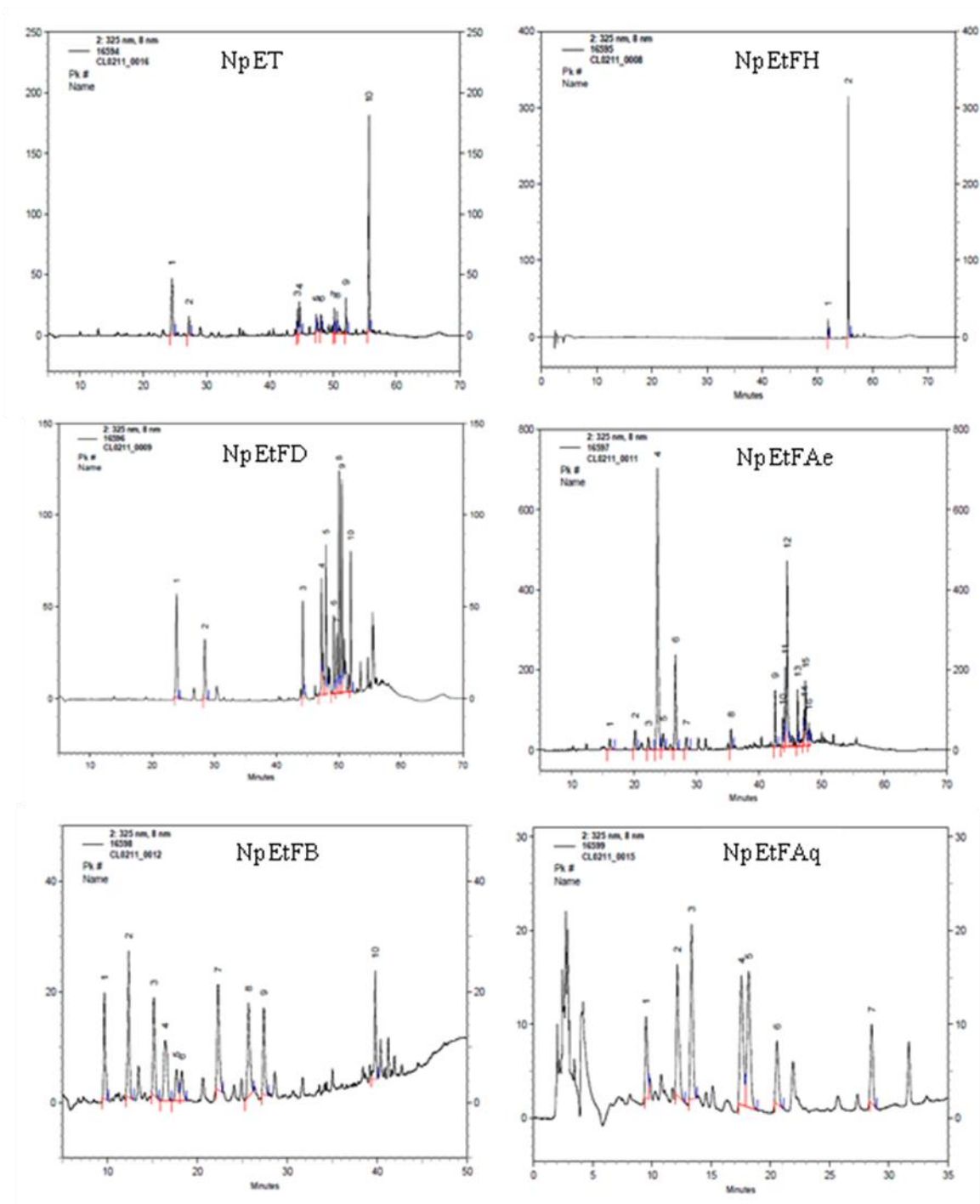


Figura 49: Perfil Químico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do Extrato Etanólico de *Nidularium procerum* e frações. Foram utilizadas colunas de fase reversa (C<sub>18</sub>). A fase móvel variou em gradiente linear de ácido trifluoroacético 0,05% e acetonitrila Tempo total de corrida 75 min. A vazão de fase móvel permaneceu a 1,5mL/min. Detecção por varredura de espectro de 200 a 400 nm com acompanhamento em três comprimentos de onda, 220nm, 260 nm e 340 nm.

A fim de que primeiro fosse identificada qual a fração mais ativa em relação ao NpEt, para após voltarmos com os experimentos *in vivo*. Realizamos experimentos *in vitro* com as

principais células responsáveis pelo quadro alérgico: eosinófilos, linfócitos e mastócitos, utilizando estas frações.

Começamos nossos estudos com os linfócitos T retirados de baços de camundongos DO11.10, que são camundongos que possuem o receptor de células T que reconhecem apenas uma sequência protéica da OVA323-339. Inicialmente, avaliamos a toxicidade do extrato e frações em esplenócitos não estimulados, utilizando o método de MTT (figura 50). Este método analisa a viabilidade celular através da análise da atividade redutora mitocondrial das mesmas. Como o extrato e a maioria das frações são diluídas em etanol absoluto, convém nos certificar que a possível toxicidade do extrato/frações não era proveniente do etanol presente na cultura. As células cultivadas somente com meio e etanol a 0,06% (etanol) não apresentaram diferença significativa em relação às células cultivadas somente com meio, descartando assim o efeito do etanol, em todas as análises. Observamos que a dexametasona (0,05 µg/mL), como previsto, reduziu a viabilidade das células em mais de 90%, confirmando sua toxicidade. NpEt não foi tóxico para os esplenócitos, mesmo na dose mais alta (50 µg/mL), enquanto que as doses mais baixas, 1 µg/mL e 10 µg/mL aumentaram a atividade redutora mitocondrial dos esplenócitos em 30% e 21% respectivamente porém de forma não significativa. NpEtFH na concentração de 50 µg/mL foi a que apresentou maior toxicidade (62%) embora o resultado não foi significativo, semelhantemente ao NpEt na concentração de 1 µg/mL, esta fração apresentou uma tendência a aumentar a atividade redutora mitocondrial dos esplenócitos. O mesmo fenômeno se repetiu com a fração NpEtFD na mesma concentração de 1 µg/mL aumentando em 37% enquanto a concentração 50 µg/mL inibiu em 38%. Já NpEtFAe também apresentou tendência em inibição (39%), todavia, não apresentou aumento na atividade redutora na concentração mais baixa. NpEtFB e NpEtFAq não apresentaram atividade.

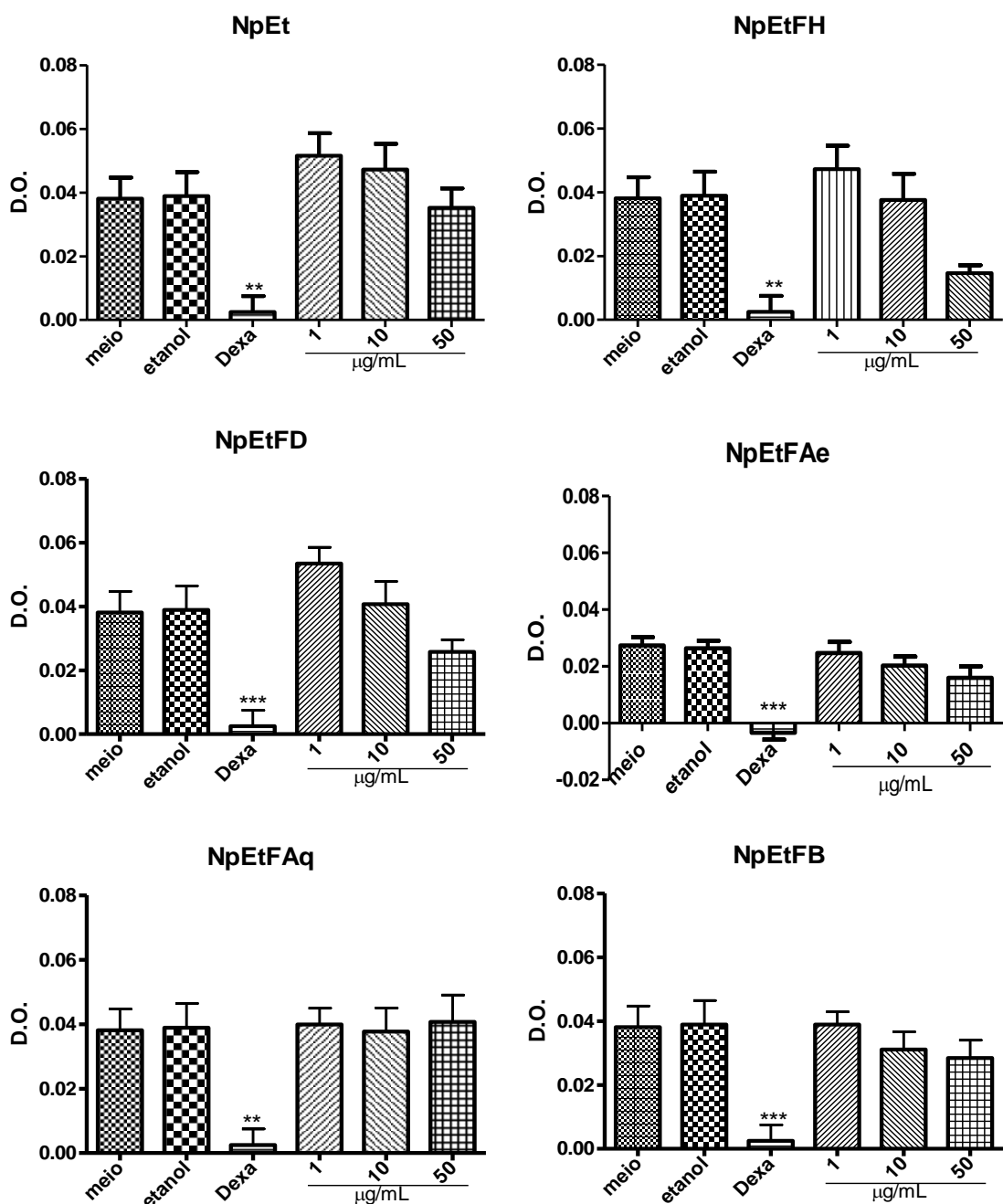


Figura 50: Avaliação do efeito citotóxico de NpEt e subfrações sobre os esplenócitos pelo método de MTT. Esplenócitos de camundongos DO11.10 ( $1 \times 10^6$ /mL) foram cultivados com diferentes concentrações do extrato/frações, em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 72h. Nas últimas duas horas de cultura, foi adicionado a cada poço 10  $\mu\text{L}$  da solução de MTT a 5 mg/mL. A dexametasona foi utilizada na concentração de (0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os resultados expressam média  $\pm$  EPM de pelos menos 2 experimentos. Análise estatística realizada pelo método de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  em relação ao etanol com exceção das frações NpEtFAq e NpEtFB que é em relação ao meio.

Quando os esplenócitos são estimulados com OVA observa-se um aumento na D.O. (em relação aos controles não estimulados, como mostrado na figura 51 o que indica um aumento no número de células após a 72h de cultura. O cultivo das células estimuladas com meio mais etanol não alterou a proliferação destas, já que não houve diferença significativa

entre as células cultivadas somente com meio. O meio com dextrose inibiu a viabilidade dos esplenócitos em 94%. O cultivo com NpEt aumentou significativamente a proliferação das células nas concentrações de 1 e 10 µg/mL em torno de 10 % em se tratando das células cultivadas somente com etanol, comportamento similar do extrato quando cultivado sem que haja estímulo das células. Este resultado foi estatisticamente significativo. As frações NpEtF, NpEtFD, NpEtFAe apresentaram efeito inibitório de 25%, 31% e 26% respectivamente sobre a proliferação celular somente na maior dose utilizada (50 µg/mL). As frações NpEtFB e NpEtFAq não ocasionaram mudanças significativas na cultura.

Como a dose de 50 µg/mL foi a que mostrou possíveis diferenças entre o extrato/frações, utilizamos esta dose para análises posteriores.

Algumas frações apresentaram tendência em diminuir a atividade redutora mitocondrial dos esplenócitos, e de forma indireta (pelo aumento da D.O.) a proliferação. Por isso, foi realizado experimentos para verificar se a inibição desta atividade, era devido a uma indução na morte programada destas células (apoptose), necrose ou apenas por impedir a proliferação. A figura 52 mostra a contagem absoluta das células vivas (exclusão por azul de tripan), 72h após o início da cultura. Observamos que após este tempo a quantidade de células que se iniciou com um milhão, diminuiu bastante independente do estímulo ou tratamento. Apesar disto, observamos um aumento de 63% no número de células quando a cultura é estimulada com OVA, e novamente as frações NpEtFAq e NpEtFB não exerceram efeito significativo sobre a cultura comparado com os esplenócitos estimulados e não tratados. A dexametasona impediu o crescimento no número de células (73%). Em se tratando das outras frações e do extrato, NpEt seguido de NpEtFD inibiram 49% e 41%, NpEtFH e NpEtFAe foram as mais potentes, (68% e 65% respectivamente), com o número de células ficando semelhantes à cultura não estimulada.



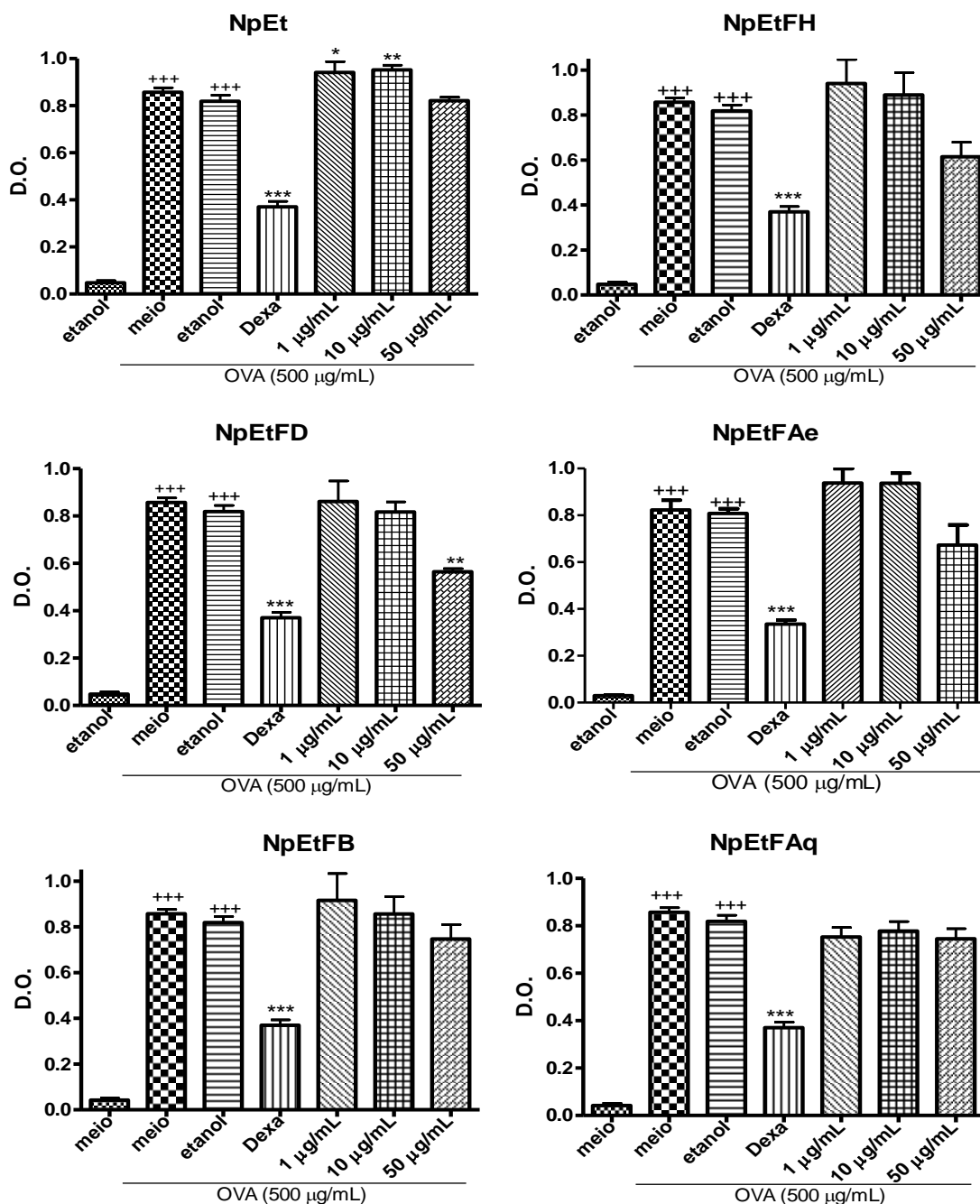


Figura 51: Avaliação do efeito citotóxico de NpEt e subfrações sobre os esplenócitos estimulados com OVA pelo método de MTT. Esplenócitos de camundongos DO11.10 ( $1 \times 10^6$ /mL) foram cultivados com diferentes concentrações do extrato/frações, em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 72h. Nas últimas duas horas de cultura, foi adicionado a cada poço 10  $\mu\text{L}$  da solução de MTT a 5 mg/mL. A dexametasona foi utilizada na concentração de (0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os resultados expressam média  $\pm$  EPM de pelos menos 2 experimentos. Análise estatística realizada pelo método de Tukey. +++ $p < 0,001$  em relação ao meio ou etanol. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao OVA+etanol com exceção das frações NpEtFAq e NpEtFB que é em relação ao OVA.

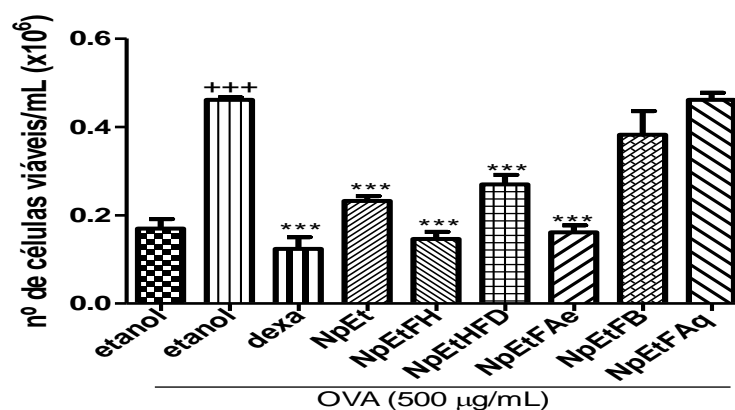


Figura 52: Efeito de NpEt e subfrações sobre a contagem de esplenócitos estimulados com OVA. Esplenócitos de camundongos DO11.10 ( $1 \times 10^6$  mL) foram cultivados com diferentes concentrações do extrato/frações, em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 72h. A dexametasona foi utilizada na concentração de (0,05  $\mu\text{g/mL}$ ). Os resultados expressam média  $\pm$  SD de um representativo de dois realizados. A contagem foi realizada por exclusão com azul de tripan. Análise estatística realizada pelo método de Tukey. +++ $p < 0,001$  em relação ao meio com etanol. \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao OVA+etanol.

A figura 53, mostra citogramas de esplenócitos estimulados com OVA e cultivados na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  do extrato/frações. A coluna A mostra as células em função do tamanho (FSC) x granulosidade (SSC) onde, podemos notar também uma grande quantidade de células mortas e debris, além de células com tamanho e granulosidade aumentados. Este citograma também foi utilizado para selecionar as células para a análise em função da fluorescência somente a Anexina (células em apoptose inicial), fluorescência ao PI e Anexina (mortas) e sem fluorescência (células vivas), representados na coluna B. As células não estimuladas possuem um tamanho pequeno e pouca granulosidade, característico de linfócitos. Por isso selecionamos esta área e verificamos que mais de 90% destas células estão vivas. Quando as células são estimuladas com OVA, em um meio com ou sem etanol, há um aumento no tamanho e granulosidade destes esplenócitos, indicando um aumento de células em proliferação, os chamados blastos. Este aumento é acompanhado da porcentagem de células em apoptose inicial, ou seja, o estímulo além da proliferação induz a apoptose destas células em 45%. As culturas tratadas com dexametasona apresentaram redução visível no tamanho, embora a porcentagem de células vivas, em apoptose inicial e mortas são semelhantes às células estimuladas e sem tratamento. As culturas tratadas com NpEt, NpEtFB e NpEtFAq não apresentaram diferenças em relação às culturas sem tratamento. As células tratadas com NpEtFD foi a que mais apresentou toxicidade, pois dobrou a porcentagem células mortas: de 8% nas células estimuladas e não tratadas para 20%. NpEtFAe diminuiu a porcentagem de células em apoptose inicial em relação às células não tratadas. Estes resultados indicam que NpEtFD é a fração mais tóxica para os esplenócitos.

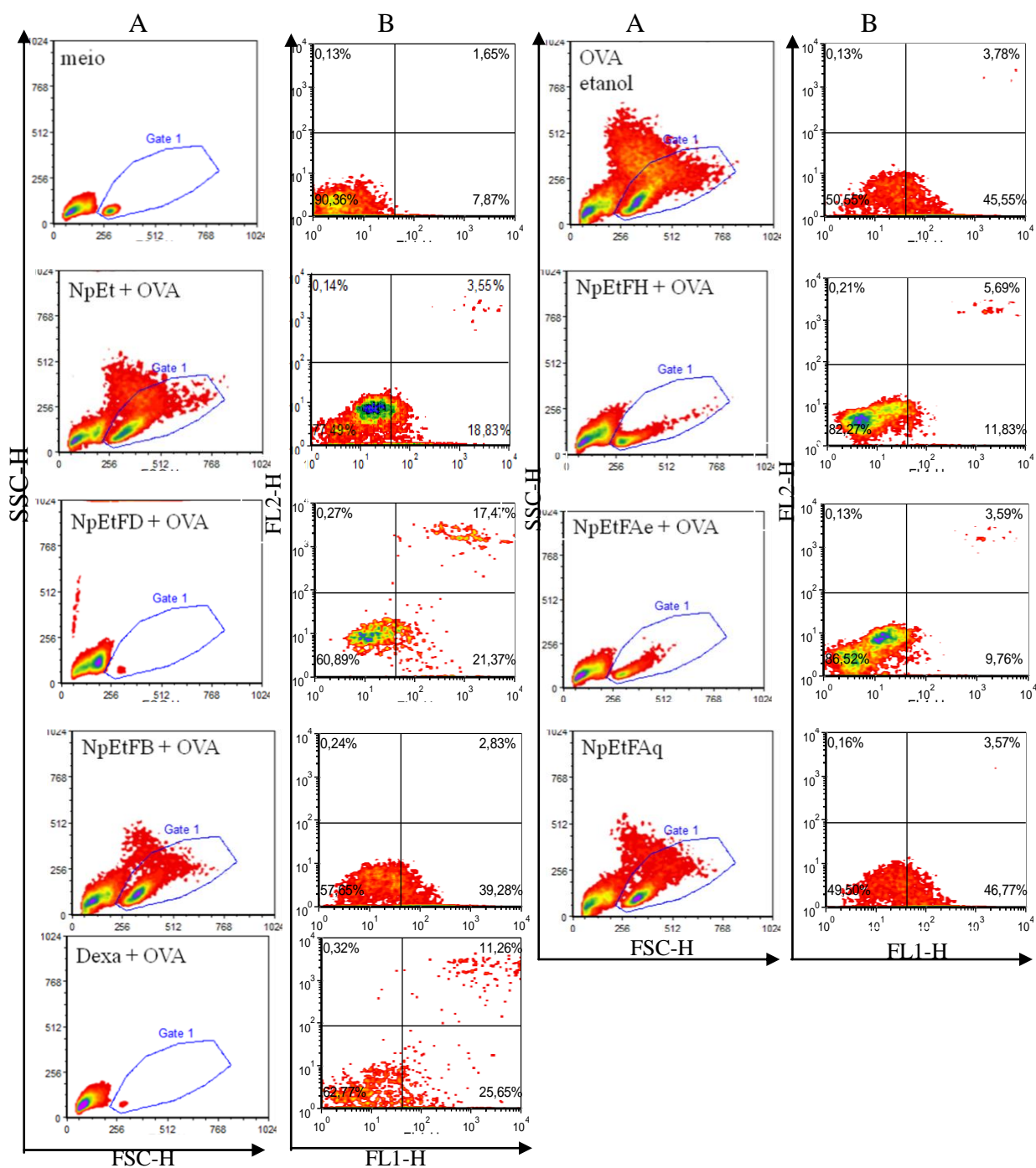


Figura 53: Análise citofluorimétrica de esplenócitos após a estimulação OVA e tratadas com NpEt/Frações. Colunas A – Distribuição das células em função de tamanho (FSC-H) e complexidade (SSC-H), mostrando a região (Gate 1) do gráfico onde estão as células utilizadas para as análises posteriores. Colunas B: Distribuição das células selecionadas da região 1 em função da fluorescência a Anexina V (FL1-H) versus PI (FL2-H). Gráfico representativo de dois experimentos. As condições de cultura são as mesmas da figura 44.

A análise da apoptose pode ser complementada, com a observação dos gráficos que relacionam o número de células viáveis contados ao final da cultura (figura 52) com a porcentagem de células vivas, em apoptose inicial e mortas na figura 53. Cada gráfico do extrato/frações (figura 54) estão representados com as células sem estímulo (somente meio

com etanol), com estímulo (OVA), estimuladas e tratadas com dexta (dexta) ou NpEt ou as frações. As células estimuladas apresentaram aumento do número relativo de células vivas em 52%, apoptose inicial 1225% e aproximadamente 443% de células mortas. NpEt diminuiu o número de células totais em 49%, além de diminuir o número de células em apoptose inicial em 80% e o número de mortas em 44%. NpEtFH também reduziu o número de esplenócitos em todos os aspectos analisados. NpEtFD reduziu o número de células vivas em 21%, 78% de células em apoptose inicial e aumentou drasticamente o número de células mortas (125%) em relação às células estimuladas somente com meio e etanol. NpEtFB e NpEtFAq apresentou resultados semelhantes às células estimuladas e não tratadas. NpEtFAe embora reduziu o número relativo de células vivas em aproximadamente 40%, diminuiu as células em apoptose (91%) e células mortas (65%).

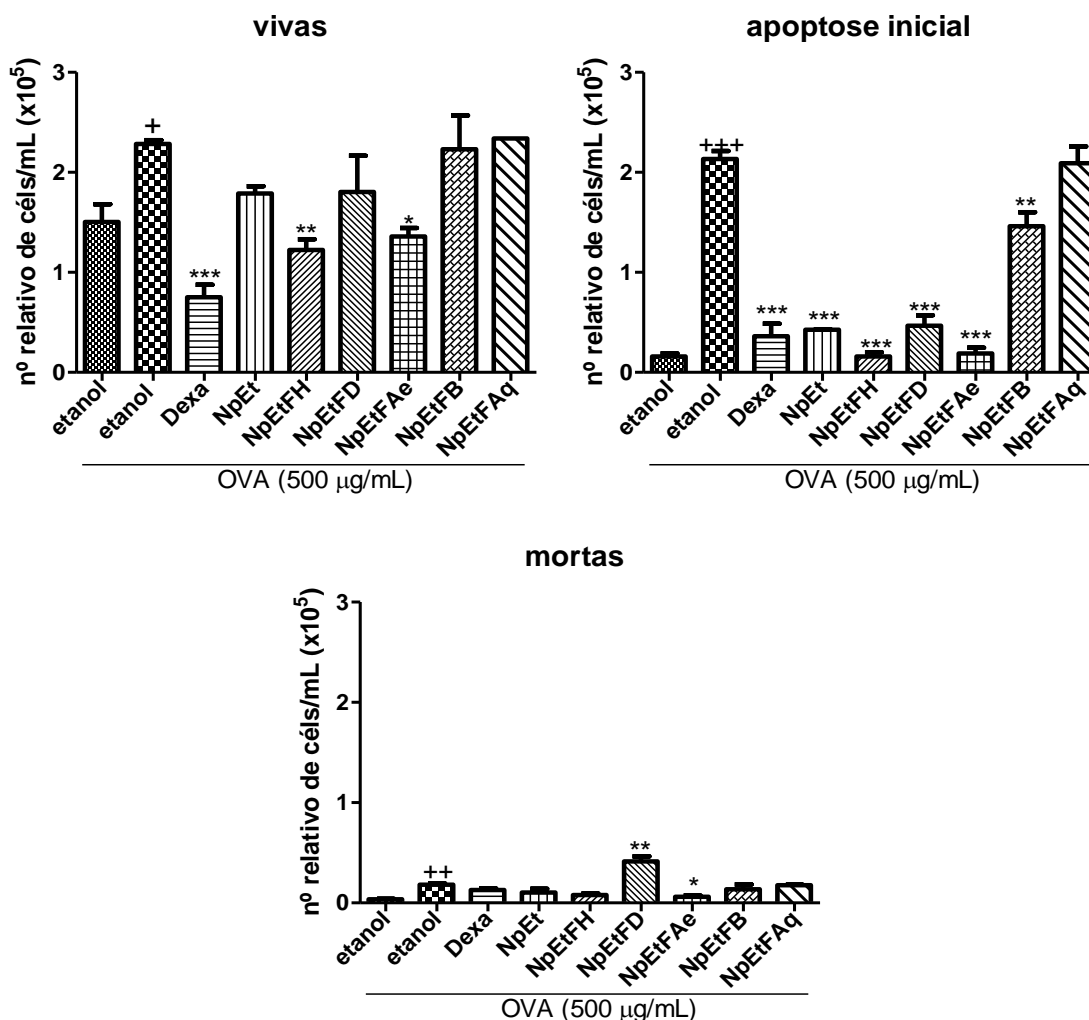


Figura 54: Efeito de NpEt sobre o número relativo de esplenócitos após a estimulação com OVA e tratadas com NpEt/Frações. Os resultados expressam média  $\pm$  DP de um experimento representativo. Estatística realizada pelo método de Bonferroni. +++p<0,001 em relação ao meio ou etanol. \*p< 0,05, \*\*p< 0,01, \*\*\*p<0,001 em relação ao OVA+etanol com exceção das frações NpEtFAq e NpEtFB que é em relação ao OVA. As condições de cultura são as mesmas da figura 44.

Como algumas frações apresentaram indiretamente inibição da proliferação observados nos experimentos de MTT e apoptose, buscamos confirmar estes achados através do conteúdo de DNA nos esplenócitos. Essas análises nos permitem verificar se os esplenócitos encontram-se com a quantidade de DNA que representam as células em fase Sub G0 (Apoptose), G0/G1 (sem atividade de mitose), S (em síntese de DNA) ou G2/M (DNA já duplicado). Na figura 57 observamos que tratamento com dexa diminuiu o número de células em todas as fases do ciclo celular. Quando contamos o número de células ao final das 72 horas de cultura (figura 55), novamente ocorreu um aumento no número de células (342%) quando há o estímulo presente. Novamente NpEtFB e NpEtFAq não causaram mudanças, sendo a contagem de células semelhante à cultura ativada e tratada com meio com etanol por volta de um milhão e meio de células, além de NpEt que abrandou o número de células em apenas 11%, NpEtFH, NpEtFD e NpEtFAe mantiveram sua potência em impedir o crescimento da quantidade de células na cultura em 45%, 72% e 65% respectivamente.

Na figura 57 observamos que NpEtFH, NpEtFD e NpEtFAe inibiram significativamente a passagem das células para fase S (80%, 92% e 78%, respectivamente) em relação à cultura estimulada e cultivada somente em meio com etanol. Podemos observar que NpEtFD diminuiu também o número de células em G2/M (99,5%), inibição também apresentada pela fração NpEtFAe (75%).

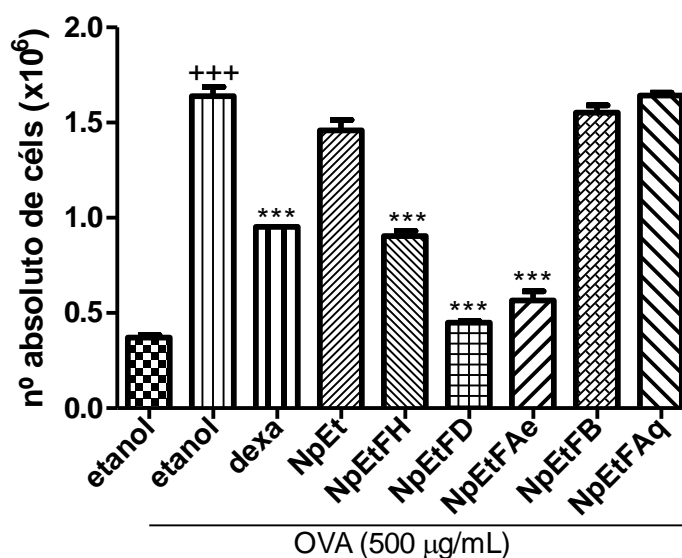
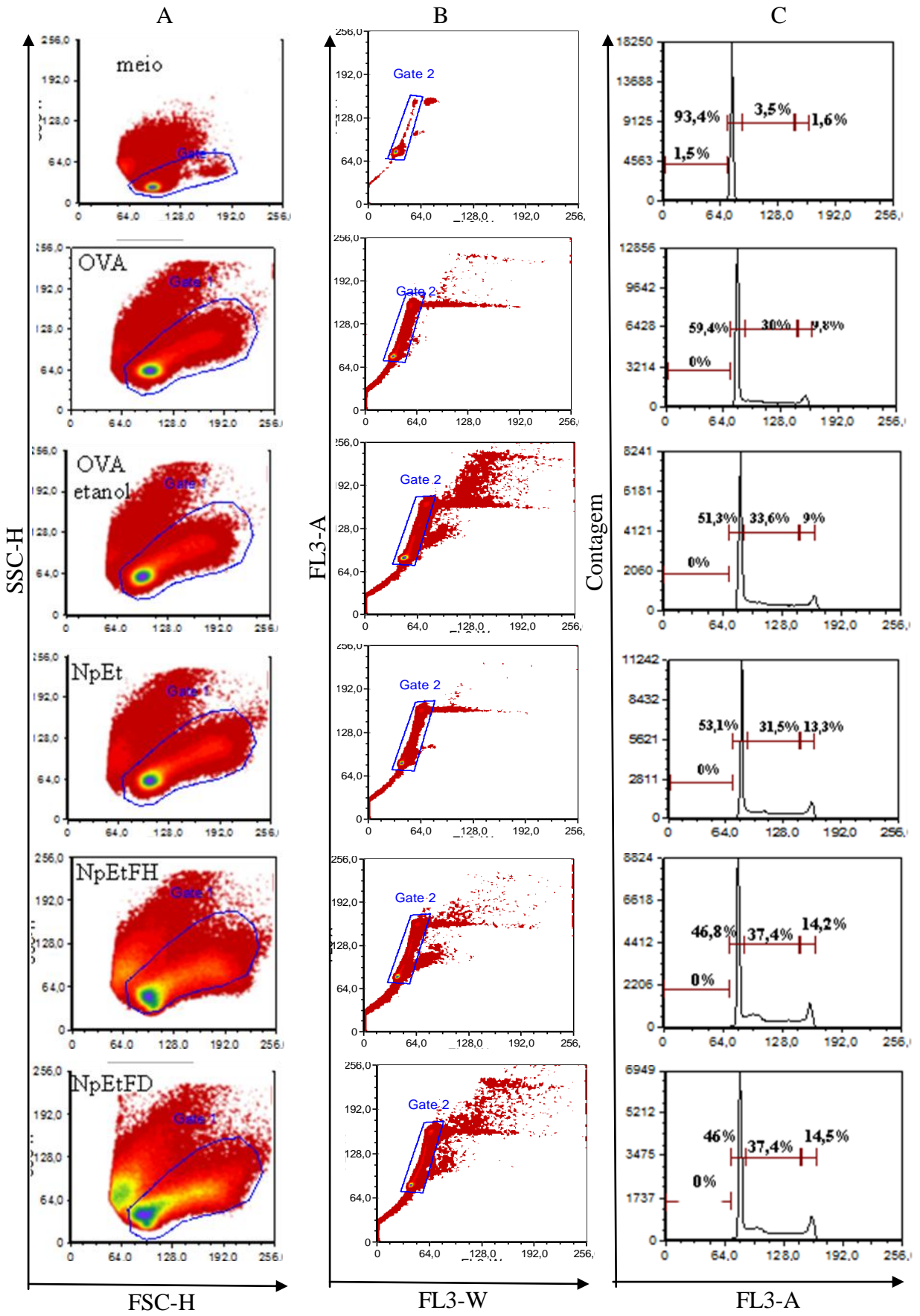


Figura 55: Efeito de NpEt e subfrações sobre a contagem de esplenócitos estimulados com OVA. Esplenócitos de camundongos DO11.10 ( $1 \times 10^6$ / mL) foram cultivados com diferentes concentrações do extrato/frações, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 72h. A dexametasona foi utilizada na concentração de (0,05 µg/mL). Os resultados expressam média  $\pm$  SD de 1 experimento representativo de dois realizados. A contagem foi realizada por exclusão com azul de tripan. Análise estatística realizada pelo método de Tukey. +++p<0,001 em relação ao meio com etanol. \*\*\*p<0,001 em relação ao OVA+etanol.



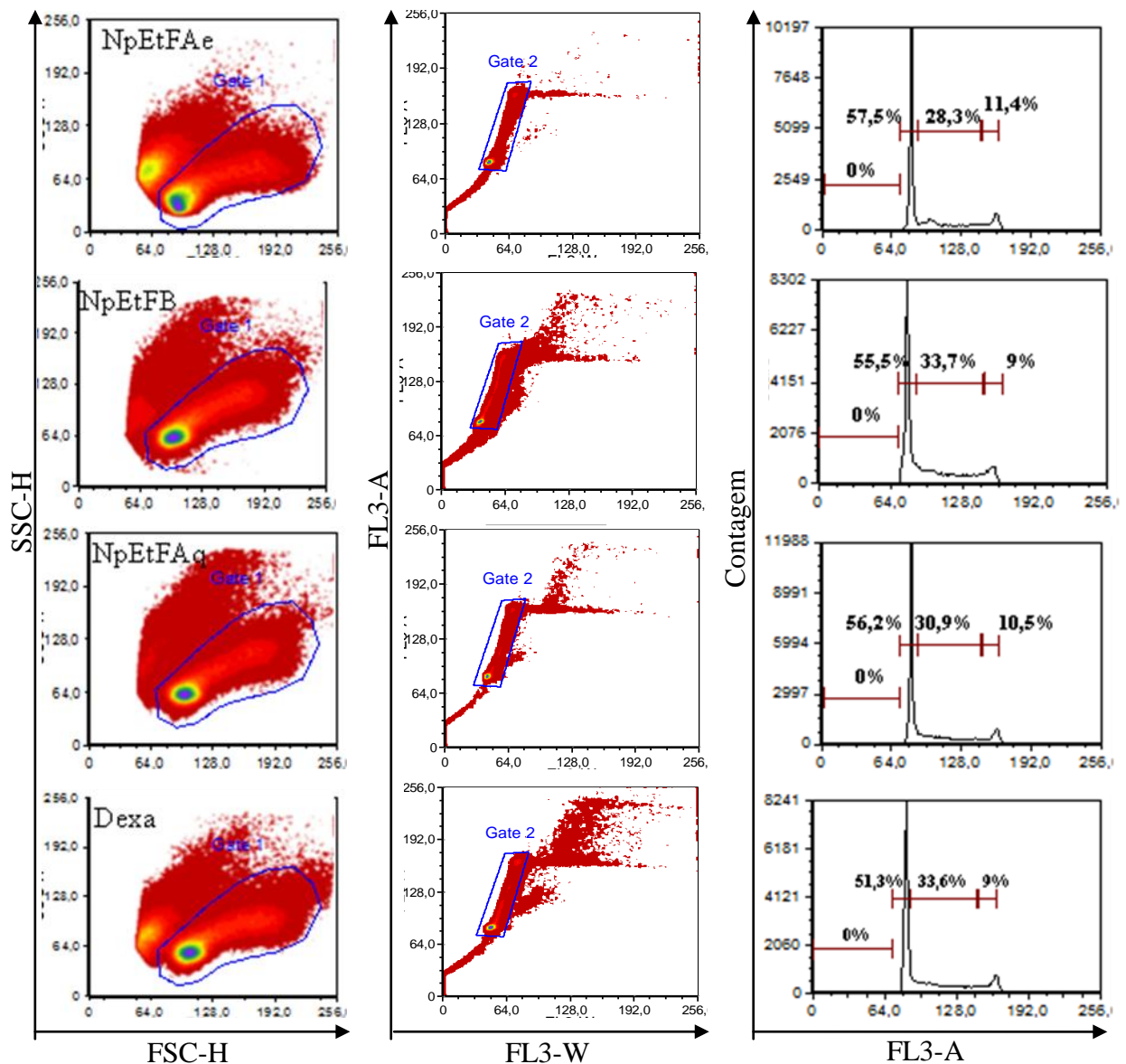


Figura 56: Análise citofluorimétrica do efeito de NpEt/Frações sobre os esplenócitos estimulados com OVA. Coluna A – distribuição dos núcleos em função de tamanho e complexidade, mostrando a região (R)1 do gráfico onde estão os núcleos selecionado para análises posteriores. B – distribuição dos núcleos selecionados em A, em função da área (fluorescência) e largura (tempo) do impulso de fluorescência, mostrando R2. C- histograma mostrando a distribuição dos núcleos selecionados em R2, em função da intensidade de fluorescência, com os percentuais de células nas respectivas fases do ciclo celular (Sub G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>/M). Esplenócitos de camundongos DO11.10 ( $1 \times 10^6$ / mL) foram cultivados com diferentes concentrações do extrato/frações, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 72h. A análise (com  $\lambda$  de 488 nm) foi realizada em citometria de fluxo, após a incubação das células ( $1 \times 10^6$ ) com solução de iodeto de propídeo e triton (15 min) e nova incubação com RNase (15 min). A fluorescência do PI foi detectada pelos canais FL3-A (área), e FL3-W (largura) do aparelho. Foram lidos 50.000 eventos/amostra. dexametasona foi utilizada na concentração de (0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Resultados de um experimento representativo de dois realizados.

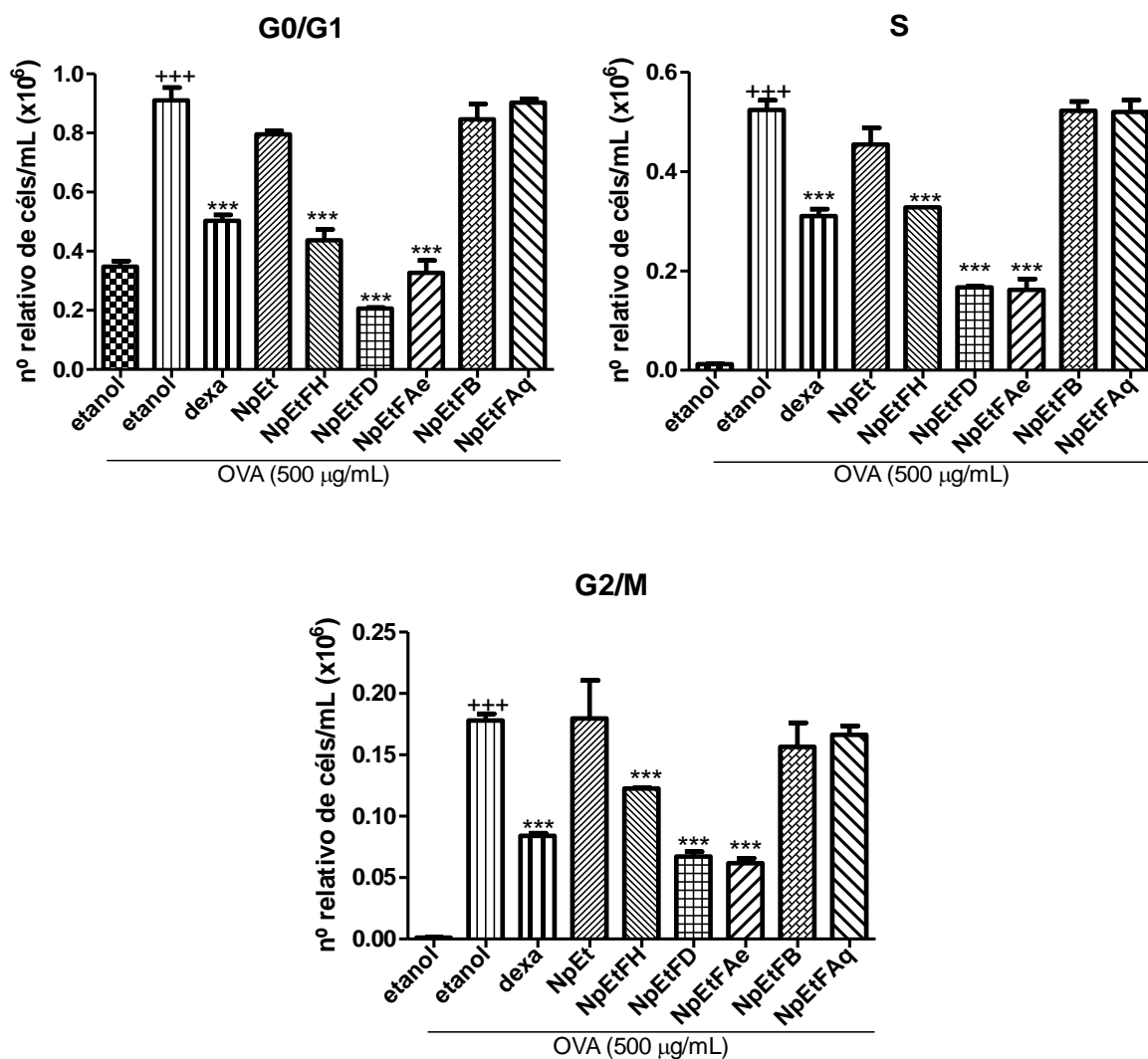


Figura 57: Efeito de NpEt e subfrações sobre o número relativo de esplenócitos estimulados com OVA. Os resultados expressam média  $\pm$  DP de um experimento representativo. Estatística realizada pelo método de Tukey. +++ $p < 0,001$  em relação ao etanol não estimulado. \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao OVA+etanol. As condições de cultura são as mesmas da figura 44.

Para finalizar as análises com os esplenócitos, investigamos o efeito do extrato/frações, na liberação das citocinas, que participam na resposta inflamatória como a IL-4, IL-5, IL-13, que são liberadas pelos linfócitos  $T_H2$ , além da A IL-10 que são produzidas pelas  $T_{reg}$  e IFN- $\gamma$  que são liberadas predominantemente pelas  $T_H1$ . Na figura 58 foi constatado que as células não estimuladas não liberaram citocinas em quantidade que possam ser detectadas pelo método de ELISA. Não obstante, a estimulação com OVA provocou aumento significativo de todas as citocinas relacionadas, e o cultivo em meio com etanol não alterou a liberação das mesmas. Sobre a liberação da IL-4 somente o tratamento com NpEtFD foi capaz de inibir significativamente (77%) a liberação desta citocina. Embora o tratamento com dexa (81%), NpEtFD (83%) foram capazes de inibir a liberação de IL-5, de forma surpreendente o cultivo com a NpEtFH dobrou a liberação desta citocina em relação à cultura com OVA cultivada em



com etanol. A IL-10, também teve sua produção aumentada na cultura estimulada tanto tratada com veículo quanto não tratada, NpEtFH, NpEtFD e NpEtFAe foram as frações que reduziram em 79%, 89% e 53,4%, a liberação desta citocina respectivamente. Com relação a IL-13, novamente as NpEtFH (66%) e NpEtFD (97%), seguida da NpEtFAe (72%) inibiram a liberação desta. Na liberação de IFN- $\gamma$ , além da NpEtFH (74%), NpEtFD (97%), NpEtFAe (82%), NpEt também foi capaz inibir a produção desta em 45%.

NpEtFD foi extremamente mas tóxica como mostrado nas figuras 52 a 54. NpEtFH impediu a proliferação com baixa toxicidade, contudo aumentou ainda mais a liberação de IL-5, em relação as células ativadas e não tratadas, NpEtFAe foi a fração que apresentou um melhor efeito pois, impediu a progressão da proliferação, com baixa toxicidade, além de reduzir a liberação de citocinas importantes como IL-13 e NpEtFB e NpEtFAq não exercem efeito nos linfócitos. Por fim, podemos observar que NpEt possui potência menor que algumas frações em modular negativamente a proliferação e liberação de citocinas dos linfócitos.

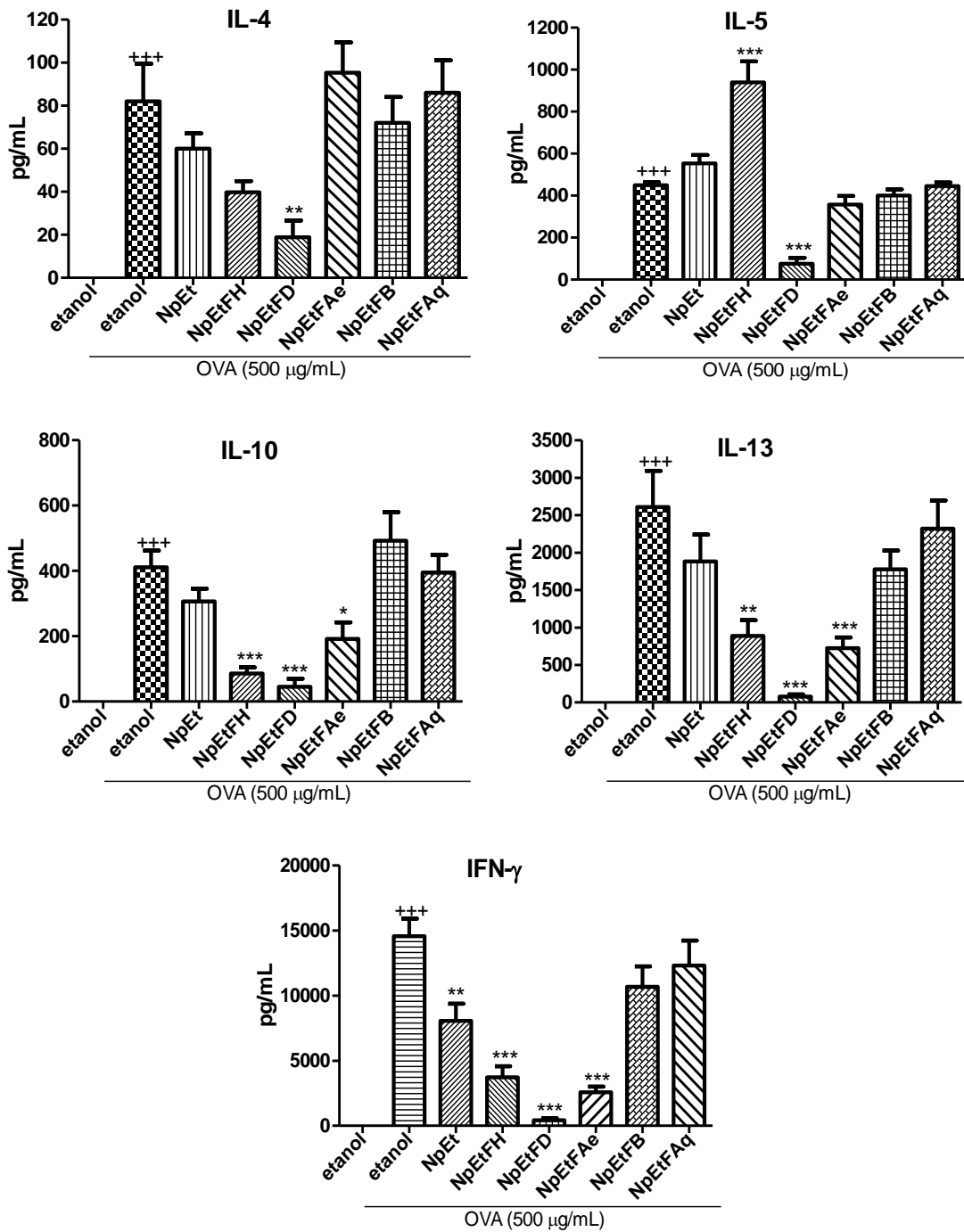


Figura 58: Efeito de NpEt e subfrações sobre a liberação de citocinas de esplenócitos estimulados com OVA. Os resultados expressam média  $\pm$  EPM de três experimentos. Estatística realizada pelo método de Tukey. +++  $p < 0,001$  em relação as células não estimuladas. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao OVA+etanol. As condições de cultura são as mesmas da figura 44.

#### 4.4- Experimentos *in vitro*: efeito de NpEt/frações sobre a ativação de mastócitos

Para as análises do efeito de NpEt e frações sobre os mastócitos, utilizamos as células HMC-1, que é uma célula tumoral mastocítica humana. Inicialmente, avaliamos a toxicidade dos mesmos utilizando o método de MTT. Como visto na cultura de linfócitos, o etanol presente no meio de cultura não influenciou na atividade mitocondrial das células, mostrando novamente que a possível presença de citotoxicidade não é proveniente do etanol. Na figura 59 vimos que tanto o extrato, como as frações, mesmo na concentração de 100 µg/mL não foram tóxicas para as células, mas vimos que NpEtFD inibiu em 20% a D.O. das células na concentração de 100 µg/mL, nos mostrando que possivelmente esta pode ser a mais tóxica para este tipo de célula, assim como observamos com os linfócitos.

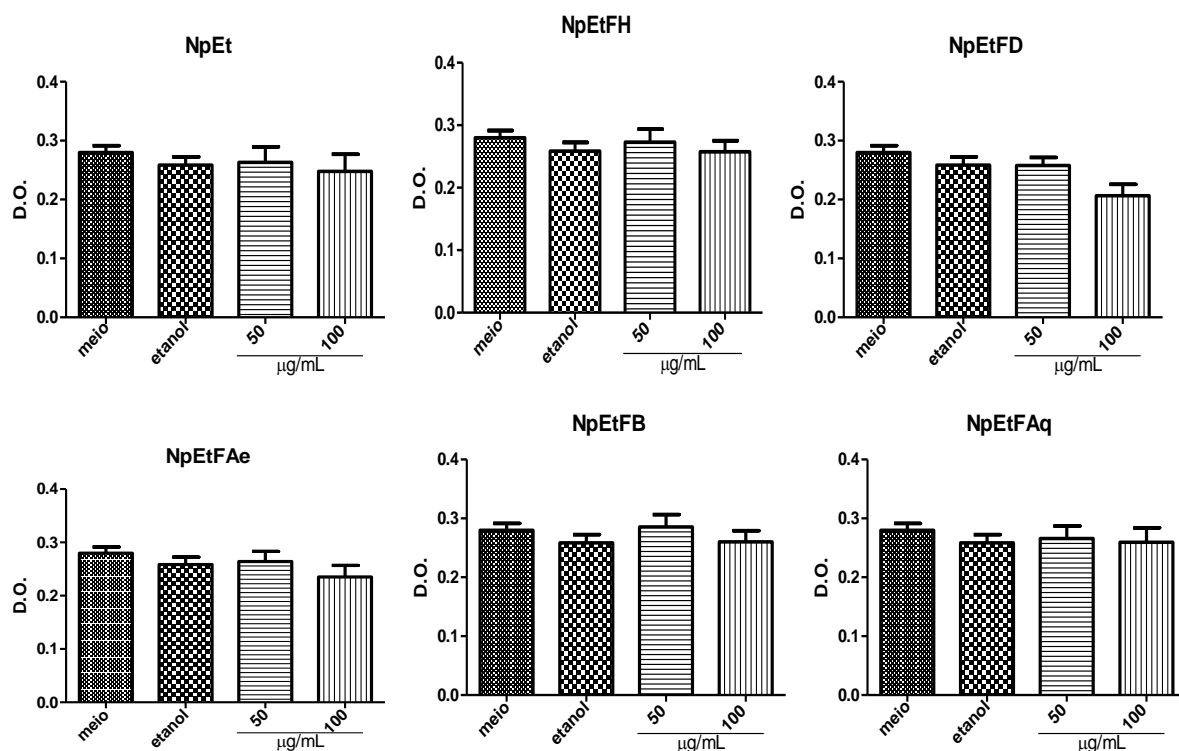


Figura 59: Avaliação do efeito citotóxico de NpEt e subfrações sobre as células HMC-1 pelo método de MTT. HMC-1 ( $2 \times 10^6$  / mL) foram cultivados com diferentes concentrações do extrato/frações, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 8h. Nas últimas quatro horas de cultura, foi adicionado a cada poço 10 µL da solução de MTT a 5 mg/mL. Os resultados expressam média ± EPM de pelos menos 2 experimentos. Estatística realizada pelo método de Tukey em relação ao etanol com exceção das frações NpEtFAq e NpEtFB que é em relação ao meio.

Com relação a liberação de citocinas (figura 60), notou-se um perfil semelhante de efeito entre os extratos e frações. Observamos uma alta liberação de IL-6, com uma média de 3,6 µg /mL na cultura com tratamento com veículo, seguida da liberação de IL-8 (383 pg/mL). Tanto NpEt quanto as frações, não foram capazes de inibir de forma significativa a liberação

de IL-6. Quando analisamos IL-8, vimos que tanto NpEt quanto todas as frações mais apolares foram capazes de diminuir a liberação desta citocina, NpEt inibiu em 20%, seguida da NpEtFAe (13,6%) e NpEtFH (11,5%), vale destacar que a NpEtFD foi a que mais apresentou efeito (33%), sugerindo que seja pela sua tendência a depreciar a viabilidade dos mastócitos. A citocina IL-13 foi pouco detectada em oito horas de cultura, sendo inclusive, não detectada na dosagem de alguns experimentos. Neste representado na figura 60 apenas a NpEtFD inibiu em 40% a liberação desta citocina.

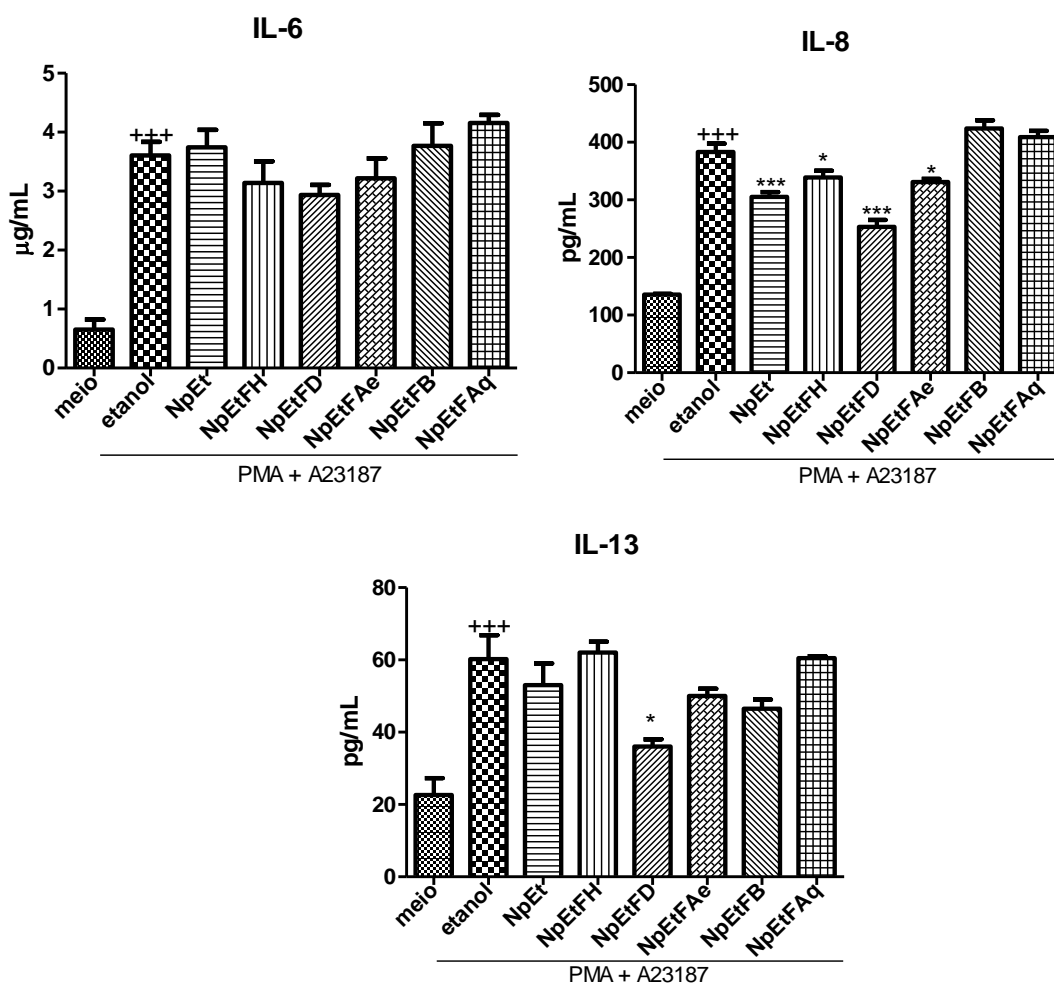


Figura 60: Efeito de NpEt e subfrações sobre a liberação de citocinas das células HMC-1 estimulados com A23187 e PMA. HMC-1 ( $2 \times 10^6$ / mL) foram cultivados, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 8h. Os resultados expressam média  $\pm$  EPM de um experimento representativo. Estatística realizada pelo método de Tukey +++p<0,001 em relação as células não tratadas (meio). \*p< 0,05, \*\*p< 0,01, \*\*\*p<0,001, em relação ao PMA etanol.

Além das citocinas, os mastócitos também liberam mediadores importantes para reação alérgica. Estes mediadores são originados com a participação da enzima COX2, por isso

decidimos investigar a expressão desta enzima quando estimuladas e tratadas com NpEt e frações. Utilizamos o método de *western blotting* para análise da expressão desta enzima. Na figura 61 vimos um aumento na expressão desta enzima quando as células são estimuladas com PMA e ionóforo e não tratadas, e não foi observado diferença na cultura tratada com meio contendo etanol. Tanto o extrato quanto as frações inibiram a expressão desta enzima após oito horas de cultivo e de forma interessante, NpEt foi um pouco menos eficaz que suas frações nesta inibição.

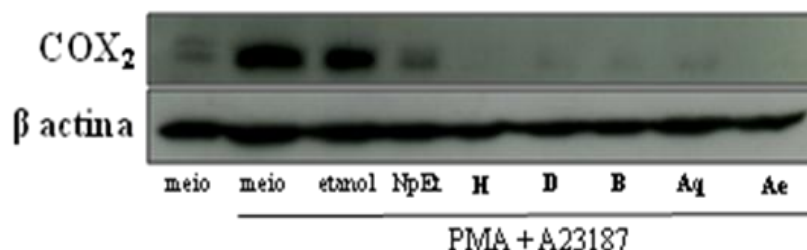


Figura 61: Efeito de NpEt e subfrações sobre a expressão de COX2 nas células HMC-1 estimulados com A23187 e PMA pelo método de *western blotting*. HMC-1.  $2 \times 10^6$ /mL foram estimulas com A23187 (1  $\mu$ M) e PMA (50 nM) e tratadas com NpEt e subfrações na concentração de 50  $\mu$ g/mL. O cultivo foi realizado em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 8hs. Os resultados de um experimento representativo.

#### 4.5- Experimentos *in vitro*: efeito de NpEt/frações sobre a ativação de eosinófilos

Outro tipo celular que foi investigado foram os eosinófilos, pois são células consideradas uma das mais importantes na participação da resposta alérgica e no caso dos nossos estudos a asma. Para analisar o efeito do extrato/frações nestas células, utilizamos eosinófilos derivados de medula de camundongos e avaliamos a ativação destas células através da modulação do número de corpúsculos lipídicos, que são organelas de participação importante na modulação da resposta inflamatória, por ser compartimento de armazenagem de vários mediadores inflamatórios. Na figura 62, vemos que os eosinófilos já possuem, de forma basal, uma média de  $19,0 \pm 0,8$  corpúsculos por célula. Quando os eosinófilos são incubados com eotaxina/CCL11, um importante quimiotático para estas células, as mesmas aumentam sua quantidade de corpúsculo em 48% ( $28,1 \pm 1,08$ ). O pré-tratamento apenas com etanol a 0,17% não impediu a produção de corpúsculos quando comparado com as células que sem tratamento. Quando as células foram pré-incubadas com o extrato/frações, na concentração de 10  $\mu$ g/mL, NpEt (18%), NpEtFD (32,5%), NpEtFB (30%) e NpEtFAq (23,5%) reduziu significativamente a número de corpúsculos das células. Na concentração de 50  $\mu$ g/mL NpEt,

NpEtFD e NpEtFAq inibiram a produção de corpúsculo em torno de 30% enquanto que a NpEtFH diminuiu em 20%. E de forma interessante NpEtFB não inibiu a produção destas organelas.

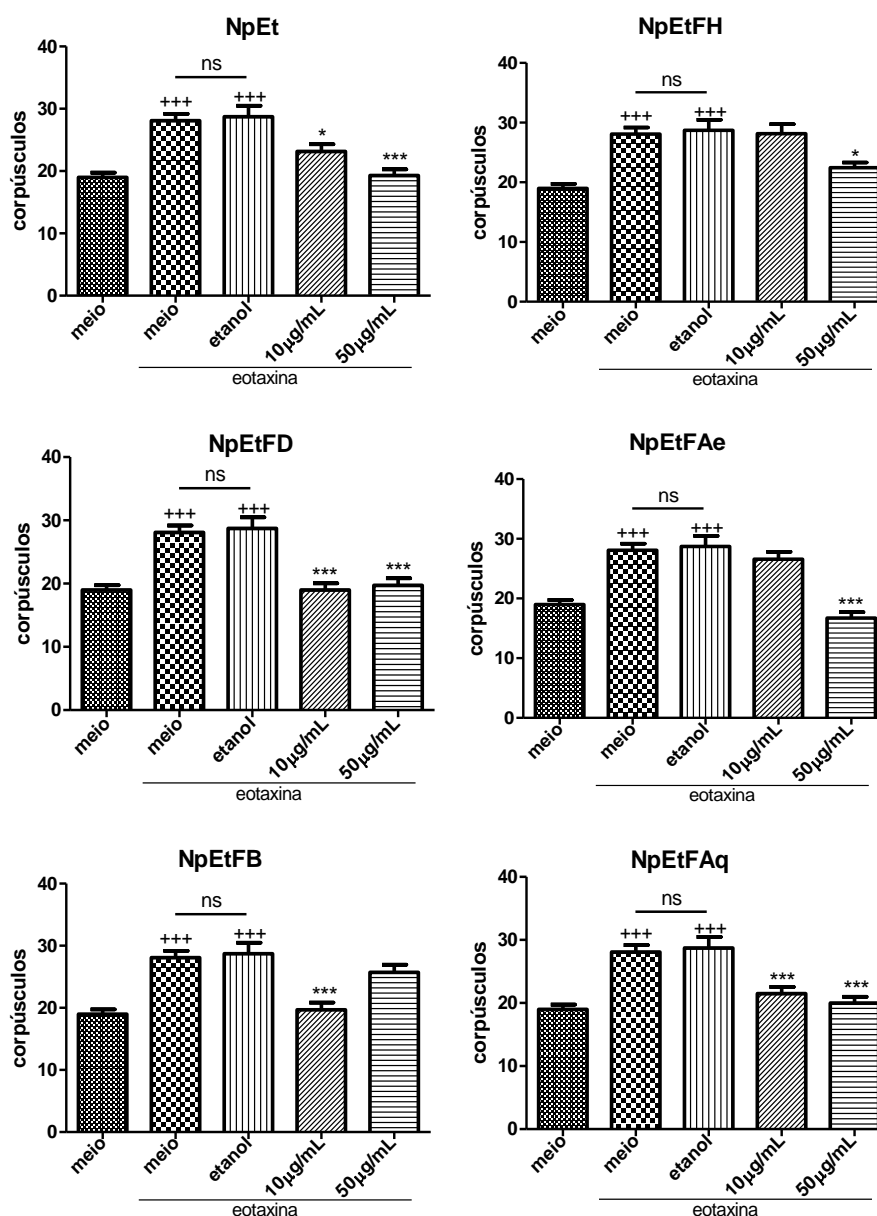


Figura 62: Efeito de NpEt e subfrações sobre na formação de corpúsculos em eosinófilos estimulados com eotaxina. Eosinófilos ( $3 \times 10^6$  céls/mL) são pré-tratados com os extratos/frações por 30 min. Nas doses de 10 e 50 µg/mL. Após, as células são estimuladas ou não com eotaxina (10 ng/ml) por 1h a 37°C. São contados corpúsculos de 50 células em cada condição. Os resultados expressam média  $\pm$  EPM de duas culturas. Estatística realizada pelo método de Tukey. +++p<0,001 em relação as células não tratadas (meio). \*p< 0,05, \*\*p< 0,01, \*\*\*p<0,001 em relação ao etanol com exceção das frações NpEtFAq e NpEtFB que é em relação ao meio com eotaxina/CCL11.

Como houve inibição dos corpúsculos, verificamos se esta inibição não seria devido a toxicidade de NpEt e frações, como foi realizado com os linfócitos e mastócitos. Desta vez, analisamos a toxicidade pelo ensaio de apoptose com Anexina e PI, como na figura 53.

Na figura 63 há os citogramas de tamanho x granulosidade dos eosinófilos. Entre as células viáveis podemos notar dois grupos celulares, um com menor densidade de células com alta granulosidade e outro grupo com maior densidade de células possui células com tamanho maior e também alta granulosidade. Selecionamos estes dois grupos para averiguar a porcentagem de células vivas, em apoptose e mortas, mostrados na coluna B. Tanto os eosinófilos não estimulados quanto os estimulados com eotaxina apresentaram uma média de 60% de células vivas, 24% em apoptose inicial e 16% de células mortas. Basicamente todos os tratamentos apresentam o mesmo perfil, nos indicando que nenhum dos tratamentos foram capazes de reduzir a viabilidade das células em uma hora e trinta minutos de cultivo.

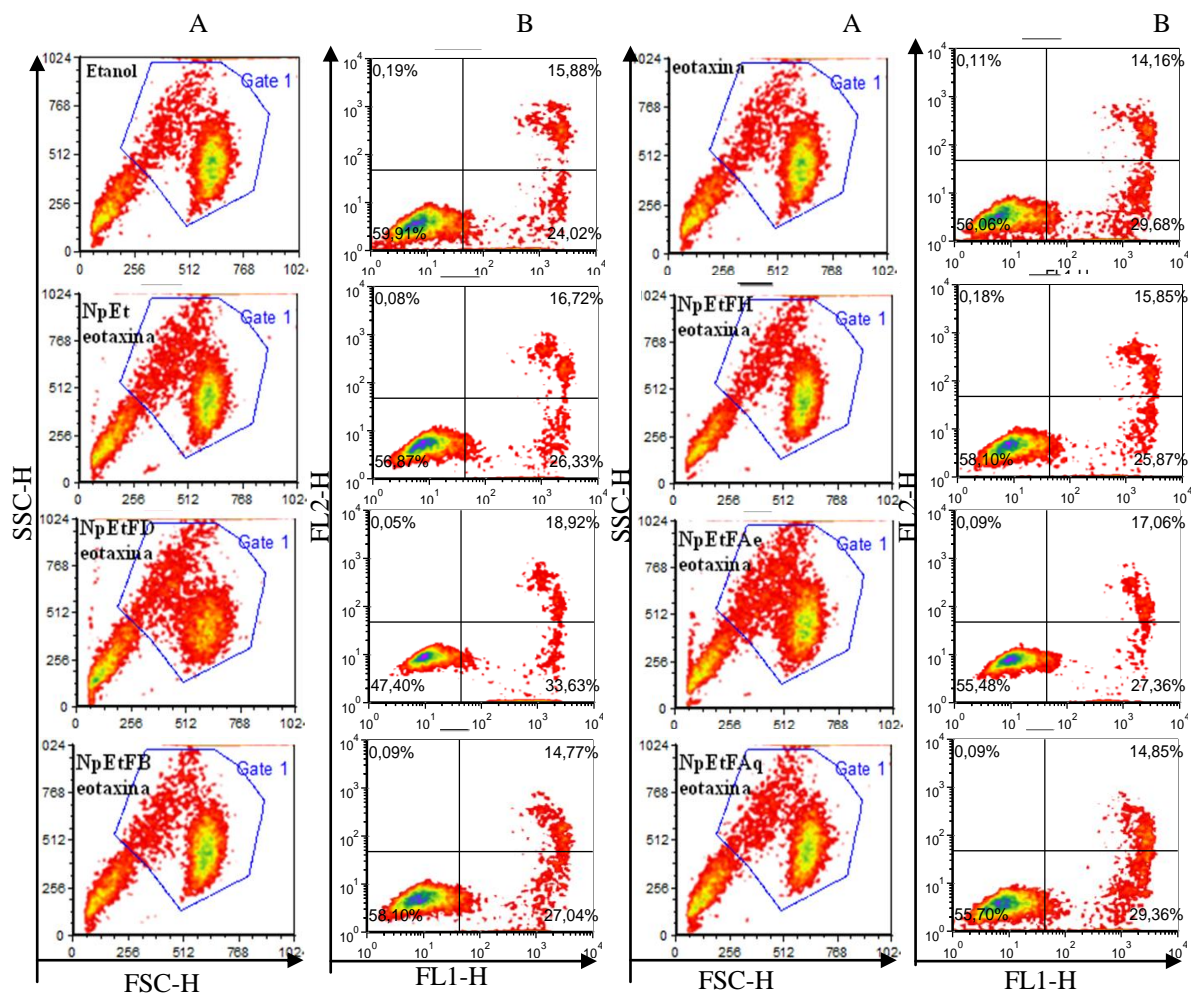


Figura 63: Análise citofluorimétrica de eosinófilos tratados por 1h e 30 min com NpEt e frações. Eosinófilos ( $3 \times 10^6$  céls/mL) foram pré-tratados com os extratos/frações (50  $\mu$ g/mL) por 30 min. Após, as células são estimuladas ou não com eotaxina/CCL11 (10 ng/ml) por 1h a 37°C. Colunas A – Distribuição das células em função de tamanho (FSC-H) e complexidade (SSC-H), mostrando a região (Gate 1), do gráfico onde estão as células utilizadas para as análises posteriores. Colunas B: Distribuição das células selecionadas da região 1 em função da fluorescência a Anexina V (FL1-H) versus PI (FL2-H). Experimento representativo. As condições de cultura são as mesmas da figura 54.

#### 4.6- Experimentos *in vitro*: efeito de NpEt/frações sobre hepatócitos

HepG2 é um hepatoma humano e tem sido extensamente utilizado em estudos de toxicidade de compostos ou substâncias. Na figura 64 observamos que nem os extratos nem as frações são tóxicas para estas células mesmo na dose mais alta. O que deve ser destacado é o aumento da atividade redutora nas culturas tratadas com NpEtFAq e NpEtFAe, sendo que NpEtFAe causou um aumento mais pronunciado (46%).

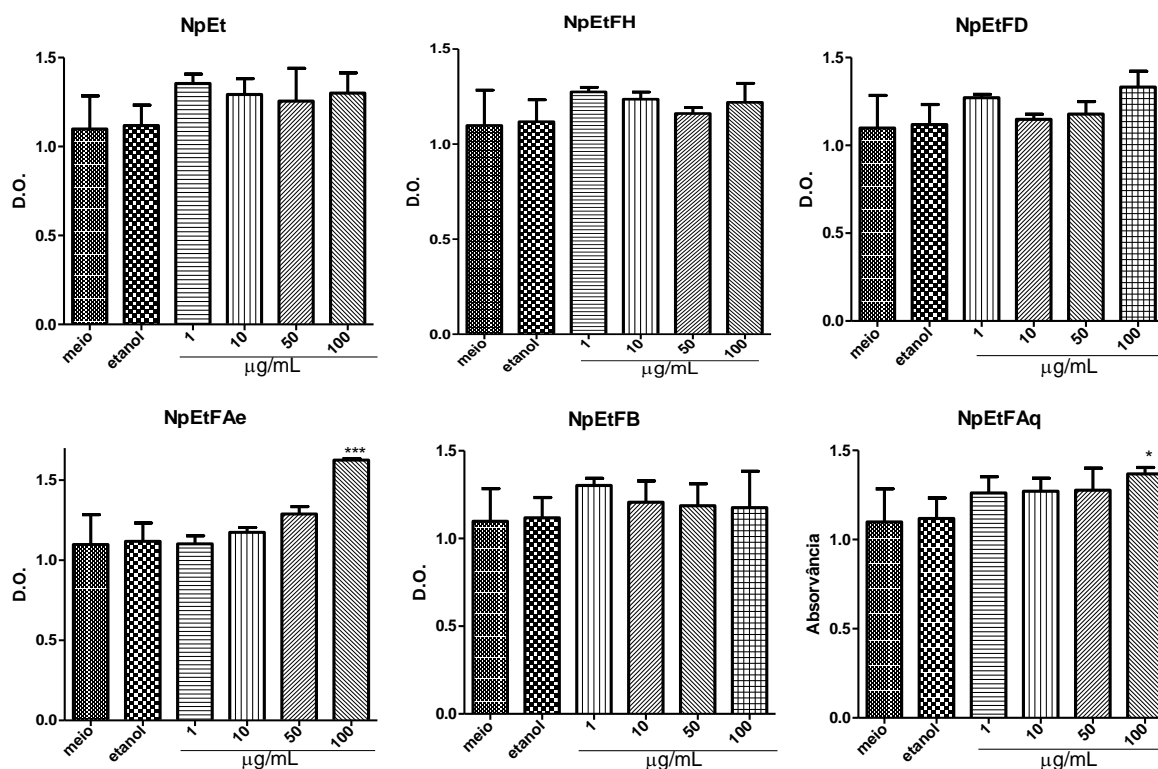


Figura 64: Avaliação do efeito citotóxico de NpEt e subfrações sobre as células HepG2 pelo método de MTT. As células (60.000/poço) foram cultivadas com diferentes concentrações do extrato/frações, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24h. Nas últimas quatro horas de cultura, foi adicionado a cada poço 10 µL da solução de MTT a 5 mg/mL. Os resultados expressam média ± DP de um experimento representativo. Estatística realizada pelo método de Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao meio com etanol (etanol).

Analisando os resultados dos dados *in vitro* em conjunto observamos que NpEt exerceu efeito e, todas as células testadas, porém de forma menos eficaz do que suas frações. NpEtFH, embora diminuiu a proliferação dos linfócitos, paradoxalmente, causou um aumento na liberação de IL-5, efeito este não desejável para o tratamento de alergia. NpEtFH também inibiu a IL-8 liberada pelos mastócitos e a expressão de COX2 além da inibição da produção de corpúsculo lipídico na dose mais alta. NpEtFD mostrou eficiência em inibir a ativação de todas as células, porém devido a sua toxicidade, que foi mostrada mais claramente com os linfócitos. Portanto NpEtFD também não é uma boa opção para a continuidade dos estudos em experimentos *in vivo*. NpEtFAq e NpEtFB tiveram efeito semelhante nos experimentos *in vitro*, inibiram a expressão da COX2 nos mastócitos, apresentaram efeito na inibição da



produção de corpúsculo lipídico nos eosinófilos, porém não apresentaram modulação nos linfócitos, nem inibiram a liberação de citocinas nos mastócitos, por isso também não foram selecionadas para os experimentos *in vivo*.

NpEtFAe foi a única fração que modulou negativamente todas as células testadas: nos linfócitos, esta inibiu a proliferação sem toxicidade, além de impedir a liberação de IL-13, citocina importante, para reações alérgicas além de outras citocinas. Nos mastócitos, inibiu a liberação de IL-8 e expressão de COX2 e nos eosinófilos foi capaz também de impedir a produção dos corpúsculos. Outro fator interessante é que das concentrações de 1 a 50 µg/mL não diminuiu a viabilidade dos hepatócitos, apenas a concentração de 100 µg/mL é que aumentou a atividade redutora mitocondrial das mesmas. Com isso, esta fração foi a escolhida para retorno dos testes *in vivo*. Um resumo das análises *in vitro* da intensidade dos efeitos de NpEt/frações sobre os diferentes fenômenos estudados está ilustrado na tabela 5.

Tabela 5: Resumo do efeito do extrato/frações nos experimentos *in vitro*.

células/análises	NpEt	NpEtFH	NpEtFD	NpEtFAe	NpEtFB	NpEtFAq
Linfócitos T toxicidade	SE	+	+++	SE	SE	SE
Linfócitos T proliferação	SE	++	+++	+++	SE	SE
Linfócitos T citocinas	+	++	+++	++	SE	SE
Mastócitos toxicidade	SE	SE	SE	SE	SE	SE
Mastócitos citocinas	++	+	++	+	SE	SE
Mastócitos COX2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Eosinófilos toxicidade	SE	SE	SE	SE	SE	SE
Eosinófilos corpúsculos lipídicos	++	+	+++	+	+	+++

SE - sem efeito, + - efeito pouco pronunciado, +++ - efeito muito pronunciado  
++ - efeito intermediário

#### **4.7 - Inflamação alérgica pulmonar, asma estabelecida: Análise do efeito da fração NpEtFAe**

Para verificarmos se NpEtFAe é mais potente do que NpEt em impedir a migração dos eosinófilos realizamos uma curva dose resposta da fração no modelo de asma estabelecida (figura 65) e observamos que todas as doses testadas foram capazes de inibir a migração das células totais em 36%, 44% e 49% nas doses de 1, 10 100 mg/Kg respectivamente. Os mononucleares também foram diminuídos por todos os tratamentos em 45% a 55%. Para os eosinófilos todas as doses se mostraram eficientes onde a dose de 1mg/kg reduziu em 23%, 10mg/kg em 45% e a dose de 100 mg/Kg em 57%, semelhante a dexta com uma redução de 59%. Entre os tratamentos só houve diferença estatística entre as doses de 1 e 100 mg/kg.

Embora NpEt na dose de 100mg/kg não demonstrou alta eficiência em inibir a migração de eosinófilos, após a indução da inflamação alérgica, NpEtFAe de forma dose dependente foi capaz de impedir a progressão deste fenômeno.

Embora todas as doses de NpEtFAe e a dexametasona tenham inibido a migração dos eosinófilos o resultado da dosagem de EPO no sobrenadante do BAL não é semelhante, como demonstrado na figura 66. Inibição significativa somente ocorreu com a dose de 1 e 100 mg/kg com redução em torno de 55%, em relação ao grupo OVA, enquanto de NpEtFAe na dose de 10 mg/kg e dexta apresentaram diminuição da EPO em torno de 26,6%. Como não houve diferença entre os tratamentos de 10 e 100 mg/kg utilizamos a dose de 10 mg/kg para as análises posteriores.

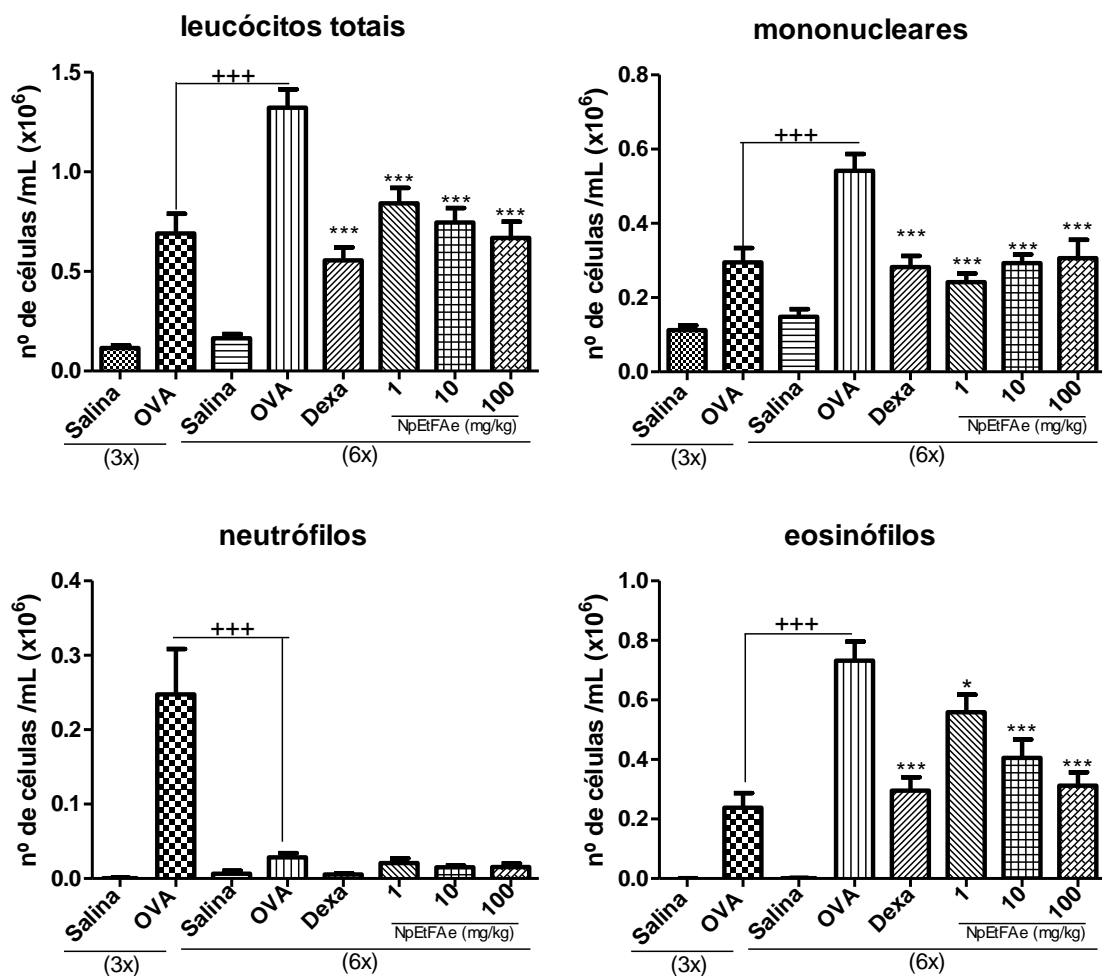


Figura 65: Efeito de NpEtFAe sobre a celularidade do BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu$ L) de OVA (10 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEtFAe ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ EPM de pelo menos dois experimentos (n > de 10 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++p<0,001 em relação ao grupo OVA (3x), \*\*\*p<0,001 e \*p<0,05 em relação ao grupo OVA (6x).

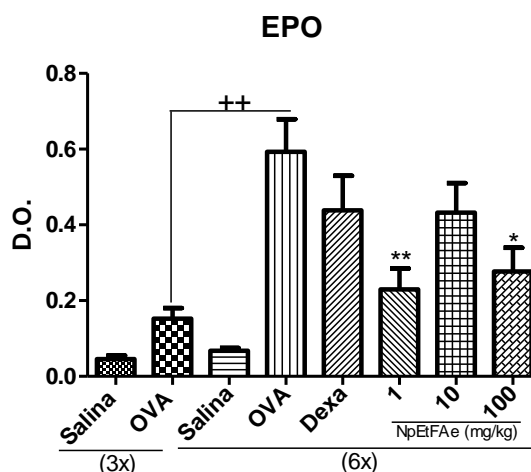


Figura 66: Efeito de NpEtFAe sobre a liberação de EPO no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEtFAe (10 mg/kg) ou dexta (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de pelo menos dois experimentos (n > de 10 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++p<0,001 em relação ao grupo OVA (3x), \*\*p<0,01 e \*p<0,05 em relação ao grupo OVA (6x).

Como NpEtFAe se mostrou eficiente em inibir a migração dos eosinófilos, verificamos a participação das citocinas pró inflamatórias da alergia, a fim de analisarmos a participação das mesmas na inibição da resposta. Na figura 67 observamos que a quantidade da citocina IL-4 é decrescida em 109% após mais três dias de aerolização, e NpEtFAe decresceu apenas 34%. IL-5 tendeu a um aumento de 28% em relação ao grupo OVA 3x, no relativo a NpEtFAe, houve um decréscimo de 32% da mesma. IL-13 apresentou um comportamento semelhante a IL-5 com um crescimento de 69% em relação ao OVA (3x), NpEtFAe apresentou maior eficiência em reduzir esta citocina (54%). Dexametasona praticamente aboliu a liberação de todas as citocinas testadas, com uma 90% de redução em média. Como se trata de apenas um experimento, muitas destas modulações não foram estatisticamente significativas.

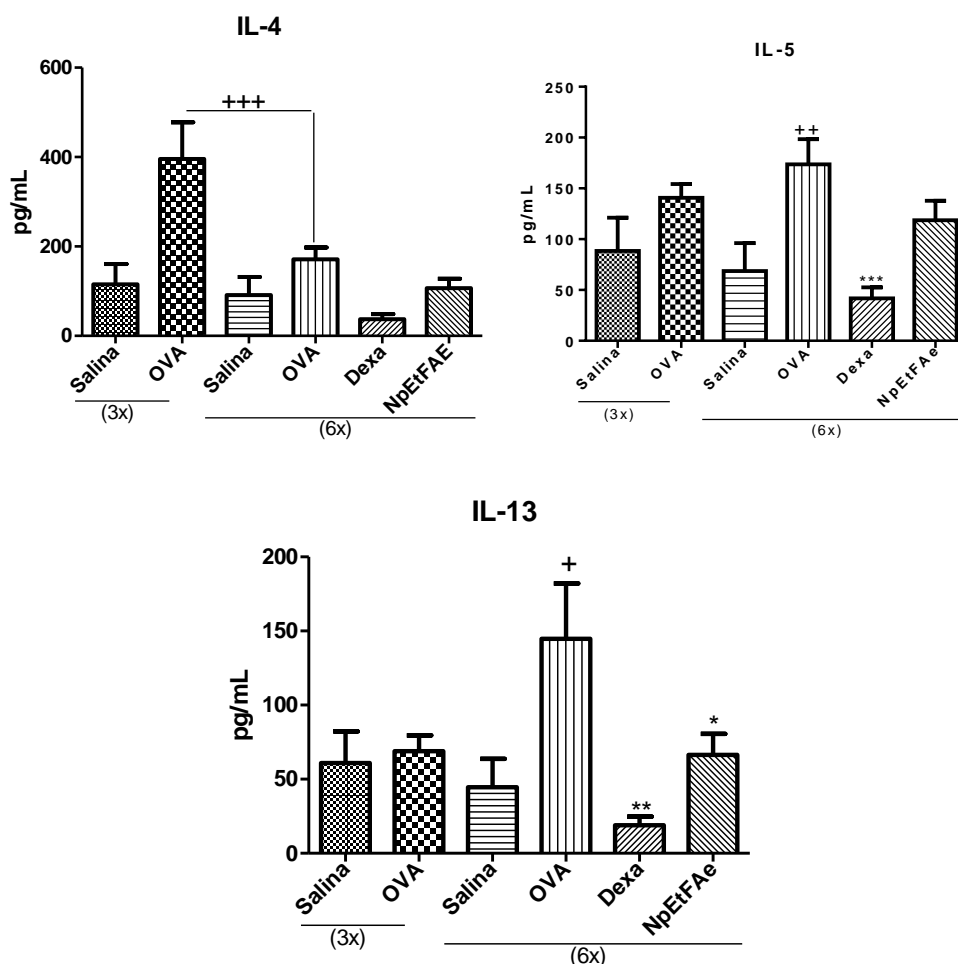


Figura 67: Efeito de NpEtFAe sobre a liberação de citocinas no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 minutos com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEtFAe (10 mg/kg) ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 6h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de dois experimentos (n ≥ 10 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +p<0,05 em relação ao grupo OVA (3x), \*\*\*p<0,001 e \*p<0,05 em relação ao grupo OVA (6x).

Também decidimos avaliar se a inibição da migração seria devido a modulação negativa eotaxina/CCL11 e o mediador lipídico PGD<sub>2</sub>. Neste sentido, pudemos notar que quando aerolizamos por mais três vezes, mesmo que ocorra um aumento no número de eosinófilos, não se verifica aumento na liberação de eotaxina/CCL11, em relação ao último dia de aerolização e os tratamentos não interferiram nesta liberação (figura 68). Em se tratando de PGD<sub>2</sub>, a contínua aerolização com tratamento com veículo, causou uma diminuição de 28% em relação aos animais que foram aerolizados por três dias. Dexametasona causou uma inibição significativa da presença deste eicosanóide em 40% e NpEtFAe não causou interferência em relação ao grupo OVA 6x, indicando que *in vivo* NpEtFAe não atua via estes mediadores para inibir a migração dos eosinófilos.

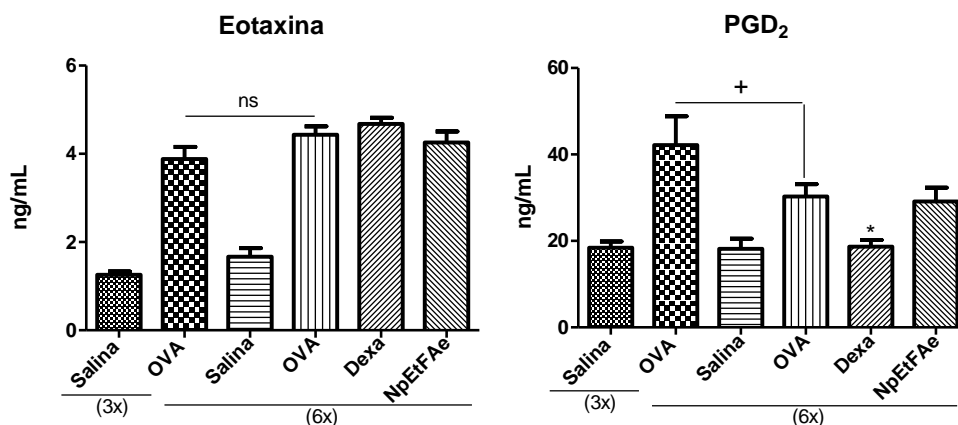


Figura 68: Efeito de NpEtFAe sobre a liberação de eotaxina e PGD<sub>2</sub> nos pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica e aerolizados por três dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEtFAe (10 mg/kg) ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de pelo menos dois experimentos (n > de 10 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +p<0,05 em relação ao grupo OVA (3x), \*\*\*p<0,001 e \*p<0,05 em relação ao grupo OVA (6x).

Analisando histologicamente os pulmões dos animais, observamos um intenso infiltrado perivascular e peribronquiolar além da alteração nas células epiteliais em comparação ao grupo salina (figura 69).

O gráfico de análise do infiltrado peribronquiolar (figura 70), mostrou que o tratamento com NpEtFAe inibiu tanto as células totais, quanto os mononucleares, em torno de 35%, inibição esta semelhante ao tratamento com dexametasona. Somente NpEtFAe inibiu o infiltrado de neutrófilos (76%) e assim como no BAL inibiu também a infiltrado de eosinófilos peribronquiolares em 54%.

Os mesmos cortes foram analisados também para a verificação da metaplasia das células globet (figura 70). O grupo OVA junto com o infiltrado, apresentou grande quantidade de células globets metaplásicas acarretando um estreitamento no lúmen bronquiolar. Estas alterações não foram revertidas pela administração de dexametasona e nem NpEtFAe.

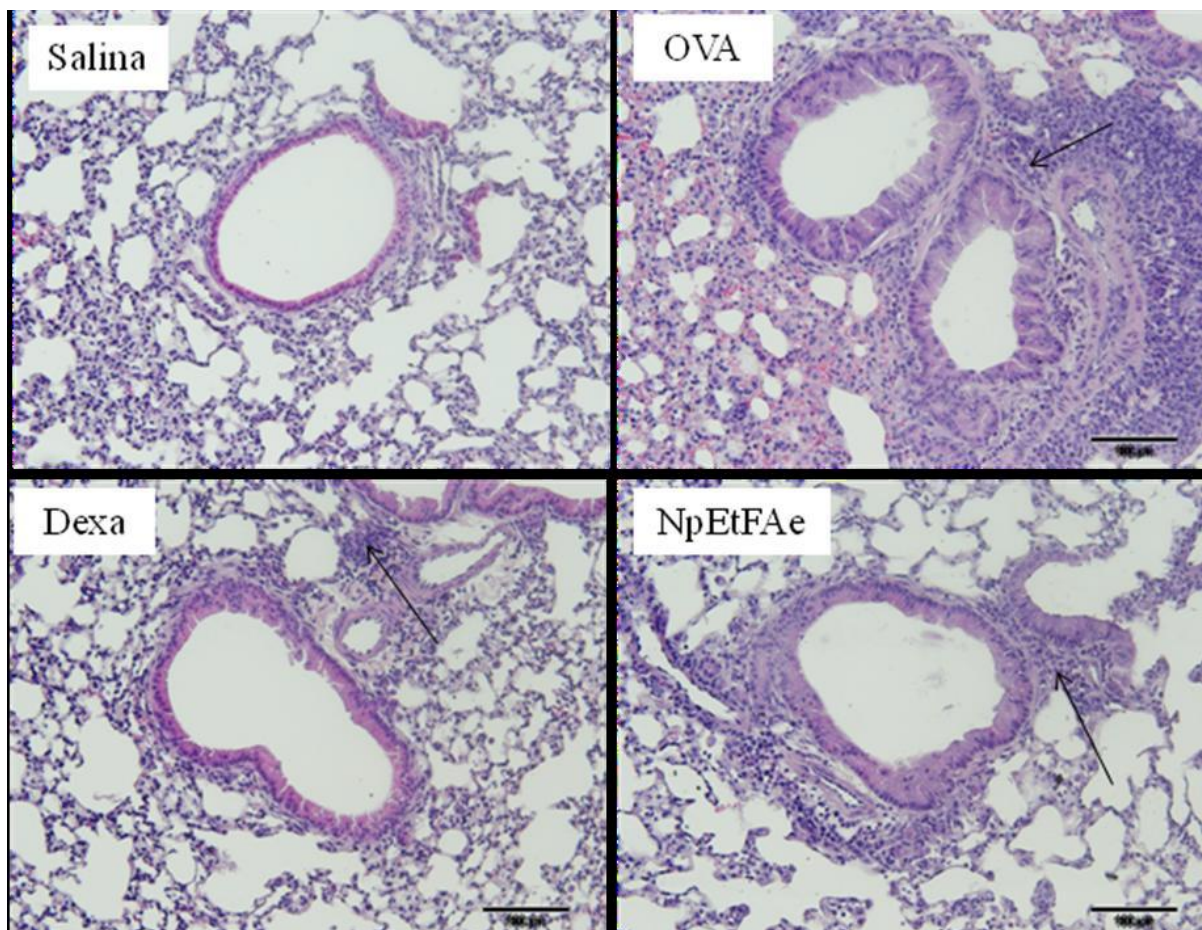


Figura 69: Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com H&E). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu$ L) de OVA (10 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEtFAe (10 mg/kg) ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Imagens representativas da figura 70. Barra de escala 100  $\mu$ M. As setas indicam acúmulo de células inflamatórias. A estrela indica estreitamento das vias aéreas.

Como observamos mudanças celulares, tal como crescimento da eosinofilia, aumento na liberação de citocinas e outros mediadores, além de alterações histológicas quando os animais são aerolizados e tratados com veículo, procuramos verificar como estava a função pulmonar destes animais e se os tratados foram capazes causar alguma alteração. Na figura 73 observamos os gráficos com os resultados de hiperreatividade, que nos revela que os animais alérgicos apresentam comprometimento pulmonar em relação aos animais aerolizados com salina. O gráfico de resistência demonstra que, a diferença entre OVA e salina somente foi significativa na dose de 9 mg/mL de metacolina com um crescimento de 46%, nem dexametasona, nem NpEtFAe foram capazes de alterar o aumento da resistência dos animais. Já no gráfico de complacência, vemos uma diferença mais clara entre o grupo OVA e o salina com redução de 43% quando não há metacolina, até em torno de 100% nas doses de 3 a 9 mg/mL. Novamente os tratamentos mostraram-se ineficazes em reverter estas alterações. Analisamos também a elastância, que é o inverso da complacência, o grupo não desafia do com

salina (salina) somente apresentou diferença significativa com relação ao grupo OVA nas doses de 3 a 27 mg/mL (50%). Desta vez, apenas a grupo dexametasona apresentou melhora neste parâmetro, com redução de 32%. Com isso, sugerimos que NpEtFAe não foi capaz de reverter a hiperreatividade quando o tratamento foi administrado quando os animais já apresentavam comprometimento dos pulmões, dexametasona também não foi eficaz.

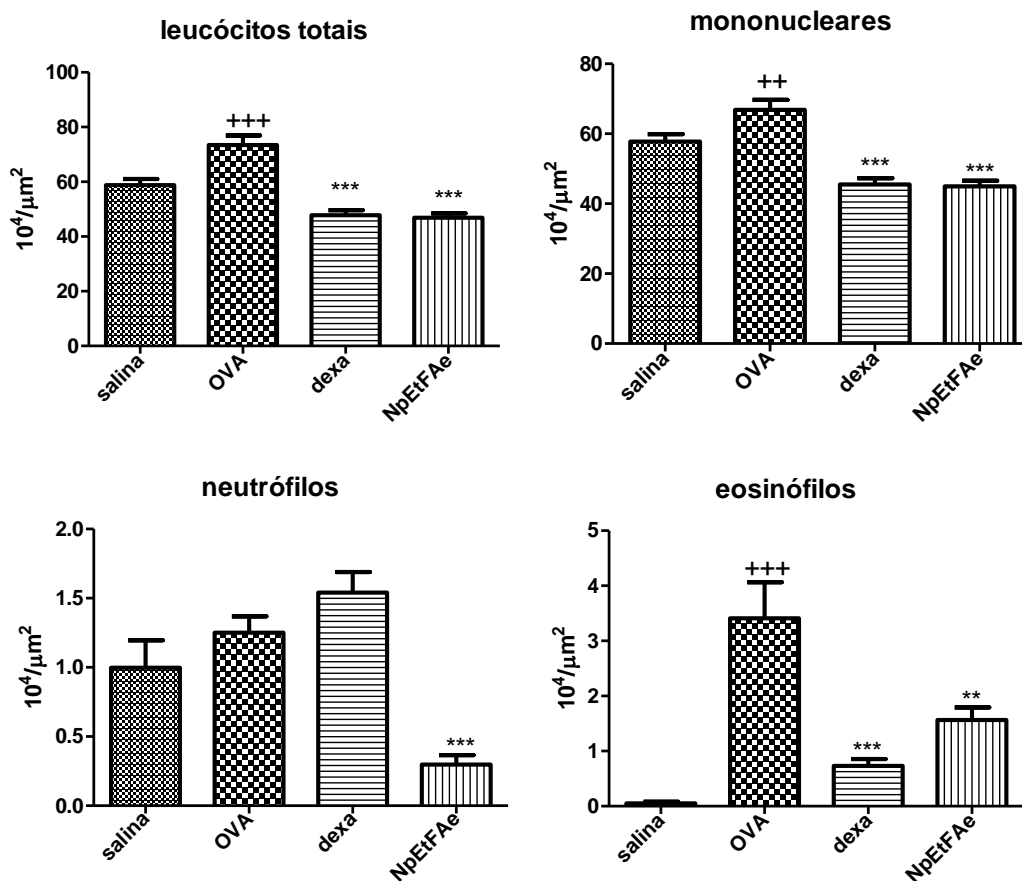


Figura 70: Análise peribronquiolar nos pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com H&E). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200  $\mu\text{L}$ ) de OVA (10 $\mu\text{g}$ ) e  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEtFAe (10 mg/kg) ou dexa (2mg/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ EPM de 3 pulmões (6 bronquíolos por pulmão). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++p<0,001 em relação ao grupo salina, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo OVA.



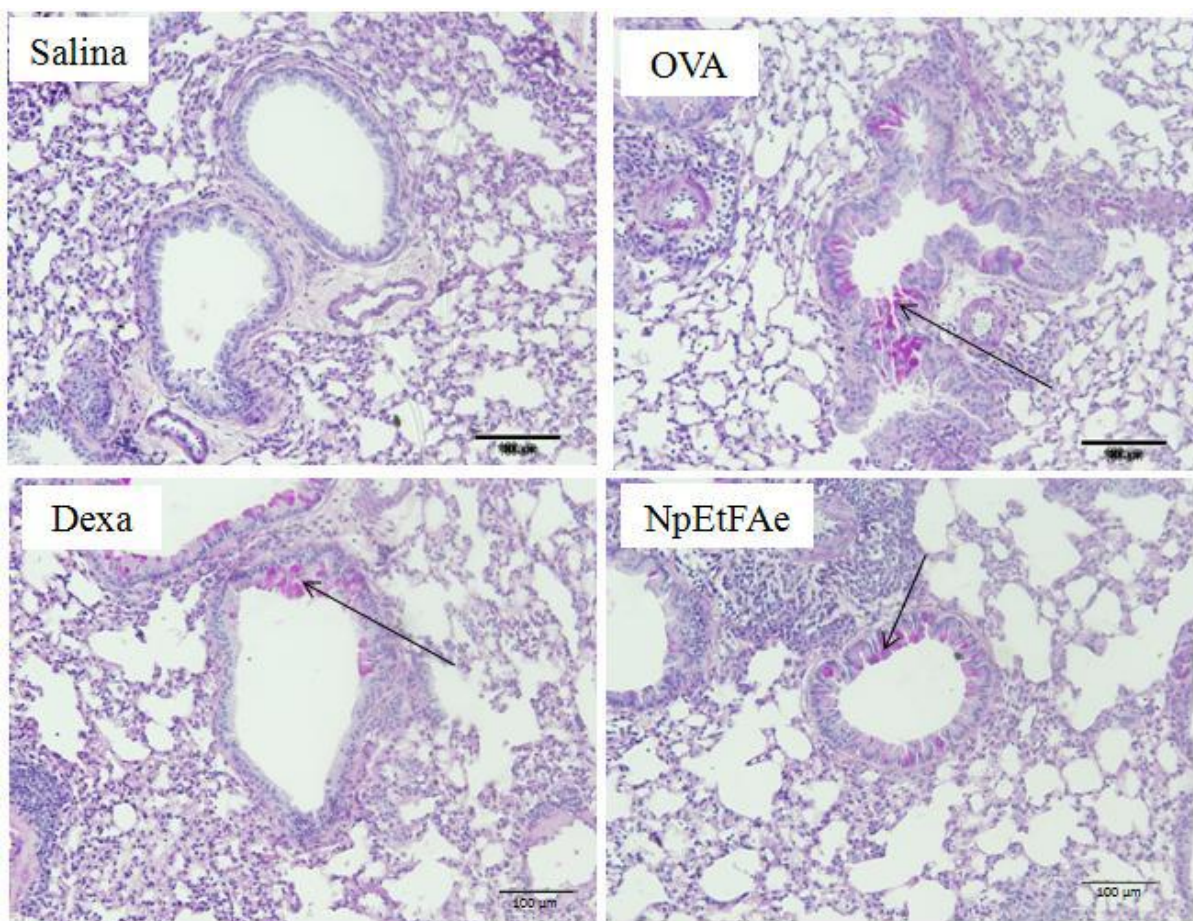


Figura 71: Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com PAS). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEtFAe (10 mg/kg) ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Imagens representativas da figura 72. Barra de escala 100 µM. As setas indicam acúmulo de células inflamatórias. A estrela indica estreitamento das vias aéreas.

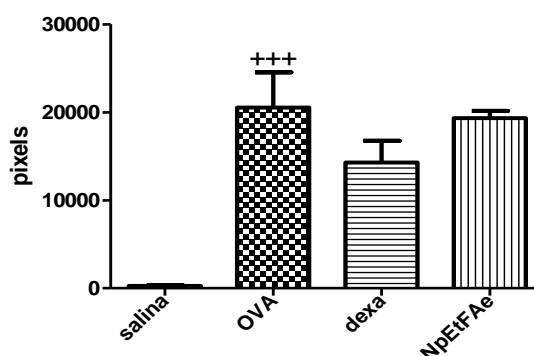


Figura 72: Análise da produção de muco em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica, aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (coloração com PAS). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEtFAe (10 mg/kg) ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de 6 pulmões (6 bronquíolos por pulmão). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++p<0,001 em relação ao grupo salina.

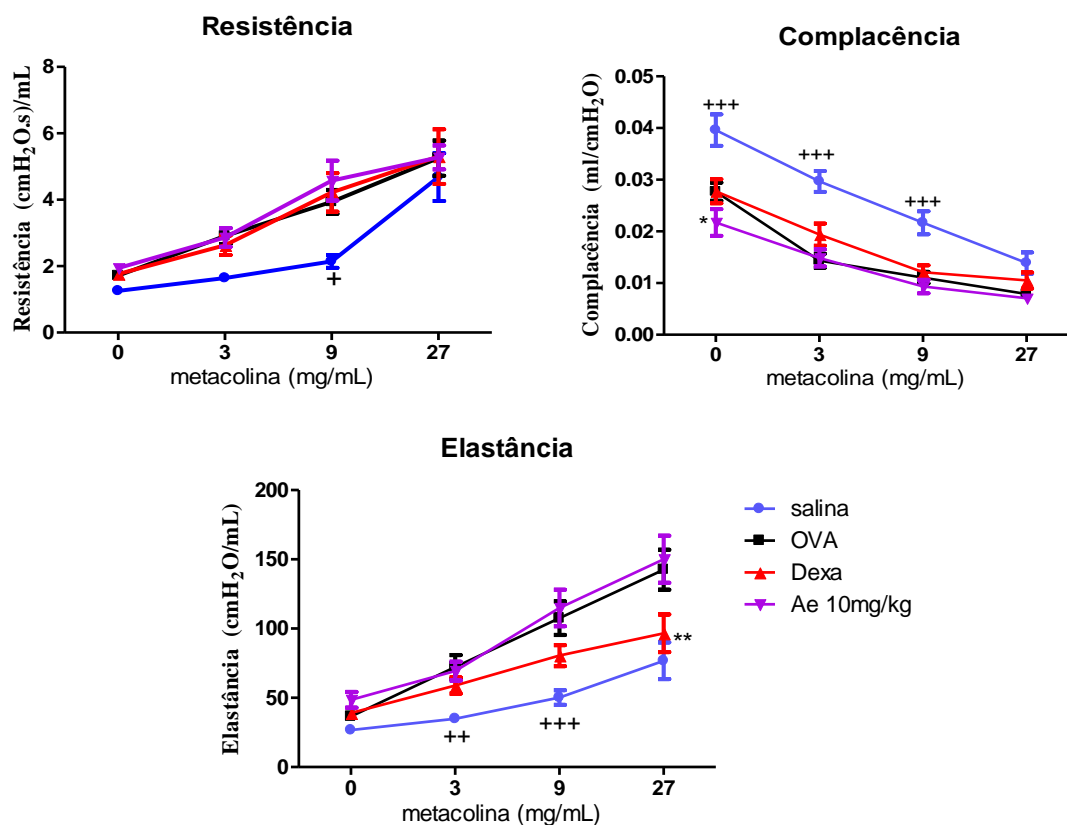


Figura 73: Análise hiperreatividade brônquica em camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar de camundongos através do sistema de BUXCO invasivo e aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após, v.o., com NpEtFAe (10 m/kg) ou dexa (2 mg/kg). A eutanásia ocorreu 6h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de dois experimentos (n ≥ 10 animais). Análise estatística realizada pelo método de Bonferroni. + p<0,05, ++p<0,01, +++ p<0,001 em relação ao grupo salina, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo OVA.

Além de analisar os pulmões, buscamos determinar em qual compartimento NpEtFAe poderia estar atuando de modo a modular resposta celular. Para tal, analisamos o perfil celular da medula e do sangue dos animais tratados com NpEtFAe e estimulados com OVA. Na figura 74 que relata a porcentagem de células presentes na medula observamos que a aerolização acarreta um aumento de 40% de eosinófilos. Todavia, o tratamento tanto com dexametasona quanto com NpEtFAe não impediu o aumento do percentual destas células na medula, com um aumento de 22% e 35% respectivamente.

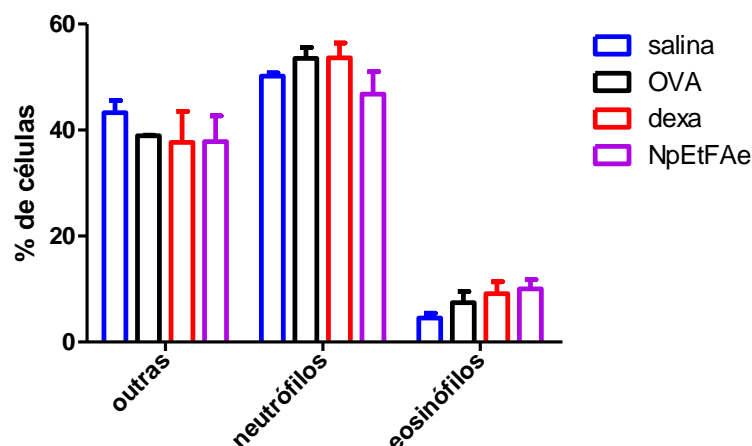


Figura 74: Efeito de NpEtFAe sobre a celularidade na medula de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica de camundongos aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x). Camundongos BALB/c receberam via i. p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos foram desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEtFAe (10 mg/kg) ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 6h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de pelo menos dois experimentos (n > de 10 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls.

No sangue (figura 75), a diminuição de 23% nas células totais, comparando os grupos salina com o OVA não foi diferente estatisticamente, também não foi diferente a administração com NpEtFAe com uma redução de 20% em relação ao grupo OVA, todavia dexametasona inibiu em 86%. Este perfil dos tratamentos foi seguido na análise dos mononucleares, neutrófilos e até os eosinófilos onde NpEtFAe não causou efeito.

A aerolização por seis dias causou uma alta na liberação de IgE no sangue (82%) em relação aos animais que foram aerolizados por apenas três dias. O tratamento com dexametasona inibiu (20%), mas não de forma significativa, apenas NpEtFAe apresentou o fenômeno de forma significativa com redução de 38% (figura 76).

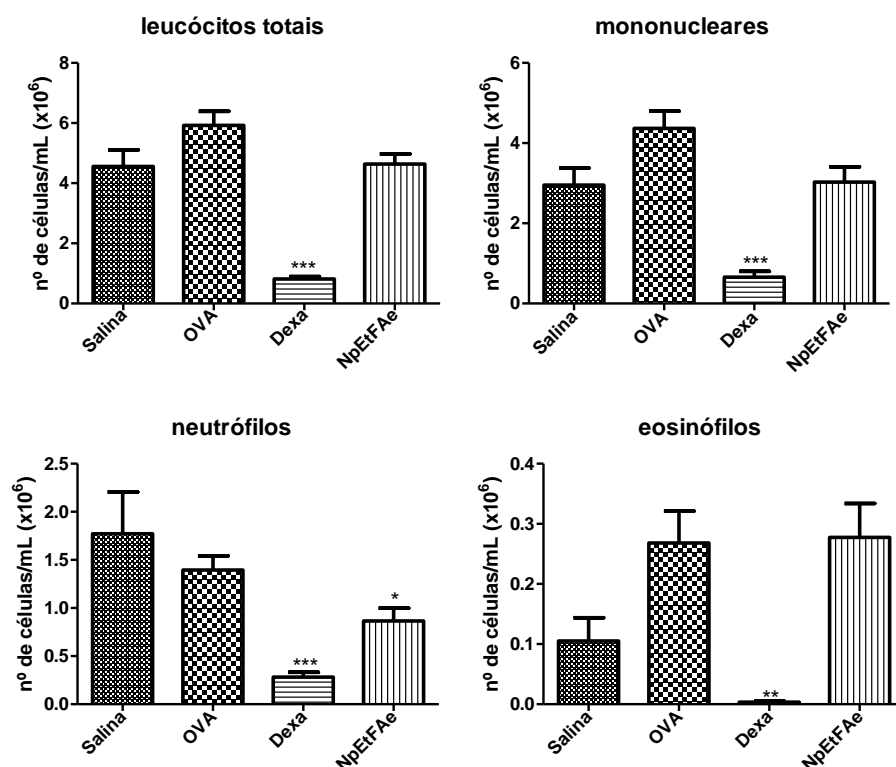


Figura 75: Efeito de NpEtFAe sobre a celularidade no sangue de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica de camundongos aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x). Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos são desafiados por 20 min com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEtFAe (10 mg/kg) ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 6h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de pelo menos dois experimentos (n > de 10 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01 e \*p<0,05 em relação ao grupo OVA.

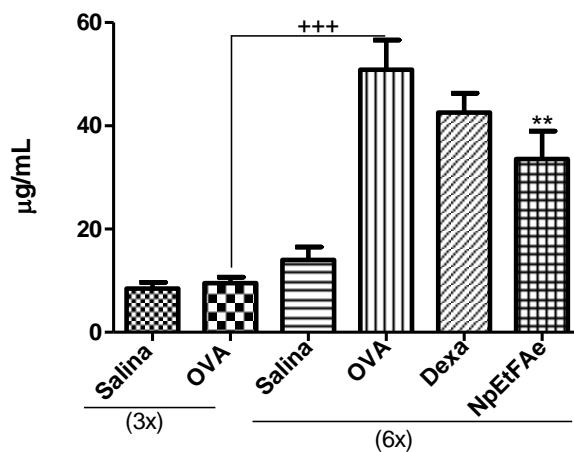


Figura 76: Efeito de NpEtFAe sobre da liberação

de IgE no soro de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica de camundongos aerolizados por 3 dias (3x) ou aerolizados por seis dias e tratados partir do 4º dia de desafio 1h após (6x). Camundongos BALB/c receberam via i. p., nos dias 0 e 10, solução (200 µL) de OVA (10µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (10 mg/mL). Do dia 19 ao dia 24, os camundongos são desafiados por 20 minutos com OVA (2,5%) por aerolização e tratados v.o., com NpEtFAe (10 m/kg) ou dexa (2m/kg) a partir do dia 22. A eutanásia ocorreu 6h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de pelo menos dois experimentos (n > de 10 animais). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +++ p<0,001 em relação ao grupo OVA (3x), \*\*p<0,01 em relação ao grupo OVA (6x).

#### **4.8 - Inflamação alérgica pulmonar crônica: Análise do efeito da fração NpEtFAe**

Como o tratamento dos animais submetidos ao modelo de asma estabelecida com NpEtFAe foi capaz impedir a progressão de alguns aspectos característicos da asma como migração de eosinófilos, liberação de citocinas e do anticorpo IgE, resolvemos investigar a atuação desta fração num modelo de asma crônica. Primeiramente verificamos a presença de células inflamatórias após três dias de instilações, caracterizado como fase aguda. Na figura 77 constatamos um pequeno aumento no número de eosinófilos (de 0 no grupo salina para  $0,05 \times 10^6$  no grupo OVA), porém como houve uma alta variabilidade na contagem, este aumento não foi significativo. Após esta análise os animais foram tratados com dexametasona (2 mg/kg) ou NpEtFAe (10 mg/kg) todos os dias, enquanto que as instilações foram realizadas duas vezes por semana por quatro semanas consecutivas. Quando verificamos a quantidade de células após o término o experimento (figura 78), não observamos diferenças significativas nos valores do gráfico de células totais, mononucleares e neutrófilos, acreditamos que falta de estatística seja devido ao baixo n de animais. Todavia, podemos observar diferença significativa na quantidade de eosinófilos com uma média de  $0,07 \times 10^6$  em relação ao grupo instilado com salina com ausência de eosinófilos no BAL, dexametasona impediu a migração em 77% e NpEtFAe reduziu estas células em 20%.

Como houve um tratamento prolongado dos animais com dexametasona e NpEtFAe, analisamos um dos parâmetros necessários para verificar uma provável toxicidade em decorrência destes tratamentos. E foi constatado na figura 79, que o tratamento prolongado com o veículo não alterou o peso dos animais comparado com o grupo que não recebeu tratamento, nem instilação com OVA (salina), o tratamento com NpEtFAe também não causou alteração de peso em todos os períodos testados, em compensação, dexametasona, a partir da segunda semana de tratamento acarretou perda de peso nos animais, neste período, os animais do grupo salina apresentavam uma média de  $23,8 \pm 1,1$ g enquanto que o grupo dexametasona uma média de  $20 \pm 1,6$ g, chegando a  $19,3 \pm 1,6$  g no final do tratamento.

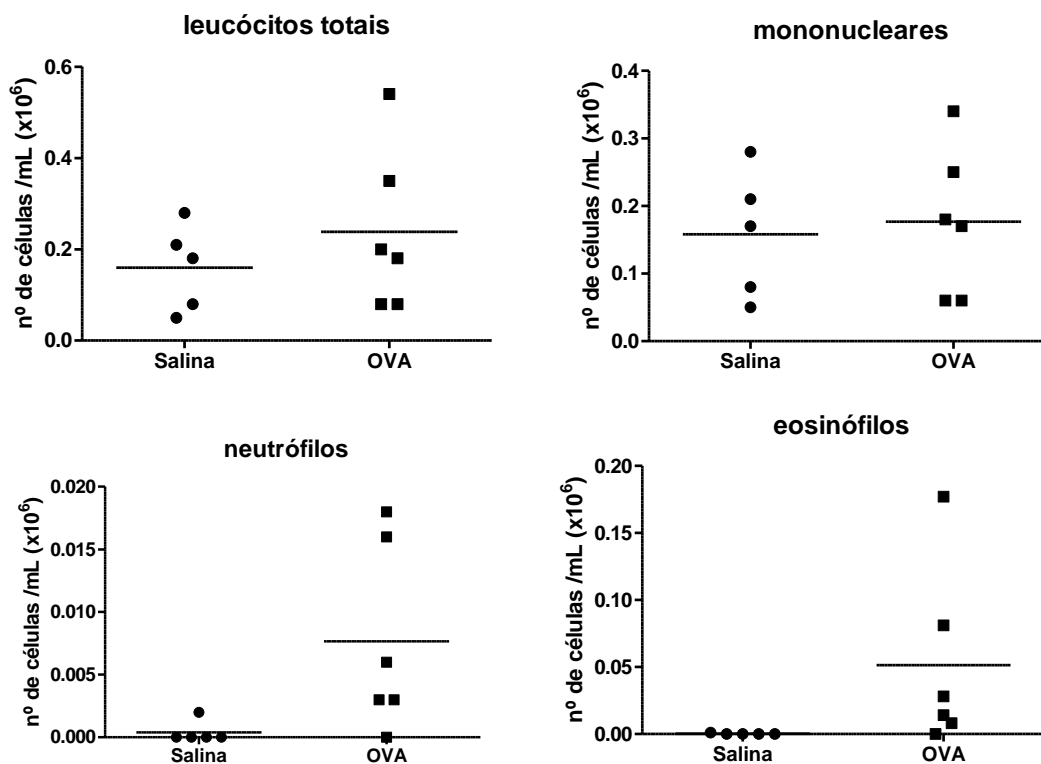


Figura 77: Análise da celularidade no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica, após três dias de instilação. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 12 uma solução (200  $\mu$ L) de OVA (50 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (0,5 mg). Nos dias 24, 26 e 28, os camundongos são desafiados com 20  $\mu$ g de OVA em 20  $\mu$ L. A eutanásia ocorreu 24h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ DP de um experimento. Análise estatística realizada pelo *t-student*.

As imagens histológicas (figura 80) e o gráfico (figura 81) nos mostram o aumento do infiltrado celular que ocorre no parênquima pulmonar quando há repetidas instilações por um longo período. A micrografia representativa do grupo OVA e o gráfico (figura 80 e 81) nos mostra o infiltrado inflamatório pronunciado tanto ao redor dos brônquios, quanto dos vasos sanguíneos. Como visto no BAL, dexametasona foi capaz de atenuar este infiltrado em 20%, além da alteração morfológica das células epiteliais. A migração também foi impedida também pelo tratamento com NpEtFAe (30%), como mostra o gráfico de células totais e mononucleares, porém o tratamento não foi capaz de reduzir o infiltrado de eosinófilos ao redor dos brônquios e aparentemente dos vasos sanguíneos.

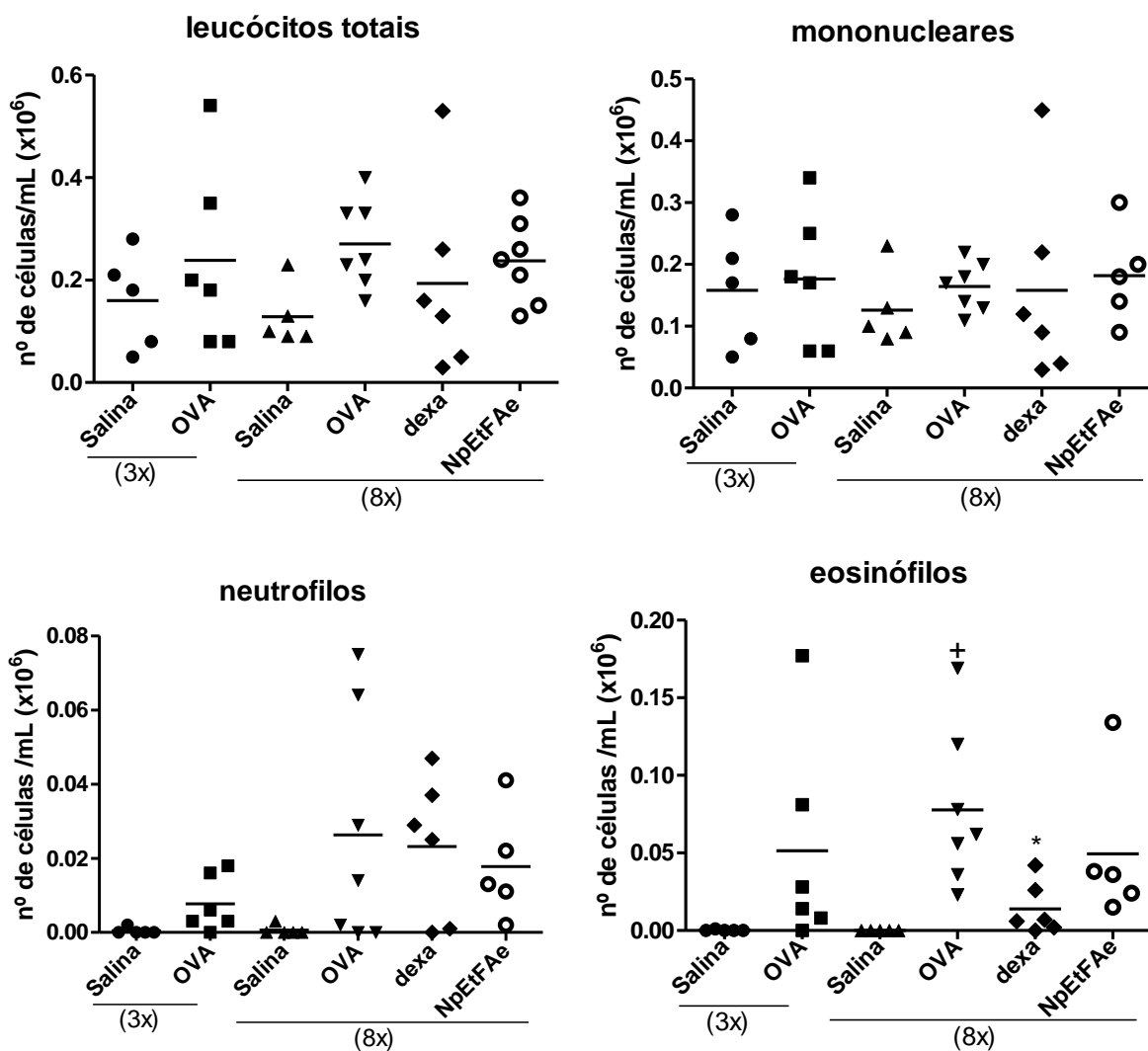


Figura 78: Efeito de NpEtFAe sobre a celularidade no BAL de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica. Camundongos foram instilados por 3 dias (3x) ou instilados duas vezes por semana, por quatro semanas e tratados partir do da quarta instilação, todos os dias (8x). Camundongos BALB/c receberam via i. p., nos dias 0 e 12 uma solução (200  $\mu$ L) de OVA (50 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> 0,5 mg). Nos dias 24, 26 e 28, os camundongos são desafiados com 20  $\mu$ g de OVA em 20  $\mu$ L. Outras instilações foram realizadas duas vezes por semana por quatro semanas consecutivas (8x), além do tratamento com NpEtFAe (10mg/kg) e dexa (2 mg: kg) todos os dias. A eutanásia ocorreu 48h após o último desafio. Resultados representam média de um experimento. Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +p<0,05 em relação ao grupo salina (8x), \*p<0,05 em relação ao grupo OVA (8x),

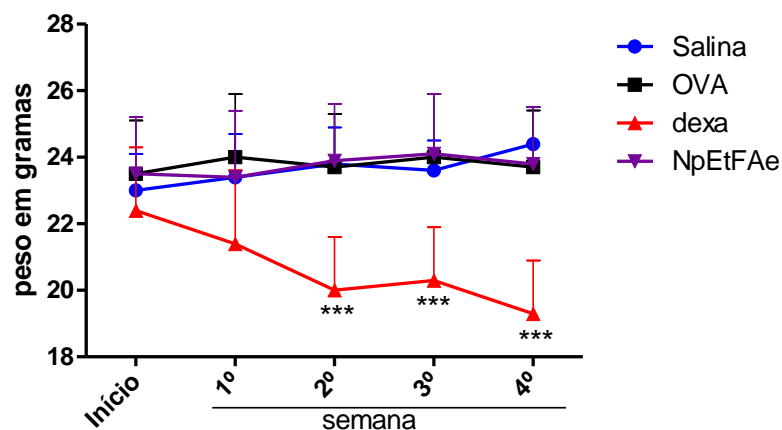


Figura 79: Efeito de NpEtFAe sobre o peso corporal de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica. Camundongos foram instilados por 3 dias e após duas vezes por semana, por quatro semanas e tratados partir do da quarta instilação, todos os dias. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 12 uma solução (200  $\mu$ L) de OVA (50 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (0,5 mg). Nos dias 24, 26 e 28, os camundongos são desafiados com 20  $\mu$ g de OVA em 20  $\mu$ L. Outras instilações foram realizadas duas vezes por semana por quatro semanas consecutivas (8x), além do tratamento com NpEtFAe (10mg/kg) e dexta (2 mg/kg) todos os dias. As pesagens foram realizadas no final de cada semana. Resultados representam média $\pm$ DP de um experimento. Estatística realizada pelo método de Bonferroni. \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo salina.

O gráfico com pulmões colorados com PAS, mostrado na figura 82 e 83 nos revela a alta liberação do muco em comparação com o salina que não nos revelou a alteração destas células. Os pulmões dos animais tratados com dexametasona tiveram este fenômeno reduzido, porém não significativamente devido ao pequeno número de animais. Os pulmões dos animais administrados NpEtFAe possuem tiveram uma discreta redução da produção de muco (24%) em relação ao grupo OVA.



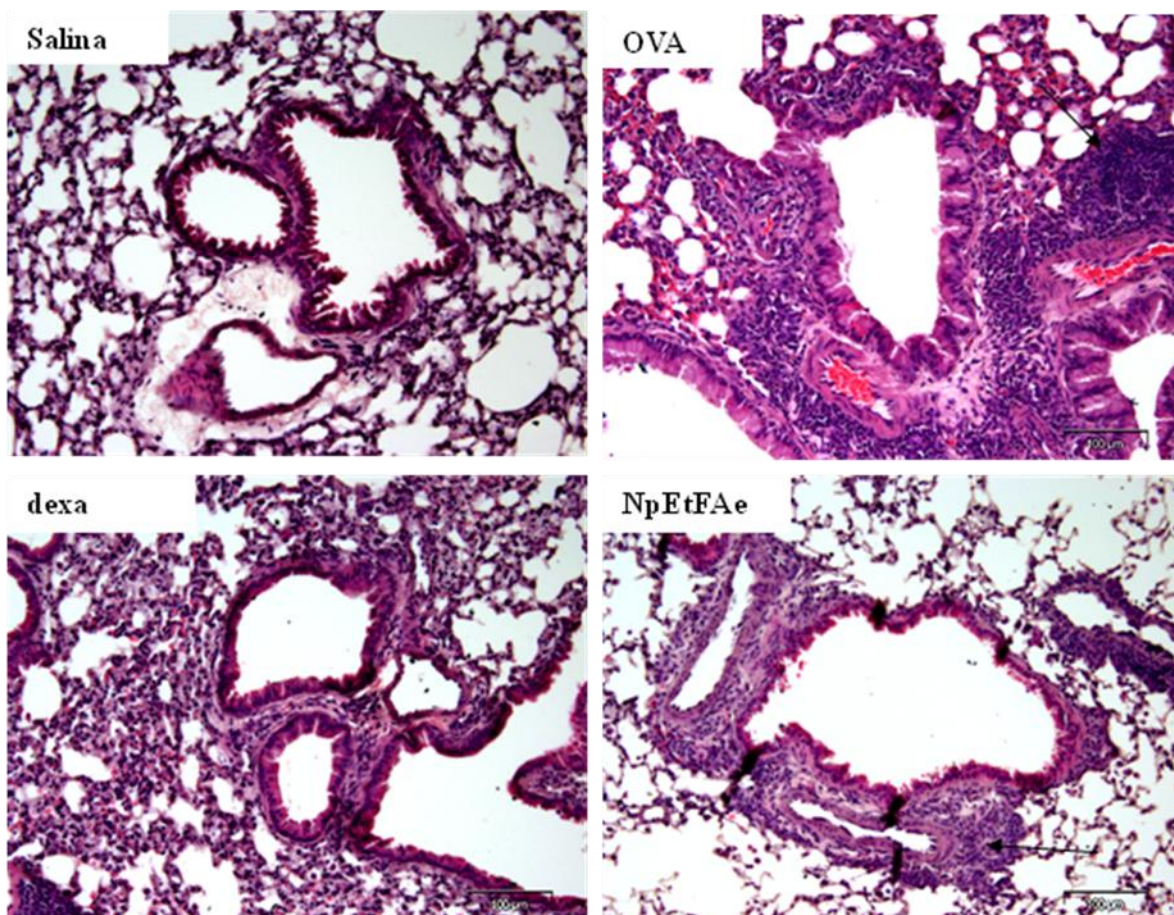


Figura 80: Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica (coloração com H&E). Camundongos foram instilados por 3 dias e após, duas vezes por semana, por quatro semanas e tratados partir do da quarta instilação, todos os dias. Camundongos BALB/c receberam via i.p., nos dias 0 e 12 uma solução (200 µL) de OVA (50µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (0,5 mg). Nos dias 24, 26 e 28, os camundongos são desafiados com 20 µg de OVA em 20 µL. Outras instilações foram realizadas duas vezes por semana por quatro semanas consecutivas, além do tratamento com NpEtFAe (10mg/kg) e dexa (2 mg/kg) todos os dias. A eutanásia ocorreu 48h após o último desafio. Imagens representativas da figura 81. Barra de escala 100 µM. As setas indicam acúmulo de células inflamatórias.

Além do infiltrado inflamatório e da produção de muco, outra característica marcante do remodelamento das vias aéreas é o depósito de colágeno, que pode ser visualizado pela coloração de picrossírius, como mostrado na figura 84. De acordo com os gráficos da figura 85, vimos que os pulmões dos animais do grupo salina, não apresentam uma deposição de colágeno pronunciada ao redor dos brônquios, em contrapartida, o grupo OVA, apresentou um aumento na deposição do colágeno de 27% e que este aumento co-localiza com o infiltrado celular. Um depósito mais denso de colágeno pode ser observado ao redor dos vasos sanguíneos também ao compararmos com o grupo salina. O grupo dexametasona não apresentou diferença de densidade na deposição das fibras de colágeno embora o infiltrado esteja reduzido. Já os animais que foram tratados com NpEtFAe mostraram uma redução na

deposição de colágeno de 51% principalmente na região peribronquiolar, embora estes dados não foram significativos.

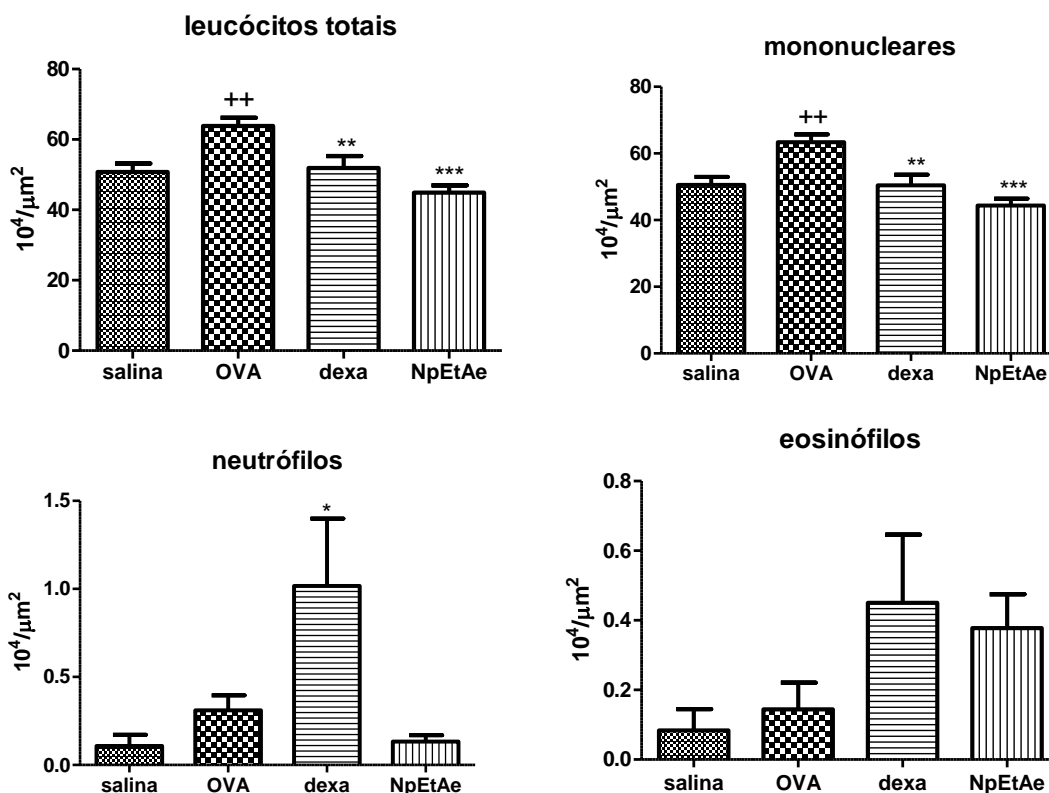


Figura 81: Análise do infiltrado peribronquiolar nos pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica (coloração de H&E). Camundongos foram instilados por 3, dias e após duas vezes por semana, por quatro semanas e tratados partir do da quarta instilação, todos os dias. Camundongos BALB/c receberam via i. p., nos dias 0 e 12 uma solução (200  $\mu\text{L}$ ) de OVA (50 $\mu\text{g}$ ) e  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (0,5 mg). Nos dias 24, 26 e 28, os camundongos são desafiados com 20  $\mu\text{g}$  de OVA em 20  $\mu\text{L}$ . Outras instilações foram realizadas duas vezes por semana por quatro semanas consecutivas (8x), além do tratamento com NpEtFAe (10mg/kg) e dexa (2 mg: kg) todos os dias. A eutanásia ocorreu 48h após o último desafio. Resultados representam média de um experimento. Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. + $p < 0,05$  em relação ao grupo salina (8x), \* $p < 0,05$  em relação ao grupo OVA (8x).

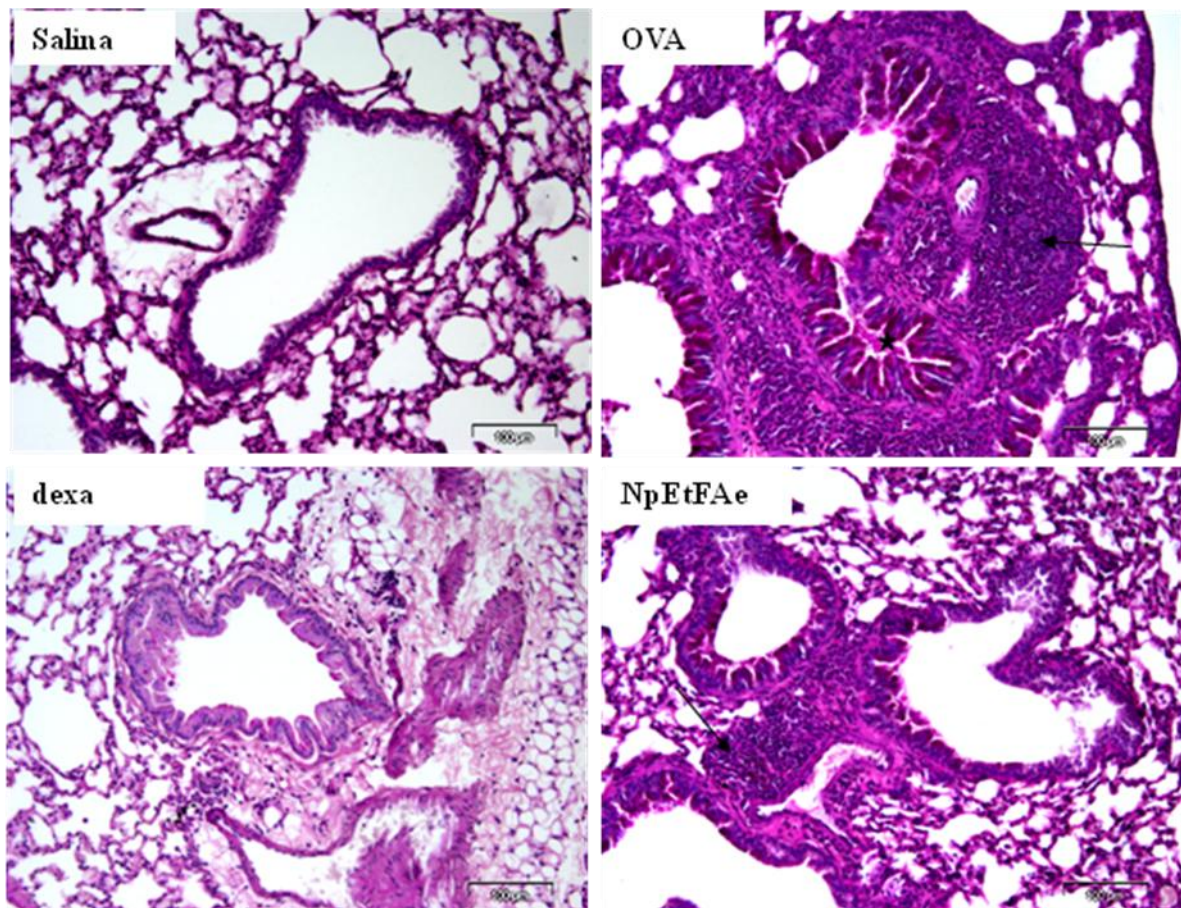


Figura 82: Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica (coloração com PAS). Camundongos instilados por 3 dias e após, duas vezes por semana, por quatro semanas e tratados partir do da quarta instilação, todos os dias. Camundongos BALB/c receberam via i. p., nos dias 0 e 12 uma solução (200  $\mu$ L) de OVA (50 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (0,5 mg). Nos dias 24, 26 e 28, os camundongos são desafiados com 20  $\mu$ g de OVA em 20  $\mu$ L. Outras instilações foram realizadas duas vezes por semana por quatro semanas consecutivas (8x), além do tratamento com NpEtFAe (10mg/kg) e dexa (2 mg/kg) todos os dias. A eutanásia ocorreu 48h após o último desafio. Imagens representativas da figura 82. Barra de escala 100  $\mu$ M. As setas indicam células globets metaplásicas. A estrela indica estreitamento das vias brônquias.

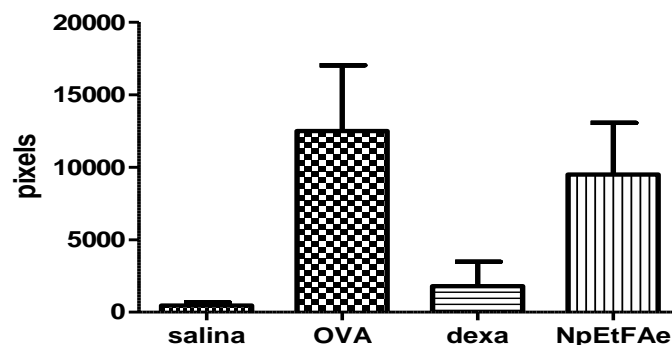


Figura 83: Análise da produção de muco em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica (coloração com PAS). Camundongos foram instilados por 3 dias e após, duas vezes por semana, por quatro semanas e tratados partir do da quarta instilação, todos os dias. Camundongos BALB/c receberam via i. p., nos dias 0 e 12 uma solução (200  $\mu$ L) de OVA (50 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (0,5 mg). Nos dias 24, 26 e 28, os camundongos são desafiados com 20  $\mu$ g de OVA em 20  $\mu$ L. Outras instilações foram realizadas duas vezes por semana por quatro semanas consecutivas (8x), além do tratamento com NpEtFAe (10mg/kg) e dexa (2 mg/kg) todos os dias. A eutanásia ocorreu 48h após o último desafio. Resultados representam média de um experimento. Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. +p<0,05 em relação ao grupo salina (8x), \*p<0,05 em relação ao grupo OVA (8x),

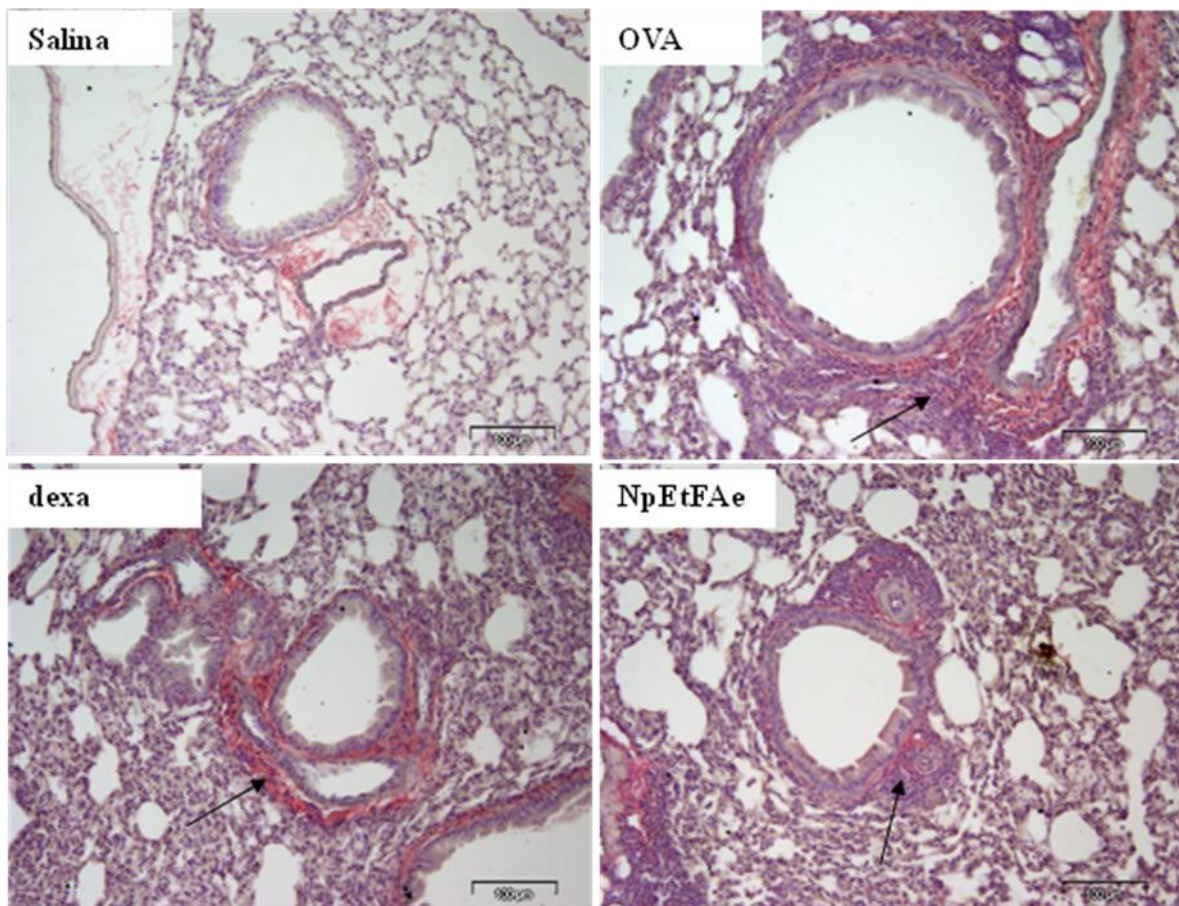


Figura 84: Imagens representativas de pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica (coloração com picrosírius). Camundongos foram instilados por 3 dias e após, por quatro semanas e tratados partir do da quarta instilação, todos os dias. Camundongos BALB/c receberam via i. p., nos dias 0 e 12 uma solução (200 µL) de OVA (50µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (0,5 mg). Nos dias 24, 26 e 28, os camundongos são desafiados com 20 µg de OVA em 20 µL. Outras instilações foram realizadas duas vezes por semana por quatro semanas consecutivas (8x), além do tratamento com NpEtFAe (10mg/kg) e dexa (2 mg/kg) todos os dias. A eutanásia ocorreu 48h após o último desafio. Imagens representativas da figura 85. Barra de escala 100 µM. As setas indicam deposição de fibras de colágeno.

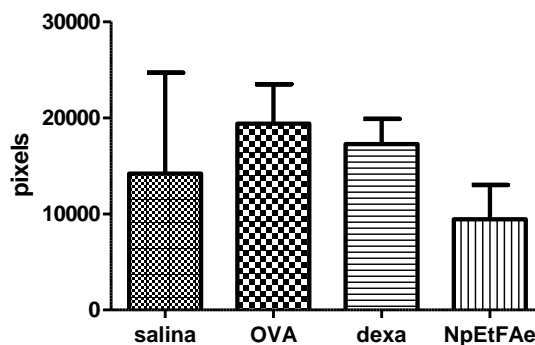


Figura 85: Análise da deposição de colágeno em pulmões de camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar alérgica crônica (coloração com picrosírius). Camundongos foram instilados por 3 dias e após duas vezes por semana, por quatro semanas e tratados partir do da quarta instilação, todos os dias. Camundongos BALB/c receberam via i. p., nos dias 0 e 12 uma solução (200 µL) de OVA (50µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (0,5 mg). Nos dias 24, 26 e 28, os camundongos são desafiados com 20 µg de OVA em 20 µL. Outras instilações foram realizadas duas vezes por semana por quatro semanas consecutivas (8x), além do tratamento com NpEtFAe (10mg/kg) e dexa (2 mg/kg) todos os dias. A eutanásia ocorreu 48h após o último desafio. Resultados representam média±EPM de 3 pulmões (mais de 8 bronquíolos por pulmão). Análise estatística realizada pelo método de Newman-Keuls.

Já que os animais tratados com veículo apresentaram alterações pulmonares condizentes com o que ocorre no remodelamento das vias aéreas, buscamos avaliar se também havia diferença na hiperreatividade. E o que verificamos (figura 86) é que os animais do grupo OVA apresentaram comprometimento da fisiologia pulmonar em relação ao grupo instilado com salina, embora não ocorreu grande diferença estatística, devido ao baixo número de animais. Verificando a resistência vimos que só houve diferença estatística entre o grupo OVA e o salina na concentração de 27mg/mL de metacolina, um aumento de 57%. Os tratamentos não reverteram o aumento da resistência. A alteração na função pulmonar foi mais pronunciada na análise da complacência, no qual os pulmões do grupo OVA estavam menos complacentes em 57%, 88%, 108% e 81% nas concentrações crescentes de metacolina. Novamente, os tratamentos não reverteram este parâmetro. Foi apenas observado uma tendência na melhora da elastância quando os animais foram tratados com NpEtFAe (38% na concentração de 27mg/mL de metacolina), contudo este parâmetro não apresentou nenhuma diferença estatística.

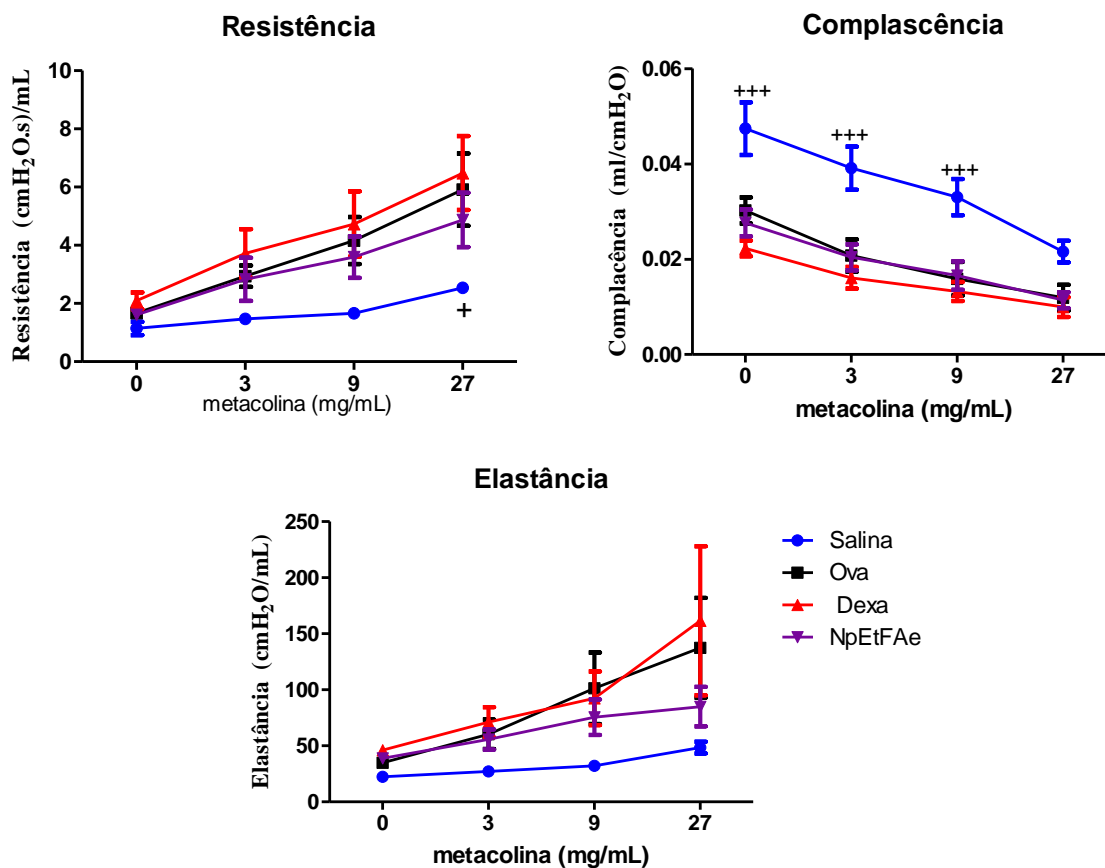


Figura 86: Análise hiperreatividade brônquica em camundongos submetidos ao modelo de inflamação pulmonar crônica, através do sistema de BUXCO invasivo. Camundongos foram instilados por 3 dias e após, duas vezes por semana, por quatro semanas e tratados partir do da quarta instilação, todos os dias (8x). Camundongos BALB/c receberam via i. p., nos dias 0 e 12 uma solução (200  $\mu$ L) de OVA (50 $\mu$ g) e Al(OH)<sub>3</sub> (0,5 mg). Nos dias 24, 26 e 28, os camundongos são desafiados com 20  $\mu$ g de OVA em 20  $\mu$ L. Outras instilações foram realizadas duas vezes por semana por quatro semanas consecutivas (8x), além do tratamento com NpEtFAe (10mg/kg) e dexa (2 mg/kg) todos os dias. A eutanásia ocorreu 48h após o último desafio. Resultados representam média $\pm$ DP de um experimento. Análise estatística realizada pelo método de Bonferroni.

## 5 – Discussão

Os modelos de alergia e de asma murina têm sido ferramentas importantes para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nestas doenças. Isto ocorre devido as similaridades entre os modelos que utilizam animais e a doença em humanos. De um modo geral, o perfil de citocinas  $T_H2$  (IL-4, IL-13 e IL-5), a presença de hiperplasia das células globet, a resposta neutrofílica e eosinofílica, a produção de IgE, a hiperreatividade e alteração da resistência das vias aéreas, resposta envolvendo células de memória, o remodelamento das vias aéreas e a fibrose subepitelial, são características marcantes da asma e que podem ser analisadas utilizando estes modelos animais. Ambas as espécies respondem a alguns medicamentos muitos utilizados no tratamento da asma, como antagonistas de leucotrienos e de receptores dos mesmos, estabilizadores de mastócitos, anticorpo contra IgE, inibidores de PDE4 e corticóides, nos permitindo o uso de alguns destes medicamentos para compararmos a eficácia do nosso extrato e outras substâncias teste como algumas drogas disponíveis no mercado. Nos nossos experimentos utilizamos como fármaco de referência a dexametasona, um glicocorticóide, por este tipo de medicamento ser o mais utilizado para o tratamento da asma.

*N. procerum*, nossa planta de estudo, pertence a família bromeliaceae. Poucos estudos têm sido feito com esta família, principalmente no que diz respeito a ação de extratos e/ou princípios ativos isolados desta espécie sobre a reação inflamatória. Uma das pesquisas que tem sido realizada é o estudo da bromelina, uma enzima extraída da *Ananas Cosmusus* que também pertence a família bromeliaceae. Esta enzima é utilizada, assim como NpEt, em estudos de inflamação e alergia. A descoberta da bromelina e o estudo com NpEt, reforça a importância de mais pesquisas farmacológicas de plantas desta família. NpEt mostrou-se mais eficiente do que esta substância, para exercer o efeito antialérgico a bromelina é administrada na concentração de 200 mg/kg (Secor e cols., 2007), enquanto que NpEt exerceu efeito de inibição da migração de eosinófilos e liberação de proteínas no BAL e hiperreatividade com 1mg/kg. Também, o extrato foi capaz até mesmo de ser mais potente do que o antagonista do receptor de leucotrienos, montelukast que foi utilizado entre as doses de 10mg/kg a 30 mg/kg e a substância isolada ácido tiarélico (TA) extraído da planta *Tiarella polyphylla* (família Saxifragaceae) que foi ativo na dose de 30 mg/kg com um modelo que gera grande quantidade de células no total do BAL (Lee e cols., 2012). Até o ligante de PPAR $\gamma$ , KR62980 só foi capaz de inibir a asma partir de 10 mg/kg, mas por via i.p (Won e cols., 2009). Todos os testes mencionados acima foram realizados em modelos de inflamação alérgica pulmonar semelhante

ao utilizado pelo nosso grupo, no qual o tratamento com substância ou extrato teste é iniciado uma hora antes ou depois do primeiro desafio (aerolização) e continua até o último. Estas comparações nos dão a idéia da potência de NpEt.

Junto com transmigração das células do sangue para o pulmão ocorre o extravasamento de proteínas para o parênquima pulmonar quando animais são desafiados com OVA, ou seja, aumento de fluido dos capilares para os espaços alveolares. Com relação os resultados de dosagem de proteínas foram condizentes com o resultado da migração de eosinófilos, nos mostrando que a dose de 1 mg/kg, além de reduzir, poderia ser capaz de manter proteção da barreira alvéolo-capilar, ou regular a expressão de aquaporinas (Dong e cols., 2012).

A inibição da migração para os pulmões foi corroborada pela análise histológica dos pulmões por H&E no qual vimos que, além da infiltração peribronquiolar, foi possível observar uma mudança nas células epiteliais, além da metaplasia das células globet. Todos estes parâmetros foram bloqueados pelo tratamento com o NpEt. Além disso, NpEt foi capaz de inibir a broncoconstrição, no modelo de inflamação alérgica pulmonar aguda utilizado nos nossos experimentos. Com estes resultados podemos sugerir que NpEt estaria inibindo a liberação das citocinas IL-5, IL-13, eotaxina, além de mediadores lipídicos como CisLt, PGD<sub>2</sub> (aumentados em pacientes em pacientes alérgicos [Robinson e cols., 1992, Kuperman e cols., 2008]). Assim como o extrato aquoso de *N. procerum* inibiu a liberação de eotaxina e IL-13 em animais desafiados com OVA (Vieira-de-Abreu e cols., 2005). Já que estes são responsáveis pela migração de eosinófilos, hiperreatividade metaplasia das células globet. Vale destacar que NpEt foi capaz de inibir a hiperreatividade, até mesmo melhor do que dexametasona.

A revisão bibliográfica realizada por Rosenberg e cols., (2013) cita vários estudos que sugerem como alvo para o tratamento da asma os eosinófilos (migração e eosinofiloiose) poderiam promover benefícios terapêuticos para esta doença, por isso a importância de verificar se NpEt seria capaz de inibir a produção de eosinófilos e a sua circulação. Desta forma, analisamos a contagem de células totais e análise diferencial do sangue e da medula, além do BAL. No sangue, observamos uma redução no número de células totais em relação ao grupo salina, provavelmente devido a um aumento dessas células no pulmão, porém o tratamento com NpEt não causou mudança significativa. Nestas condições, o tratamento com dexametasona causou aumento na quantidade de neutrófilos circulantes no sangue, e como consequência ao redor dos bronquíolos, embora seja controverso, este fenômeno é bem descrito na literatura (Liles e cols., 1995, Nittoh e cols., 1998 e Zhang e cols., 2001). Porém



não houve diferença significativa nem mesmo entre os controles, tanto na contagem da medula quanto no sangue. Essa falta de diferença pode ter sido devido aos experimentos terem sido realizados com a linhagem de camundongos C57BL/6. Esta linhagem não é tão responsiva aos modelos envolvendo resposta T<sub>h</sub>2. Ainda assim, esta linhagem foi utilizada em um estudo, no qual demonstrou-se que esta linhagem responde ao estímulo antigênico, com infiltração inflamatória e produção de muco, o grupo empregou o sistema de Buxco invasivo para demonstrar hiperreatividade brônquica nesta linhagem (Pinelli e cols., 2009). Os camundongos C57BL/6 também são utilizados em experimentos de elucidação de mecanismos moleculares de doenças alérgicas, com animais *knockout* que utilizam esta linhagem como background genético (Angkasekwinai e cols., 2010).

Embora poderíamos dizer que NpEt possui um potencial antialérgico, essa sugestão merece cautela, pois diversos cientistas salientam as dificuldades de diversos compostos se mostrarem eficazes tanto em camundongos quanto em humanos. Estes aspectos são primeiramente devido a diferenças entre os modelos murinos de asma e a doença em humanos, dentre elas podemos citar que as vias aéreas murinas são mais estreitas em termos absolutos, porém mais largas em relação ao tamanho corporal humano, os humanos possuem mais musculatura lisa, mais glândulas submucosas do que os camundongos. Camundongos possuem a parede do peito mais complacente com menor capacidade residual do que os humanos. Eosinófilos murinos desgranulam menos se comparado com os humanos além da distribuição destas células serem diferentes entre as espécies, a inflamação perivascular é muito mais proeminente em camundongos. Outro aspecto que acarreta grande falha de agentes identificados com potencial terapêutico em modelos murinos para o tratamento em humanos, é que o tratamento nos modelos murinos é realizado principalmente de forma profilática. Os candidatos são testados com a habilidade de inibir o desenvolvimento da doença como foi realizado com os C57BL/6 e não como terapêutico (que suprime a doença estabelecida). Estes aspectos explicam o fato de que substâncias como antagonistas de PAF, IL-12, IL-4 e IL-5, foram efetivos em modelos murinos, porém não em humanos. Outro exemplo que podemos citar, refere-se ao antagonista de IgE que falhou no tratamento da asma em camundongos, porém mostrou se efetivo em humanos. Uma das explicações para estes problemas, é que em estudos com humanos, novas drogas são testadas como agentes terapêuticos e não profiláticos (Revisado por Finkelman e cols., 2008).

Por isso decidimos testar NpEt no modelo de asma estabelecida previamente mostrado em Vieira-de-Abreu e cols., 2005. Neste artigo o extrato aquoso de *N. procerum* foi testado a partir do quarto dia de aerolização. Inicialmente, realizamos uma caracterização do modelo em

nossas condições experimentais, após os três primeiros dias de aerolização. Além disso, utilizamos os camundongos da linhagem BALB/c que é umas das linhagens mais utilizadas, por sua variabilidade genética permitir um melhor desenvolvimento de reações alérgicas se comparado com outras linhagens como C57BL/6 e o Swiss. Este aspecto condiz com o que ocorre com os humanos, pois algumas variabilidades no genoma humano também influenciam na suscetibilidade ao desenvolvimento de asma (revisado por Finkelman e cols., 2008).

Além do pulmão, analisamos a medula o e sangue dos animais, pois no modelo utilizado com os camundongos C57BL/6 não houve diferença significativa tanto no número de células totais, quando no número de eosinófilos entre os animais aerolizados com salina e os aerolizados com OVA, mesmo com um aumento significativo das células principalmente eosinófilos, no BAL. Estes resultados ocorreram provavelmente devido ao tipo de resposta desenvolvida por esta linhagem como dita anteriormente. Como o modelo de asma estabelecida foi realizada com BALB/c e esta linhagem apresenta melhor resposta do tipo T<sub>h</sub>2, gostaríamos de verificar se haveria uma maior produção destas células na medula com conseqüente migração para o pulmão. As análises nos mostram que os três dias de aerolização, já foram suficientes para causar um aumento na produção e circulação de eosinófilos e que este aumento causou um acúmulo no BAL.

Nos pulmões, além de um aumento no número de células, houve o aumento no extravasamento de proteína, e uma marcante liberação de EPO. Todos estes resultados estão correlacionados não só com o aumento de eosinófilos mas também com o aumento de IL-5 e de eotaxina, importantes agentes quimioatratadores dos eosinófilos. A análise histológica obtida também indicou a presença de um quadro inflamatório alérgico que pôde ser caracterizado por um importante infiltrado peribronquiolar. Também observamos um aumento nas citocinas responsáveis pela resposta alérgica. Embora IL-4, esteja presente nos pulmões, os três dias de aerolização não foram suficientes para um aumento estatístico na produção de IgE, já que a produção deste anticorpo é modulada principalmente por esta citocina. O que podemos reparar é que os animais sensibilizados, porém aerolizados com salina já possuem uma quantidade alta de IgE, isso devido a sensibilização. Podemos observar também alteração das células globet e presença de hiperreatividade, estes fenômenos estão correlacionados com uma alteração no perfil de citocinas, em especial a IL-13 que apresenta-se aumentada. Além das citocinas, os mediadores lipídicos como PGD<sub>2</sub> e CisLt também foram dosados e se encontram aumentados. Estes mediadores modulam a fisiologia muscular das vias aéreas, causando broncoconstrição, vasodilatação, aumentando a permeabilidade capilar e a produção de muco, facilitando a migração transendotelial das células inflamatórias (Arima e Fukuda e cols., 2011). A partir do

conjunto de dados obtidos concluímos que os animais já possuem um quadro alérgico expressivo após três dias de aerolização. Isto está mais condizente com a clínica, pois antes da medicação os indivíduos são diagnosticados ou não com asma de acordo com a função pulmonar (jornal brasileiro de pneumologia, S5).

Caracterizada a presença de um quadro de inflamação alérgica em nosso modelo, iniciamos a avaliação do NpEt. Para tal, passamos a tratar os animais a partir do quarto dia de aerolização. Cabe destacar, que a aerolização foi mantida ao longo do estudo, uma vez que sua suspensão levaria os animais a entrarem na fase de resolução (Kearley e cols., 2009) constituindo-se um outro modelo diferente do qual objetivamos estudar. Além disso, não observaríamos a real potência do extrato, quando o tratamento foi realizado após o quadro já instalado. Observamos que NpEt não se apresentou tão eficiente como dantes, ou seja, nos modelos mais descritos na literatura, nos quais o tratamento é administrado antes do desafio antigênico, não permitindo o estabelecimento das características da doença. A dexametasona funcionou neste modelo o que comprova sua potência como uma boa droga padrão. Nossos experimentos até agora mostram por que os modelos experimentais de tratamento profilático são tão criticados e que vários possíveis agentes terapêuticos foram bons em murinos e não funcionaram em humanos (Persson e cols., 2002, Corry e cols., 2006 e Taube e cols., 2004).

Como o tratamento com 1 mg/kg de NpEt neste modelo não fez efeito tentamos o mesmo tratamento desta vez, duas vezes ao dia como vários medicamentos são administrados. Mesmo com esta estratégia de tratamento, a dose de 1mg/kg não surtiu efeito sobre o BAL. Ao aumentarmos a dose para 10mg/kg observamos que administração uma vez ao dia tendeu a diminuir a quantidade de eosinófilos enquanto que o tratamento duas vezes ao dia não apresentou efeito sobre a inflamação. Este fato pode estar correlacionado com a presença de várias substâncias no extrato e algumas delas terem efeito neutralizante ou inibitório intrínseco que se expressa quando o extrato é administrado de forma repetida no mesmo dia. Já que a dose de 10 mg/kg administrada uma vez ao dia teve tendência a diminuir a inflamação, resolvemos aumentar a dose para verificarmos se há efeito. Tanto a dose de 100 mg/kg quanto a de 500 mg/kg são doses também testadas na literatura (Mabalirajan e cols., 2010, Jung e cols., 2012). Ambas as doses foram capazes de inibir os eosinófilos de alguma forma ou na migração como a dose de 100 mg/kg como na liberação de EPO 500 mg/kg. Cabe apontar que a dificuldade em se caracterizar uma diferença mais marcante nas análises se deveu a uma discreta contaminação com sangue no BAL de alguns animais utilizados. Na histologia, estas doses inibiram a migração peribronquiolar, sendo que dose de 100 mg/kg foi a que apresentou melhor perfil inibitório, porém ambas não foram capazes de impedir a metaplasia das células

globet. Resolvemos também testar a aerolização com NpEt por que tanto os corticóides quanto os agonistas  $\beta_2$  são administrados nas vias aéreas, por aerossol apresentando um efeito local. Porém mostramos que NpEt não possui efeito local sobre a migração celular, porém poderíamos ter analisado a hiperreatividade, para verificar se NpEt possuiria um efeito como os agonistas  $\beta_2$ , que possuem atividade no alívio da broncoconstricção. Poucos compostos são testados pré clinicamente desta forma na literatura e não apresentaram efeito positivo terapêutico, como por exemplo, Duan e cols., 2008 aerolizaram com oligonucleotídeos antisense p-38 $\alpha$ , que foi eficiente em inibir as características da asma, porém não foi de forma curativa. Uma alternativa seria tentar aerolizar o extrato com partículas extrafinas, como Ivancsó e cols., 2013, que aerolizou corticóides desta maneira obtendo uma melhora adicional na função pulmonar de pacientes com diferentes fenótipos de asma, se comparado com a formulação comum de corticóides inalatórios. Nossos resultados mostraram que ao ser administrado de forma profilática, NpEt foi capaz de inibir o desenvolvimento da doença na dose de 1 mg/kg em 58%, enquanto que, quando testamos no modelo mais aproximado ao tipo de tratamento que ocorre em humanos, o mesmo extrato não foi capaz de inibir a progressão da doença na mesma dose, para isso tivemos que aumentar a dose em cem vezes, pelo menos, e ainda assim com uma eficácia menor, em relação ao modelo clássico.

Pelas observações que NpEt nas doses de 10, 100 e 500 mg/kg apresentaram alguma inibição mesmo de forma discreta, nos propusemos a fracionar o extrato para observarmos se há algum aumento no efeito inibitório. O mesmo foi subfracionado com solventes de polaridade crescente sendo eles o hexano, diclorometano, acetato de etila e butanólico. Os solventes hexano podem extrair lipídios, ceras, pigmentos furocumarinas, diclorometano, bases livres de alcalóides, óleos voláteis, glicosídeos cardiotônicos entre outros, acetato de etila e butanol, retiram flavonóides, cumarinas além de sesquiterpenos o resíduo aquoso pode ter saponinas e taninos (Simões e cols., 2003), por estas características podemos sugerir a presença destas substâncias nas subfrações.

Analisamos também o LPS contido nos extratos e subfrações para nos certificarmos que as possíveis alterações e modulações nas funções celulares não seriam causados pelo LPS. A análise do LAL nos mostrou que a maioria das subfrações possuem por volta de no máximo 0,02 ng/mL de endotoxina, enquanto que NpEt possuem o maior valor: 0,08 ng/mL. Nos experimentos *in vitro*, este valor é diluído ainda mais: de 200 a 400 vezes dependendo da cultura. Na literatura é necessária uma quantidade de no mínimo 5  $\mu$ g/mL de LPS para ativar esplenócitos (Basta Kain e cols., 2006) e 10 ng/mL para os mastócitos (Kirshenbaum e cols., 2008). Foi visto que estimulação com baixas doses de LPS (< 10 ng/ml) resultou na

polarização em Th2 (Xu e cols., 2008). Com isso, podemos sugerir que o LPS não exerceu influência nas culturas realizadas. Para os experimentos *in vitro* analisamos mais de um tipo celular, já que a asma envolve muitos tipos celulares sendo aqueles mais representativos os linfócitos, mastócitos e eosinófilos, dentre outros (Schleimer e col., 2007 e Holgate, 2008).

Para investigarmos possíveis efeitos do NpEt e suas subfrações, realizamos cultura com linhagens celulares, células primárias e células derivadas de medula óssea. Inicialmente utilizamos esplenócitos obtidos de camundongos D011.10. Estes animais são muito úteis por possuírem o TCR dos seus linfócitos modificados para responderem a OVA, rendendo uma ativação robusta. O protocolo de cultura e de análise de proliferação e apoptose foi de acordo com Olsen e cols., (2011). Nestes experimentos procuramos primeiramente analisar a toxicidade dos extratos/subfrações para excluir a toxicidade da modulação. O método utilizado foi o de MTT que se baseia na redução do sal de tetrazólio por desidrogenase e agentes redutores presentes nas células vivas, levando a formação de cristais de formazan. Este ensaio é muito utilizado para citotoxicidade, viabilidade celular e proliferação. MTT é reduzido pela atividade de uma desidrogenase mitocondrial, identificada como succinato desidrogenase nas células vivas. Porém estudos tem identificado que a mitocôndria não possui atividade redutora, mas sim oxidativa. O dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) que uma coenzima gerada na mitocôndria seria a principal enzima que atua sobre o MTT. Além do NADH, outros agentes redutores intracelulares podem também reduzir o MTT como ácido ascórbico, cisteína, glutathione etc. (Stockert e cols., 2012). Outro ponto em questão é que alguns inibidores da proliferação celular falham em indicar uma redução do sal de tetrazólio e até mesmo estimulam a redução de MTT (Berridge e cols., 1996). Este fato poderia explicar por que NpEt, NpEtFH e NpEtFD, nas doses mais baixas aumentaram a atividade de redução do MTT nas células. Este aumento poderia estar ocorrendo devido à presença de algum componente nos extratos e estas subfrações que podem estar acarretando a redução do MTT sem necessariamente aumentar o número de células. Outro ponto importante é que o extrato e subfrações possuem cor e como o ensaio de MTT é um ensaio colorimétrico, a cor do extrato/subfrações poderiam alterar a leitura da cultura, acarretando em um resultado falso positivo. Este problema foi contornado descontando a cor do extrato/subfrações. Quando OVA é adicionada á cultura um aumento da D.O. indicando de forma indireta um aumento no número de células. De um modo geral, pudemos observar um perfil inibitório com algumas das subfrações testadas. Mas uma vez cabe indicar que essa inibição pode ser no número de célula ou a redução da atividade redutora.

Como o MTT não traz uma real elucidação do efeito modulador negativo dos extratos/subfrações utilizamos o ensaio de apoptose através da incubação de Anexina (que se liga ao fosfolípido fosfatidilserina que é deslocado do interior da membrana plasmática para fora dela quando as células estão em apoptose) e PI (que penetra na membrana plasmática das células não viáveis) e análise através da citometria de fluxo. Na citometria de fluxo os linfócitos possuem tamanho pequeno e pouca granulosidade. Na proliferação houve um aumento de tamanho e granulosidade devido ao aumento do conteúdo de DNA e proteínas, porém também houve um aumento na apoptose, este aumento na proliferação seguido da apoptose ocorre devido a ativação de proteínas como Myc e RAS que muito ativadas também induzem a apoptose (Fikaris e cols., 2006 e Alberts e col., 2002). Antes da análise da apoptose as células foram contadas e observamos um aumento no número de células quando estas são estimuladas com OVA e que NpEt, dexametasona e as subfrações, com exceção de NpEtFB e NpEtFAq, diminuíram a quantidade células na cultura correlacionando com a D. O. vista no MTT. Daí surgiu a pergunta se a redução foi por apoptose ou por modulação em alguma proteína regulatória do ciclo celular. Quando focamos no estudo da apoptose e analisamos somente a porcentagem de células vivas, apoptóticas ou mortas nos citogramas, observamos que a NpEtFD foi a mais tóxica dentre todas as estudadas, pois dobrou a porcentagem de células mortas em relação ao controle estimulado. Com relação ao ciclo celular o resultado é melhor explicado quando relacionamos o número absoluto de células com a porcentagem no citograma, e vimos que além da dexametasona, NpEtFH, NpEtFD e NpEtFAe reduziram o número relativo de células em todas as fases do ciclo celular. Olsen cols., (2012), mostram que a fosfocolina induziu a apoptose dos linfócitos. Na janela feita nos nossos experimentos não observamos células em Sub G0. NpEtFAe impediu a progressão do ciclo celular a partir da fase S e seguida da G2/M, sem toxicidade, por isso, seria interessante analisar a expressão das ciclinas/CDKs que são proteínas importantes na progressão do ciclo celular, como houve uma diminuição na progressão tanto na fase S quanto na G2/M poderíamos analisar ciclinas D e CDK4/6, que permite a progressão da fase G1 para S e ciclina E-CDK2 que permite a passagem da fase S para G2/M. Além das ciclinas e CDKs, outras proteínas como Rb e p53 poderiam ser analisadas (Hindley e cols., 2013).

Como os linfócitos T são a principal fonte de citocinas, verificamos a liberação das mesmas na cultura. A IL-4 está presente em pouca quantidade por que ela é mais importante nos eventos iniciais da sensibilização ao alérgeno, sendo necessária para a polarização de T<sub>h</sub>2 e regula os níveis de IgE total. A subfração NpEtFD inibiu todas as citocinas devido a sua toxicidade. NpEtFH de forma surpreendente, aumentou a liberação de IL-5, citocina esta

responsável pela eosinofilia, este fator foi considerado para a exclusão desta subfração para os experimentos *in vivo*. NpEtFAe foi capaz de diminuir IL-13, achado importante já que esta citocina participa em vários aspectos característicos da asma. NpEt somente inibiu de forma significativa a liberação de IFN- $\gamma$ , complementando o efeito antiinflamatório observados por Amendoeira e cols., (2005). O estímulo inflamatório causa aumento da liberação de IL-10, nenhuma das subfrações testadas foi capaz de aumentar a IL-10, sugerindo que nenhuma delas seria capaz induzir a proliferação/ativação das células T<sub>reg</sub>. Para confirmar este dado deveríamos marcar a cultura com os anticorpos CD4, CD25 e FoxP3, para verificarmos se há um aumento no número destas células. O estímulo com OVA também causou um aumento de IFN- $\gamma$  bastante pronunciado. Como a cultura de esplenócitos não é pura, outras células poderiam ter influência na liberação desta citocina como macrófagos, por exemplo, este fato poderia ser resolvido gerando linfócitos T<sub>h1</sub>, T<sub>h2</sub>, T<sub>reg</sub> ou até mesmo T<sub>h17</sub> específicos para OVA, através do cultivo de células CD4<sup>+</sup> com coquetel específico de citocinas (Won e cols., 2009 e Shigeru e col., 2010). Outra alternativa seria obter os linfócitos T do baço por isolamento com *beads* ou *sorting* através do FACs.

Apesar do pensamento que a diminuição de IFN- $\gamma$ , por alguma subfração, não seria interessante, devido à hipótese do desbalanço entre respostas T<sub>h1</sub> e T<sub>h2</sub>, a inibição de IFN- $\gamma$  é importante, pois esta citocina é capaz de estimular os eosinófilos, fazendo com que os mesmos se tornem mais ativados (Jung e cols., 2008, Kanda e cols., 2009). Na análise desta citocina menos NpEtFB e NpEtFAq foram capazes inibi-la. Estes dados indicam que principalmente NpEtFAe modula a inibição da proliferação como um todo, impedindo principalmente o ciclo celular.

Outra célula com grande participação não só na asma como em outras respostas alérgicas são os mastócitos, pois estas células liberam mediadores que atuam na chamada reação de fase imediata da alergia. HMC-1 é uma linhagem humana estabelecida de uma paciente com leucemia mastocítica. Estas células exibem muitas características de mastócitos de tecidos, como expressão de histamina, triptase, heparina e outros antígenos de superfície, sendo útil para análises que envolvem mastócitos, já que obter mastócitos de tecidos ou de lavado peritoneal em grande quantidade é muito complicado. Uma desvantagem destas células é que elas não possuem o receptor de IgE (Butterfield e cols., 1988, Nilsson e cols., 1994), por isso utilizamos o PMA e o ionóforo de Ca<sup>++</sup> para mimetizar os eventos moleculares que ocorrem durante a ativação. Novamente utilizamos o MTT, para averiguar uma possível toxicidade com 8 horas de cultivo, por que é um período muito utilizado para dosagem de citocinas e *western blotting* para algumas proteínas. Na análise de MTT, aparentemente

nenhum dos tratamentos apresentou efeito tóxico, somente NpEtFD que inibiu em 20% a redução dos cristais de formazan, essa inibição provavelmente causou diminuição na liberação das citocinas testadas. Estas células liberaram grande quantidade de IL-6 seguida de IL-8, IL-13 que foi liberada em pequenas quantidades. Na alergia, IL-6 apresenta grande importância pois esta pode modular diferentes aspectos das células T CD4<sup>+</sup> mediando por exemplo, liberação de citocinas como IL-4 e IL-13. Nenhuma das subfrações testadas inibiu a liberação desta citocina. IL-8 tem participação na migração dos neutrófilos na inflamação. Na asma, esta migração causa piora na inflamação e possível aumento da severidade da doença. Com exceção de NpEtFAq e NpEtFB, todas as subfrações e o extrato impediram a liberação desta citocina. IL-13 só foi liberada em poucas quantidades em nossos experimentos e novamente, somente NpEtFD diminuiu esta citocina. Muitos artigos pré tratam as células por pelo menos 30 minutos com a substância de interesse antes do estímulo para análise de liberação de citocinas (Kim e cols., 2010, Seo e cols., 2011), em nossos experimentos não houve este pré-tratamento, por isso que pode não ter havido inibição das citocinas testadas. No nosso modelo 8h após o estímulo não foi possível detectar TNF- $\alpha$ , entretanto, Kim e cols., (2010) utilizaram o mesmo período de tempo e puderam detectar esta citocina, com uma quantidade células menor do que utilizada em nossos estudos ( $3 \times 10^5$ /poço). Em nossa cultura poderíamos dosar o TNF- $\alpha$  em tempos menores como Van den Elsen e cols., 2013 que dosaram esta citocina quatro horas após o desafio antigênico. Este teste com outros tempos de cultura poderia ser utilizado para detecção da IL-13, que ao invés de ter sido dosada com oito horas poderia ser dosada com vinte e quatro horas (Van den Elsen e cols., 2013).

Além das citocinas, os mastócitos liberam mediadores que são sintetizados pela enzima COX<sub>2</sub> como PGD<sub>2</sub>, CisLT (Williams e cols., 2000). Por isso, avaliamos se após oito horas de estímulo esta enzima seria modulada negativamente, e vimos que o estímulo aumentou a expressão desta enzima e que o cultivo em meio com etanol não alterou este efeito, tanto o extrato quanto as subfrações inibiram a expressão desta enzima em níveis inferiores ao controle. Para reforçar este dado seria importante dosar PGD<sub>2</sub> e CisLT para verificarmos se há inibição da liberação destes mediadores lipídicos. Tanto o extrato quanto as subfrações demonstraram melhor inibição da ativação dos mastócitos em relação a alguns artigos, pois muitos destes, usam uma concentração muito alta de planta para que seja exercido alguma função. Kim e cols., 2011 utilizaram  $5 \times 10^5$  células por poço e de 0.5 a 3mg/mL de um conjunto de plantas da medicina tradicional coreana por 8h e. NpEt e as subfrações foram capazes de inibir a COX2 na concentração de 50  $\mu$ g/mL.



Nos mastócitos, o estímulo com ionóforo e PMA estimula caspase-1 seguida de NFκB que vai para o núcleo e ativa a liberação de citocinas, outras proteínas como p38, ERK e JNK também são ativadas. Como houve uma inibição da IL-8 seria interessante ver se o extrato e subfrações impediriam a ativação de alguma destas proteínas, e seria interessante a análise em modelos *in vivo* para dermatite atópica, por exemplo (Oh e cols., 2012 e Moon e cols., 2012). Alexandrakis e cols., 2003 observaram que os flavonóides flavona, quercetina e campeferol impediram o crescimento no número de células e ocasionou acúmulo de grânulos secretórios e este metabólito pode estar presente em alguma subfração exercendo o efeito inibitório.

Para a análise dos eosinófilos utilizamos o modelo de Dyer e cols., 2009. Esta forma de obtenção de eosinófilos nos permite fazer muitas análises, pois ao final da cultura é possível obter grande quantidade de eosinófilos, com alto grau de pureza e estes eosinófilos possuem todas as características funcionais. O mesmo grupo também demonstrou que a maturação de eosinófilos pode ser feita com outras linhagens, como C57BL/6 e Sv129. Nos nossos experimentos analisamos a formação de corpúsculos lipídicos que são inclusões citoplasmáticas cheias de lipídios que possuem grande importância na formação de mediadores eicosanóides durante a inflamação. Bozza e cols., (1997) mostraram o estímulo com eotaxina acarretou aumento nestas organelas, assim como em nosso experimento. Além disso, junto com o aumento houve uma maior liberação de LTC<sub>4</sub>, e PGD<sub>2</sub>. Todas as subfrações inibiram significativamente a produção de corpúsculos, então, para complementar as análises seria interessante dosar estes mediadores no sobrenadante das culturas. Estas inibições não foram consequência da toxicidade dos extratos/subfrações, como mostrados pelo o experimento de apoptose. Outros experimentos poderiam ser feitos como o de migração celular, para verificar se algumas das subfrações seriam capazes de modular negativamente moléculas associadas a este fenômeno como L-selectina e CCR3 dentre outras.

Como no início da avaliação para estudo da toxicidade *in vivo* utilizamos em nossos as células HepG2, um hepatoma humano, para verificar uma possível toxicidade hepática induzida pela administração dos extratos, já que a intenção é um fitomedicamento com tratamento oral. Zileuton é um exemplo na literatura de um bom medicamento para alergias porém hepatotóxico (Temple, 2006). Pelo método de MTT não observamos aparente toxicidade, apenas as subfrações NpEtAe e NpEtFAq aumentaram a D.O. da cultura em relação ao controle o que pode ser devido a ativação de outros agentes redutores além da NADH. Para uma melhor análise da possível hepatotoxicidade, poderíamos também ter dosado a liberação de proteína no sobrenadante além de glutatona e a produção de espécies reativas de oxigênio.

Vimos que NpEtFAe foi a subfração que inibiu a atividade em todas as células além de não apresentar toxicidade. Por isso utilizamos a subfração NpEtFAe que na dose de apenas 10 mg/kg foi capaz de inibir o agravamento da doença, que já foi previamente estabelecida. Resultado semelhante a dexametasona. Este resultado é de grande importância pois a subfração foi administrada de forma terapêutica, semelhante aos humanos, sendo capaz de dificultar a migração eosinofílica mesmo com animal tendo sido continuamente aerolizados. Poucos extratos possuem este efeito na literatura, dentre eles podemos citar novamente a bromelina que apresentou efeito com 6 mg/kg (Secor e cols., 2012). Cabe ressaltar que bromelina é uma substância pura, enquanto que NpEtFAe ainda possui um conjunto de compostos. Quando tentamos correlacionar com quantidade de eosinófilos no BAL, observamos que não houve correlação entre as doses de NpEtFAe, esta falta de correlação deveria ser confirmada pela hemólise de hemácias que eventualmente estão presentes no BAL e pela dosagem de EPO no macerado pulmonar (Baqueiro e cols., 2010).

Como NpEtFAe inibiu a migração de eosinófilos, esperaríamos que estas células estariam diminuídas ou na medula ou no sangue porém não observamos este resultado. Para investigar o porquê deste paradoxo poderíamos realizar mais análises como Pelaquini e cols., (2011). Este grupo analisou as células de cada compartimento no FACS para verificar a expressão das moléculas LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) e VLA-4 (CD49d/CD29), que são responsáveis pela sua migração. Assim poderíamos verificar se NpEtFAe pode causar uma diminuição destas moléculas impedindo assim a chegada ao pulmão. Outro ponto interessante é que NpEtFAe não inibiu eotaxina, por isso poderíamos verificar se o receptor desta quimiocina, o CCR3 poderia estar diminuído.

Quando comparamos a produção de citocinas de animais com três e com seis dias de aerolização, observamos uma diminuição de IL-4, mas uma vez corroborando com o fato desta citocina participar mais ativamente nos momentos iniciais das respostas. Também vimos uma tendência ao aumento de IL-5 e de forma significativa de IL-13. Este aumento pode estar correlacionado com a contínua migração de eosinófilos, ou seja, o aumento de mais de 100% desta célula, após o sexto dia de aerolização. Com relação aos mediadores, ressaltamos que eotaxina não apresentou acréscimo e que PGD<sub>2</sub> se apresentou atenuada. Esta atenuação poderia ser elucidada pela vida curta deste mediador que não estaria mais detectável no sexto dia, devido a sua rápida metabolização. Para confirmarmos esta hipótese, seria interessante realizarmos a dosagem de seus metabólitos.

NpEtFAe apresentou uma tendência à inibição de IL-5, o que pode ter também contribuído para inibição dos eosinófilos. Esta subfração, inibiu principalmente IL-13 o que

pode estar relacionado com a inibição de IgE, fenômeno no qual esta citocina participa junto com a IL-4. IL-13 também é importante na hiperreatividade, sintoma que não foi inibido pela NpEtFAe, mas como outros mediadores responsáveis pela hiperreatividade não foi inibida pela NpEtFAe como PGD<sub>2</sub> (Uller e cols., 2007), isso explica a pouca ação da NpEtFAe na broncoconstricção e produção de muco. A IL-13 estimula a produção de muco e embora esta fração tenha sido capaz de diminuir a liberação desta citocina os animais que foram tratados com NpEtFAe não demonstraram uma melhora na hiperplasia das células globet como mostrado nas fotos micrografias coradas com PAS. Tal condição poderíamos ser explicada pela ação da IL-10 pois Kearley e cols., (2005), mostraram que células regulatórias CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> alérgico específicas, suprimem muitas características da asma.

O tratamento terapêutico com NpEtFAe reduziu de forma expressiva a presença de IgE no soro. Para elucidar o mecanismo de ação deveríamos utilizar células do linfonodo mediastínico e o baço e marcá-las B220<sup>+</sup> e IgE<sup>+</sup>, para verificar se há uma diminuição dos plasmócitos. Foi demonstrado na literatura que os eosinófilos presentes na medula auxiliam na manutenção e sobrevivência dos plasmócitos pelas citocinas APRIL e IL-6 (Chun e cols., 2011). Estas análises de IgE abririam caminho para associações de inibição de mastócitos *in vivo*, pois a redução de IgE poderia também estar influenciando a redução dos mastócitos, que poderiam ser visualizados histologicamente nos pulmões ou na traquéia.

NpEtFAe foi capaz de inibir muitas características da asma, porém não foi capaz de inibir a hiperreatividade, nossos resultados corroboram com a literatura que atestam relações diferentes entre a inflamação e a hiperreatividade. Banerjee e cols. (2012) mostraram em modelo de alergia utilizando *Aspergillus fumigatus* que a tricostotina A, um antifúngico que funciona como uma histona deacetilase, que de forma profilática inibiu a hiperreatividade, porém não a inflamação caracterizada pela dosagem de IL-4, IL-6, nem a contagem do BAL. Cui e cols., (2005) mostraram que a transferência adotiva de Th1 causou grande aumento de neutrofilia, pouca produção de muco, porém muita hiperreatividade.

Vários estudos chamam atenção para natureza heterogênea da asma, como por exemplo, o fenótipo neutrofílico resistente a esteróide, no qual os neutrófilos têm uma clara participação (Gibson e cols., 2009 e Anderson e cols., 2008). Por isso, poderia também ser verificado o efeito de NpEtFAe em outros modelos de inflamação pulmonar alérgica como por exemplo o mediado por IL-17, descrito por Durrant e Metzger, (2010) que utilizaram grande quantidade de OVA no desafio. Outro modelo interessante é o que utiliza a interação com Rinovírus (Bartlett e cols., 2008), já que a infecção por vírus pode aumentar o risco exacerbações de asma embora os mecanismos moleculares desta interação não estão claros.

O modelo de asma crônica que empregamos é semelhante ao de Doherty e cols., (2008). Este modelo é interessante por utilizar pouca quantidade de OVA e assim evitando a tolerância dos animais. Apesar de não termos conseguido uma quantidade de eosinófilos similar ao do artigo (600.000 contra 200.000), as alterações morfológicas foram semelhantes. Embora houvessem poucos eosinófilos no pulmão ao final do experimento, o resultado foi diferente do salina e dexametasona inibiu a quantidade de eosinófilos. NpEtFAe não foi estatisticamente eficiente provavelmente devido ao número pequeno de camundongos por grupo.

Como os animais foram tratados com dexametasona e NpEtFAe por um longo período seria interessante verificar uma possível presença de toxicidade. A dosagem de enzimas hepáticas seria um bom parâmetro. Contudo, só foi possível verificar o peso corporal dos animais. Nesta análise podemos destacar a grande perda de peso dos animais que receberam dexametasona, estes dados nos confirmam sobre os problemas dos efeitos colaterais que os pacientes que utilizam cronicamente os corticóides podem apresentar. No entanto, o tratamento com NpEtFAe não acarretou alteração de peso em relação aos animais sensibilizados e não tratados, indicando que NpEtFAe pode não apresentar toxicidade, mesmo com tratamentos longos.

Os pulmões normais mostram uma característica aparência de um parênquima esponjoso normal conforme observado por histologia, sendo o epitélio alveolar constituído de dois tipos celulares principais os pneumócitos do tipo I e II. Os pulmões dos animais instilados com OVA mostraram uma eosinofilia, resultando em um aumento da parede dos alvéolos, observamos também uma grande quantidade de células nas áreas perivascular e peribronquiolar. O tratamento com dexametasona inibiu esta migração. Já as análises morfométricas nos mostraram que apesar de ambos os tratamentos inibirem a migração total, não impediram a migração de eosinófilos. Com relação ao PAS, novamente os pulmões dos animais não tratados apresentaram grande quantidade de células produtoras de muco em metaplasia, o tratamento com dexametasona reverteu o efeito enquanto que o tratamento com NpEtFAe apresentou uma tendência a inibição. Também analisamos a deposição de colágeno e mais uma vez a subfração apresentou uma tendência a inibição de 51%. Infelizmente estas análises não apresentam diferença significativa devido ao baixo número de amostras. Além das características do remodelamento das vias aéreas mencionados anteriormente, ocorre também a hipertrofia do músculo liso. Por isso, outras análises histológicas como coloração de  $\alpha$ -actina, além de uma detalhada morfometria dos pulmões como realizou Mahmoud, (2012) é importante. Estes eventos são mediados pelas citocinas da resposta  $T_H2$  e TGF- $\beta$ , por isso é

necessário a dosagem destas citocinas, além da dosagem de IgE para elucidação dos mecanismos de ação de NpEtFAe no modelo de asma crônica.

Muitos artigos demonstraram os efeitos benéficos das drogas utilizadas no tratamento com humanos em relação a hiperreatividade no modelo de asma crônica, de forma não terapêutica. Henderson e cols., (2002), também mostraram o efeito de montelukast na asma crônica e Christie e cols., (2004), demonstraram que dexametasona inibiu a deposição de laminina no remodelamento das vias aéreas, todos estes tratamentos foram realizados antes da instilação (de forma profilática).

Quando algumas substâncias são administradas após o início da instilação e conseqüentemente da inflamação também falham em reduzir a hiperreatividade como ocorreu com o grupo no qual utilizamos o modelo. Este grupo demonstrou que uma vez instalada a inflamação crônica, o anticorpo anti-CD4 é capaz de inibir a inflamação, mas não remodelamento. Nos nossos experimentos até mesmo a dexametasona que tem sua eficácia comprovada na farmacologia falhou em impedir a hiperreatividade, reforçando a possível eficácia de NpEtFAe em pacientes asmáticos.

Caso haja um novo subfracionamento de NpEtFAe com identificação da(s) substância(s) poderíamos obter melhores resultados com relação a inibição tanto da inflamação, quanto da hiperreatividade, como Van e cols., (2011), que comprovaram que um agonista de TLR7, o 848, foi capaz de inibir a progressão da asma crônica já estabelecida, com redução do infiltrado celular, da hiperreatividade e das citocinas tais como eotaxina/CCL5, IL-17, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13. Como outro exemplo, podemos citar Cowden e cols., (2010), que realizaram tratamento terapêutico e verificaram que o antagonista de receptor 4 de histamina foi capaz de inibir as principais características da asma crônica.

Embora haja muita dificuldade na transposição dos testes com substâncias do estágio pré-clínico para os clínicos podemos destacar os estudos com *Amburana cearensis*, uma planta utilizada no nordeste no Brasil para o tratamento de doenças respiratórias, pertencente a família Leguminosae. Este estudo clínico é o primeiro a avaliar a eficácia e segurança de xarope de cumaru no tratamento da asma moderada persistente em seres humanos. Concluiu-se que este medicamento fitoterápico mostrou um efeito benéfico significativo, representando uma real alternativa para a terapia complementar da asma (Carvalho e cols., 2012).

NpEtFAe foi capaz de impedir a progressão da doença com efeitos semelhantes a dexametasona como a inibição da migração dos leucócitos para os pulmões e ausência de efeito na hiperreatividade, porém sem possíveis efeitos colaterais, que foi demonstrado pela análise de peso no modelo de asma crônica. Neste modelo, a dexametasona nitidamente

induziu perda de peso dos animais tratados, o que não ocorreu com o tratamento com NpEtFAe. Nossos achados motivam a continuidade do estudo do biomonitoramento com vista a obtenção de um agente com potencial utilização no tratamento da asma, aprofundando a análise dos mecanismos ação.

## 6- Conclusões

- Nossos resultados indicam que o tratamento oral com NpEt, apresenta importante atividade inibidora no modelo de inflamação alérgica pulmonar aguda em camundongos. Este extrato foi capaz de inibir a migração de leucócitos, principalmente de eosinófilos, para o parênquima pulmonar;
- Quando a doença já está estabelecida, a eficácia de NpEt diminui bastante. NpEt não apresenta efeito de inibição da migração celular por aerolização.
- Tanto dos extratos quanto as subfrações foram capazes de inibir a COX<sub>2</sub> nos mastócitos, além de inibir a ativação dos eosinófilos. NpEtFAe se mostrou mais eficiente em modular negativamente os linfócitos, sem toxicidade.
- A fração NpEtAe apresentou efeito significativo, no modelo de asma estabelecida, através da inibição da migração de eosinófilos, da produção de IgE, apesar de não ter inibido a hiperreatividade. Desta forma, NpEtFAe é promissora para auxiliar no tratamento da asma.

## 7 – Referências bibliográficas

1. Agache, C. Akdis, M. Jutel & J. C. Virchow. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy* 67 (2012) 835–846.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
3. Alcorn, J. F., Crowe, C. R. & Kolls, J. K. TH17 Cells in. *Asthma and COPD*. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 495–516 (2010).
4. Alexandrakis M, Letourneau R, Kempuraj D, Kandere-Grzybowska K, Huang M, Christodoulou S, Boucher W, Seretakis D, Theoharides TC. Flavones inhibit proliferation and increase mediator content in human leukemic mast cells (HMC-1). *Eur J Haematol.* 2003 Dec;71(6):448-54.
5. Amendoeira FC, Frutuoso VS, Chedier LM, Pearman AT, Figueiredo MR, Kaplan MA, et al. Antinociceptive effect of *Nidularium procerum*: a Bromeliaceae from the Brazilian coastal rain forest. *Phytomedicine*. 2005a Jan;12(1-2):78-87.
6. Amendoeira FC., Frutuoso VS, Zanon C, Chedier LM, Figueiredo MR, Kaplan MA, et al. Anti-inflammatory activity in the aqueous crude extract of the leaves of *Nidularium procerum*: A Bromeliaceae from the Brazilian coastal rain forest. *Biol Pharm Bull.* 2005b Jun; 28(6):1010-5.
7. Amirav I, Luder AS, Kruger N, Borovitch Y, Babai I, Miron D, Zuker M, Tal G, Mandelberg APediatrics. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial of montelukast for acute bronchiolitis. 2008 Dec;122(6):e1249-55.
8. Anderson GP. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet.* 2008 Sep 20;372(9643):1107-19.



9. Angkasekwinai P, Chang SH, Thapa M,<sup>1</sup> Watarai H, Dong C. Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling. *Nat Immunol.* 2010 March; 11(3): 250–256.
10. Arima M and Fukuda T. Prostaglandin D2 and TH2 Inflammation in the Pathogenesis of Bronchial Asthma. *Korean J Intern Med.* 2011 March; 26(1): 8–18.
11. Ashino S, Wakita D, Shiohama Y, Iwakura Y, Chamoto K, Ohkuri T, et al. A Th17-polarized cell population that has infiltrated the lung requires cells that convert to IFN- $\gamma$  production in order to induce airway hyperresponsiveness. *International Immunology*, 2010, Vol. 22, No. 6, pp. 503–513.
12. Atallah AM & Nicholas HJ. Triterpenoids and steroids constituents of Florida spanish moss. *Phytochemistry.* 1971, 10:3139-3145.
13. Ayensu ES, DeFilippis RA. *Endangered and Threatened Plants of The United States.* Washington, DC: Smithsonian Institution, 1978.
14. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Aug;120(2):227-35.
15. Balzar S, Fajt ML, Comhair SA, et al. Mast cell phenotype, location, and activation in severe asthma. Data from the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:299–309.
16. Banerjee A, Trivedi CM, Damera G, Jiang M, Jester W, Hoshi T et al. Trichostatin A abrogates airway constriction, but not inflammation, in murine and human asthma models. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012 Feb;46(2):132-8.
17. Baqueiro, T., Russo, M., Silva, V.M.G., Meirelles, T., Oliveira, P.R.S., Gomes, E. Et al. Respiratory allergy to *Blomia tropicalis*: immune response in four syngeneic mouse strains and assessment of a low allergen-dose, short-term experimental model. *Respiratory Research* 11, 2010,51–62.

18. Barnes PJ, Chung KF & Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol. Rev.* 1998;50, 515-596
19. Barnes PJ, Adcock IM. How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med.* 2003 Sep 2;139(5 Pt 1):359-70
20. Bartlett NW, Walton RP, Edwards MR, Aniscenko J, Caramori G, Zhu J, et al. Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic airway inflammation. *Nat Med.* 2008 Feb;14(2):199-204.
21. Benzing, D. H.; Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation, ed.; Cambridge University Press: New York, 2000.
22. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 1996;4:14–9.
23. Billington CK, Hall IP. Novel cAMP signalling paradigms: therapeutic implications for airway disease. *Br J Pharmacol* 2012;166:401–410.
24. Billington CK, Ojo OO, Penn RB, Ito S. cAMP regulation of airway smooth muscle function. *Pulm Pharmacol Ther* 2013;26:112–120.
25. Boguniewicz M, Martin RJ, Martin D, Gibson U, Celniker A, Williams M, et al The effects of nebulized recombinant interferon-gamma in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol.* 1995 Jan;95(1 Pt 1):133-5.
26. Borin MR de MB & Gottlieb OR. Plant Chemosystematics and phylogeny 35. Steroids, taxonomic markers? *Plant. 1993 Syst.Evol.* 184:41-76.
27. Boswell-Smith V, Spina D, Oxford AW, Comer MB, Seeds EA, Page CP: The pharmacology of two novel long-acting phosphodiesterase 3/4 inhibitors, RPL554 [9,10-dimethoxy-2(2,4,6-trimethylphenylimino)-3-(n-carbamoyl-2-aminoethyl)-3,4,6,7-tetrahydro-2H pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one] and RPL565 [6,7-dihydro-2-(2,6-

- diisopropylphenoxy)-9,10-dimethoxy-4H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one]. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 318:840-848.
28. Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med*. 1997 Sep 15;186(6):909-20.
29. Busse WW, Lemanske RF Jr. Asthma. *N Engl J Med*. 2001 Feb 1;344(5):350-62.
30. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk Res* 1988; 12:345–55.
31. Butterworth AE. Cell-mediated damage to helminths. *Adv Parasitol* 1984;23:143–235.
32. By Kathi J. Kemper, MD, MPH, and Mitchell R. Lester, MD. Alternative asthma therapies: An evidence-based review. March 1999 *Contemporary Pediatrics* Vol 16, nº3.
33. Calixto JB., Scheidt C, Otuki M, Santos AR. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2001 Oct;6(2):261-79.
34. Carvalho EM, da Cunha GH, Fachine FV, CRA Uchôa, MO de M Filho, FAF Bezerra et al. Efficacy and safety of cumaru syrup as complementary therapy in mild persistent asthma: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 48, n. 4, oct./dec., 2012.
35. Cazzola M, Page CP, Calzetta L, Matera MG. Pharmacology and therapeutics of bronchodilators. *Pharmacol Rev* 2012;64:450–504.
36. CDC: National Center for health statistics: asthma 2012. Disponível em <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/asthma.htm>. Acessado em 26.01.13.

37. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* 2000 Jun;30(6):1538-43.
38. Chattopadhyay K, Ghosh T, Pujol CA, Carlucci MJ, Damonte EB, Ray B. Polysaccharides from *Gracilaria corticata*: Sulfation, chemical characterization and anti-HSV activities. *Int J Biol Macromol.* 2008 Nov 1;43(4):346-51.
39. Chedier LM Kaplan MAC. Chemical ecology of three species of Bromeliaceae. *Bromelia* 1996;3, 25-31.
40. Cho SH, Stanciu LA, Holgate ST, Johnston SL. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Feb 1;171(3):224-30.
41. Christie PE, Jonas M, Tsai CH, Chi EY, Henderson WR Jr. Increase in laminin expression in allergic airway remodelling and decrease by dexamethasone. *Eur Respir J.* 2004 Jul;24(1):107-15.
42. Chun VT, Fröhlich A, Steinhauser G, Scheel T, Roch T, Fillatreau S, Lee JJ, Löhning M, Berek C. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol.* 2011 Feb;12(2):151-9.
43. Cockcroft DW, Hargreave FE, O'Byrne PM, Boulet LP. Understanding allergic asthma from allergen inhalation tests. *Can Respir J.* 2007 Oct;14(7):414-8.
44. Conrad ML, Yildirim AO, Sonar SS, Kiliç A, Sudowe S, Lunow M, et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy.* 2009 Aug;39(8):1246-54.
45. Corrêa MP. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Vol.2. Rio de Janeiro, 1984, Imprensa Nacional.

46. Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey MV, Arron JR et al. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med* 2011;365:1088–98.
47. Corry DB, Irvin CG. Promise and pitfalls in animal-based asthma research: building a better mousetrap. *Immunol Res* 2006;35:279-94.
48. Costa RS, Brasil TC, Santos CJ, Santos DB, Barreto ML, Neves NMA, Figueiredo CAV. Produtos naturais utilizados para tratamento de asma em crianças residentes na cidade de Salvador-BA, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia. Ago./Set. 2010; 20(4): 594-599.*
49. Cowden JM, Riley JP, Ma JY, Thurmond RL, Dunford PJ. Histamine H4 receptor antagonism diminishes existing airway inflammation and dysfunction via modulation of Th2 cytokines. *Respir Res.* 2010 Jun 24;11:86.
50. Cronquist A. *An integrated System of Classification of Flowering Plants.* New York: Columbia University Press, 1981.
51. Cronquist A. *The Evolution and Classification of Flowering Plants.* Bronx, NY:New York. Botanical Garden, 1988.
52. Cui J, Pazdziorko S, Miyashiro JS, Thakker P, Pelker JW, Declercq C, et al. TH1-mediated airway hyperresponsiveness independent of neutrophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Feb;115(2):309-15.
53. Dalmau SR, Freitas CS, Savino W. Upregulated expression of fibronectin receptors underlines the adhesive capability of thymocytes to thymic epithelial cells during the early stages of differentiation: lessons from sublethally irradiated mice. *Blood.* 1999 Feb 1;93(3):974-90.
54. Davies DE, Wicks J, Powell RM, Puddicombe SM, Holgate ST. Airway remodeling in asthma: new insights. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Feb;111(2):215-25; quiz 226.

55. Di Domenico M, Bisogno A, Polverino M, De Rosa C, Ricci V, Capasso A. Xolair in asthma therapy: an overview. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2011 Feb;10(1):2-12.
56. del Cuvillo A, Mullol J, Bartra J, Dávila I, Jáuregui I, Montoro J, Sastre J, Valero AL. Comparative pharmacology of the H1 antihistamines. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2006;16 Suppl 1:3-12.
57. Doherty TA, Soroosh P, Broide DH, Croft M. CD4<sup>+</sup> cells are required for chronic eosinophilic lung inflammation but not airway remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Feb;296(2):L229-35.
58. Dong C, Flavell RA. Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses. *Arthritis Res*. 2000;2(3):179-188.
59. Dong C, Wang G, Li B, Xiao K, Ma Z, Huang H, Wang X, Bai C. Anti-asthmatic agents alleviate pulmonary edema by upregulating AQP1 and AQP5 expression in the lungs of mice with OVA-induced asthma. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012 Apr 15;181(1):21-8.
60. Duan W, Chan JH, McKay K, Crosby JR, Choo HH, Leung BP, Karras JG, Wong WS. Inhaled p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase antisense oligonucleotide attenuates asthma in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Mar 15;171(6):571-8.
61. Drazen JM, Yandava CN, Dube L, Szczerback N, Hippensteel R, Pillari A, et al. Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment. *Nat Genet* 1999;22:168-70.
62. Durrant DM and Metzger DW. IL-12 can alleviate Th17-mediated allergic lung inflammation through induction of pulmonary IL-10 expression. *Mucosal Immunol*. 2010 May;3(3):301-11.
63. Dvorak AM, Estrella P, Ishizaka T. Vesicular transport of peroxidase in human eosinophilic myelocytes. *Clin Exp Allergy*. 1994 Jan;24(1):10-8.

64. Dyer KD, Percopo CM, Rosenberg HF. Generation of eosinophils from unselected bone marrow progenitors: wild-type, TLR- and eosinophil-deficient mice. *Open Immunol J*. 2009 Jan 1;2:163-167.
65. Egesten A., Alumets J., von Mecklenburg C., Palmegren M., & Olsson I. Localization of eosinophil cationic protein, major basic protein, and eosinophilperoxidase in human eosinophils by immunoelectron microscopic technique. *J Histochem Cytochem*. 1986 34:1399–403.
66. El-Qutob López D. New methods of prevention and treatment of allergic diseases. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2012 Jan;6(1):46-64.
67. Fikaris AJ, Lewis AE, Abulaiti A, Tsygankova OM, Meinkoth JL. Ras triggers ataxia-telangiectasia-mutated and Rad-3-related activation and apoptosis through sustained mitogenic signaling. *J Biol Chem*. 2006 Nov 17;281(46):34759-67.
68. Finkelman FD, Wills-Karp M. Usefulness and optimization of mouse models of allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Mar;121(3):603-6.
69. Fitzhugh DJ, Shan S, Dewhirst MW, Hale LP. Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation. *Clin Immunol*. 2008 Jul;128(1):66-74.
70. Furuta GT, Nieuwenhuis EE, Karhausen J, Gleich G, Blumberg RS, Lee JJ, Ackerman SJ.. Eosinophils alter colonic epithelial barrier function: role for major basic protein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005 Nov;289(5):G890-7.
71. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med*. 2012 May 4;18(5):693-704.
72. Gauvreau GM, Boulet LP, Schmid-Wirlitsch C, Cote J, Duong M, Killian KJ, Milot J, Deschesnes F, Strinich T, Watson RM et al.: Roflumilast attenuates allergen-induced inflammation in mild asthmatic subjects. *Respir Res* 2011, 12:140.

73. Gibson PG. Inflammatory phenotypes in adult asthma: clinical applications. *Clin Respir J*. 2009 Oct;3(4):198-206.
74. Guerra PM e Nodari OR. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos, 2001.
75. Gyllfors P, Dahlén SE, Kumlin M, Larsson K, Dahlén B. Bronchial responsiveness to leukotriene D4 is resistant to inhaled fluticasone propionate. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Jul;118(1):78-83.
76. Harbone, JB & Mabry TJ. *The Flavonoids: Advances in research*. Chapman and Hall Ltd, London, 1982, 743p
77. Harbone JB. *The flavonoids advances in research since 1980*. Chapman and Hall Ltd, 1988, London, 621p.
78. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Et Al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1123-32.
79. Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT, Reinhardt D, Nicolai T, Schendel DJ, Griese M, Krauss-Etschmann S. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 May;119(5):1258-66.
80. Henderson JP, Byun J, Williams MV, McCormick ML, Parks WC, et al. Bromination of deoxycytidine by eosinophil peroxidase: a mechanism for mutagenesis by oxidative damage of nucleotide precursors. 2001 *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1631–6.
81. Henderson WR Jr, Tang LO, Chu SJ, Tsao SM, Chiang GK, Jones F, Jonas M, Pae C, Wang H, Chi EY. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jan 1;165(1):108-16.



82. Henderson WR Jr, Chiang GK, Tien YT, Chi EY. Reversal of allergen-induced airway remodeling by CysLT1 receptor blockade. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Apr 1;173(7):718-28.
83. Herraiz T, Galisteo J. Tetrahydro-beta-carboline alkaloids occur in fruits and fruit juices. Activity as antioxidants and radical scavengers. *J Agric Food Chem.* 2003 Nov 19;51(24):7156-61.
84. Hindley C, Philpott A. *Biochem J.* The cell cycle and pluripotency. 2013 Apr 15;451(2):135-43.
85. Holgate S, Casale T, Wenzel S, Bousquet J, Deniz Y, Reisner C The anti-inflammatory effects of omalizumab confirm the central role of IgE in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Mar;115(3):459-65.
86. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008 Jun;38(6):872-97.
87. Holgate ST & Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology* Mar 2008 (8): 218-230.
88. Ismail N, Jambari NN, Zareen S, Akhtar MN, Shaari K, Zamri-Saad M, Tham CL, Sulaiman MR, Lajis NH, Israf DA. A geranyl acetophenone targeting cysteinyl leukotriene synthesis prevents allergic airway inflammation in ovalbumin-sensitized mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012 Mar 1;259(2):257-62.
89. Ivancsó I, Böcskei R, Müller V, Tamási L. Extrafine inhaled corticosteroid therapy in the control of asthma. *J Asthma Allergy.* 2013 Jun 6;6:69-80.
90. Jacobsen EA, Zellner KR, Colbert D, Lee NA, Lee JJ. Eosinophils regulate dendritic cells and Th2 pulmonary immune responses following allergen provocation. *J Immunol.* 2011 Dec 1;187(11):6059-68.

91. Jin L, Yixi B, Waikai L, Wenwen L, Fang L, Xuan Z, et al. Immunoregulatory and Anti-Tumor Effects of Polysaccharopeptide and Astragalus polysaccharides on Tumor-Bearing Mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2008 Aug 5:1-12.
92. Johansson AK, Sergejeva S, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötval J. Allergen-induced traffic of bone marrow eosinophils, neutrophils and lymphocytes to airways. *Eur J Immunol*. 2004 Nov;34(11):3135-45.
93. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2012;38 (supl.1): S1-S46.
94. Juhasz B, Thirunavukkarasu M, Pant R, Zhan L, Penumathsa SV, et al. Bromelain induces cardioprotection against ischemia-reperfusion injury through Akt/FOXO pathway in rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Mar;294(3):H1365-70.
95. Jung HW, Jung JK, Kim YH, Kang JS, Park YK. Effect of KOB03, a polyherbal medicine, on ovalbumin-induced allergic rhinitis in guinea pigs. *Chin Med*. 2012 Dec 20;7(1):27.
96. Jung YJ, Woo SY, Jang MH, Miyasaka M, Ryu KH, Park HK, Seoh JY. Human eosinophils show chemotaxis to lymphoid chemokines and exhibit antigen-presenting-cell-like properties upon stimulation with IFN-gamma, IL-3 and GM-CSF. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;146(3):227-34
97. Kanda A, Driss V, Hornez N, Abdallah M, Roumier T, Abboud G, et al. Eosinophil-derived IFN-gamma induces airway hyperresponsiveness and lung inflammation in the absence of lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Sep;124(3):573-82, 582.e1-9.
98. Kazani S, Wechsler ME, Israel E. The role of pharmacogenomics in improving the management of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2):295-302; quiz 303-4.
99. Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med*. 2005 Apr;11(4):148-52.
100. Kearley J, Buckland KF, Mathie SA, Lloyd CM. Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 May 1;179(9):772-81.

101. Kearley J, Erjefalt JS, Andersson C, Benjamin E, Jones CP, Robichaud A et al. IL-9 governs allergen-induced mast cell numbers in the lung and chronic remodeling of the airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Apr 1;183(7):865-75.
102. Kirshenbaum AS, Swindle E, Kulka M, Wu Y, Metcalfe DD. Effect of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on human mast cell numbers, cytokine production, and protease composition. *BMC Immunol*. 2008 Aug 7;9:45
103. Kim SJ, Kee JY, Choi IY, Kim MC, Kim DS, Jeon YD, et al. *J Ethnopharmacol*. Insamhodo-tang, a traditional Korean medicine, regulates mast cell-mediated allergic inflammation in vivo and in vitro. 2011 Mar 24;134(2):339-47.
104. Kim JJ, Kang TH, Seo JU, Na HJ, Kim SJ, et al. Libanoridin inhibits the mast cell-mediated allergic inflammatory reaction. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2010 Jun;32(2):258-64.
105. Knapp L. Fitoterapia sobre novos campos de pesquisa. *Gazeta Mercantil*, set 2001 (S.1.), n. 22170, 18.
106. Kuperman DA, Schleimer RP. Interleukin-4, interleukin-13, signal transducer and activator of transcription factor 6, and allergic asthma. *Curr Mol Med*. 2008;8:384–392
107. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med*. 2012 May 4;18(5):684-92.
108. Larché M. Regulatory T cells in allergy and asthma. *Chest*. 2007 Sep;132(3):1007-14.
109. Larrauri, J. A.; Rupérez, P.; Saura-Calixto, F.; *J. Agric. Food Chem*. 1997, 45, 4028.
110. Lee MY; Ahn KS; Lim HS; Yuk JE; Kwon OK; Lee KY, et al. Tiarellic acid attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of allergic asthma. *Int Immunopharmacol*; 12(1): 117-24, 2012 Jan.

111. Lee MY, Lee NH, Seo CS, Lee JA, Jung D, Kim JH, Shin HK. *Alpinia katsumadai* seed extract attenuate oxidative stress and asthmatic activity in a mouse model of allergic asthma. *Food Chem Toxicol.* 2010 Jun;48(6):1746-52.
112. Lehrer RI, Szklarek D, Barton A, Ganz T, Hamann KJ, & Gleich GJ. Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. *J Immunol* 1989 142:4428–34.
113. Leme EMC. *Nidularium*. Sextante, Rio de Janeiro. 2000.
114. Li XM, Brown L. Efficacy and mechanisms of action of traditional Chinese medicines for treating asthma and allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Feb;123(2):297-306; quiz 307-8.
115. Liles WC, Dale DC, Klebanoff SJ. Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood.* 1995 Oct 15;86(8):3181-8.
116. Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol.* 2010 Dec;10(12):838-48.
117. Lorentz, A., Klopp, I., Gebhardt, T., Manns, M. P. & Bischoff, S. C. Role of activator protein-1, nuclear factor- $\kappa$ B and nuclear factor of activated T-cells in IgE receptor-mediated cytokine expression in mature human mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003 111, 1062–1068.
118. Lutz MB, Schnare M, Menges M, Rössner S, Röllinghoff M, Schuler G et al. Differential functions of IL-4 receptor types I and II for dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF. *J Immunol.* 2002 Oct 1;169(7):3574-80.
119. Mabalirajan U, Ahmad T, Leishangthem GD, Joseph DA, Dinda AK, Agrawal A, Ghosh B. Beneficial effects of high dose of L-arginine on airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Mar;125(3):626-35.

120. Mahmoud YI. Grape seed extract attenuates lung parenchyma pathology in ovalbumin-induced mouse asthma model: an ultrastructural study. *Micron*. 2012 Oct;43(10):1050-9.
121. Maloy KJL, Salaun R, Cahill G, Dougan NJ, Saunders and F. Powrie. 2003. CD4<sub>+</sub>CD25<sup>+</sup> TR cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J. Exp. Med.* 197: 111–119.
122. Marker RE, Wagner RB, Ulshafer PR, Wittbecker EL, Goldsmith DPJ, Rouf CH. Sterols. CLVII. Sapogenins. LXIX. Isolation and structures of thirteen new steroidal sapogenins. New sources for known sapogenins. *J. Am. Chem. Soc.* 194365, 1199-1208.
123. Marsland BJ, Bättig P, Bauer M, Ruedl C, Lässig U, Beerli RR, et al. CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity*. 2005 Apr;22(4):493-505.
124. Melo RC, Spencer LA, Perez SA, Ghiran I, Dvorak AM, Weller PF. Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments. *Traffic*. 2005 Nov;6(11):1047-57.
125. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev*. 1997 Oct;77(4):1033-7.
126. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000 Dec;52(4):673-751.
127. Migalovich-Sheikhet H, Friedman S, Mankuta D, Levi-Schaffer F. Novel identified receptors on mast cells. *Front Immunol*. 2012;3:238.
128. Ministério da saúde. (acessado em 01/05/2013). Disponível em [http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=23509](http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23509).
129. Moon PD, Jeong HJ, Kim HM. Effects of schizandrin on the expression of thymic stromal lymphopoietin in human mast cell line HMC-1. *Life Sci*. 2012 Oct 5;91(11-12):384-8.

130. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
131. Murdoch JR, Lloyd CM. Resolution of allergic airway inflammation and airway hyperreactivity is mediated by IL-17-producing  $\gamma\delta$ T cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Aug 15;182(4):464-76.
132. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*. 2002 Sep;17(3):375-87.
133. Nathani N, Little MA, Kunst H, Wilson D, Thickett DR. Churg-Strauss syndrome and leukotriene antagonist use: a respiratory perspective. *Thorax*. 2008 Oct;63(10):883-8.
134. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*. 2010 Apr 29;464(7293):1367-70.
135. Nilsson G, Blom T, Kusche-Gullberg M, Kjellen L, Butterfield JH, Sundstrom C, Nilsson K, Hellman L. Phenotypic characterization of the human mast-cell line HMC-1. *Scand J Immunol* 1994; 39:489-98.
136. Nittoh T, Fujimori H, Kozumi Y, Ishihara K, Mue S, Ohuchi K. Effects of glucocorticoids on apoptosis of infiltrated eosinophils and neutrophils in rats. *Eur J Pharmacol*. 1998 Jul 31;354(1):73-81.
137. Oh SR, Um JY, Choi HJ, Im CK, Kim KJ, Jung JW, et al. *Betula platyphylla* attenuated mast cell-mediated allergic inflammation in vivo and in vitro. *Life Sci*. 2012 Jul 26;91(1-2):20-8.
138. Olsen PC, Coelho LP, da Costa JC, Cordeiro RS, Silva PM, Martins MA. Two for one: Cyclic AMP mediates the anti-inflammatory and anti-spasmodic properties of the non-anesthetic lidocaine analog JMF2-1. *Eur J Pharmacol*. 2012 Apr 5;680(1-3):102-7.

139. Page CP, Spina D. Selective PDE inhibitors as novel treatments for respiratory diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2012 Jun;12(3):275-86.
140. Palmqvist C, Wardlaw AJ, Bradding P. Chemokines and their receptors as potential targets for the treatment of asthma. *Br J Pharmacol*. 2007 Jul;151(6):725-36.
141. Parada, F.; Krajewski, D.; Hederich, M.; Duque, C.; Schreier, P.; 3,4 Dimethoxyphenyl  $\beta$ -D-Glucopyranoside From Piñuela (*Bromelia plumieri* Kartens) Fruit. *Nat. Prod. Lett*. 1995, 7, 69.
142. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1133-41.
143. Pawankar R, Okuda M, Yssel H, Okumura K, Ra C. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest*. 1997 Apr 99(7):1492-9.
144. Pawliczak R. New horizons in allergy diagnostics and treatment. *Pol Arch Med Wewn*. 2013;123(5):246-50.
145. Peebles RS Jr, Hashimoto K, Sheller JR, Moore ML, Morrow JD, Ji S, Elias JA, et al. Allergen-induced airway hyperresponsiveness mediated by cyclooxygenase inhibition is not dependent on 5-lipoxygenase or IL-5, but is IL-13 dependent. *J Immunol*. 2005 Dec 15;175(12):8253-9.
146. Pelaquini EH, Guimarães Lde A, Benetti LR, Fernandes LG, Tamashiro WM, Conran N, et al. Role of the Mac-1 and VLA-4 integrins, and concomitant Th2-cytokine production, in nitric oxide modulated eosinophil migration from bone marrow to lungs in allergic mice. *Int Immunopharmacol*. 2011 Feb;11(2):204-11.

147. Pégrier S, Wagner LA, Gleich GJ, & Pretolani M. Eosinophil-derived cationic proteins activate the synthesis of remodeling factors by airway epithelial cells. 2006 *J Immunol* 177:4861–9.
148. Persson, C.G. (2002). Con: mice are not a good model of human airway disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 6–7.
149. Pinelli V, Marchica CL, Ludwig MS. Allergen-induced asthma in C57Bl/6 mice: Hyper-responsiveness, inflammation and remodelling. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 169 (2009) 36–43.
150. Prance, G T. Floristic inventory of the tropics: where do we stand? *Ann. Missouri Bot. Gard.*, (S.1.), v.64. 1977, p.559-684.
151. Raffauf, R. F., Menachery, M. D., Le Quesne, P. W., Arnold, E. V., Clardy, J.: Antitumor plants. 11. Diterpenoid and flavonoid constituents of *Bromelia pinguin* L. *J. Org. Chem.* 1981 46: 1094-1098.
152. Rank MA, Hagan JB, Park MA, Podjasek JC, Samant SA, Volcheck GW, et al. The risk of asthma exacerbation after stopping low-dose inhaled corticosteroids: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Mar;131(3):724-9.
153. Rates SM. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 2001 May;39(5):603-13.
154. Rincon M, Irvin CG. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1281-90.
155. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med.* 1992 Jan 30;326(5):298-304.
156. Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy.* 2006 Nov;36(11):1357-66.



157. Rosenberg HF, & Domachowske JB. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J Leukoc Biol* 2001; 70:691–8.
158. Rosenberg HF, Dyer KD, Foster PS. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jan;13(1):9-22.
159. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998 338:1592-600.
160. Schelz Z, Molnar J, Hohmann J. Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils. *Fitoterapia*. 2006 Jun;77(4):279-85.
161. Schleimer RP, Kato A, Kern R, Kuperman D, Avila PC. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2007. Dec;120(6):1279-84.
162. Secor ER, Carson WF, Singh A, Pensa M, Guernsey LA, Schramm CM, Thrall RS. Oral Bromelain Attenuates Inflammation in an Ovalbumin-induced Murine Model of Asthma. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008 Mar;5(1):61-9.
163. Secor ER Jr, Shah SJ, Guernsey LA, Schramm CM, Thrall RS. Bromelain limits airway inflammation in an ovalbumin-induced murine model of established asthma. *Altern Ther Health Med*. 2012 Sep-Oct;18(5):9-17.
164. Seo MJ, Kim SJ, Kang TH, Rim HK, Jeong HJ, Um JY, et al. Immunopharmacol Immunotoxicol. The regulatory mechanism of  $\beta$ -eudesmol is through the suppression of caspase-1 activation in mast cell-mediated inflammatory response. 2011 Mar;33(1):178-85.
165. Slifman NR, Loegering DA, McKean DJ & Gleich GJ. Ribonuclease activity associated with human eosinophil derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. 1986 *J Immunol* 137:2913–17.
166. Solecki R. Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in northern Iraq. *Science* 1975.190:880-881.

167. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012 Dec;114(8):785-96
168. Silva PM, Alves AC, Serra MF, Pires AL, Silva JP, Barreto EO, et al. Modulation of eotaxin formation and eosinophil migration by selective inhibitors of phosphodiesterase type 4 isoenzyme. *Br J Pharmacol.* 2001 Sep;134(2):283-94.
169. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia – da planta ao medicamento.* 2.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFSC, 2000.
170. Smith LA e Downs RJ. *Bromeliaceae, Subfamily Pitcairnioideae.* New York: Hafner Press, v.14. 1974. 685 p. (Flora Neotropica).
171. Siqueira AM., Estudo dos efeitos dos extratos de *Nidularium procerum* Lidman no modelo de inflamação alérgica pulmonar em camundongos. Dissertação de mestrado, 2008.
172. Takata RH & Scheuer PJ Isolation of caffeic and p-coumaric acids from pineapple steam. *Lloydia* 1976a; 39:409-411.
173. Takata RH & Scheuer PJ. Ananasic acid, a new trihidroxitriterpenecarboxylic acid from pineapple steams. *Tetrahedron* 1976b 32: 1077-1080.
174. Tanaka T. Flavonoids For Allergic Diseases: Present Evidence And Future Perspective. *Curr Pharm Des.* 2013 May 17.
175. Taube C, Dakhama A, Gelfand EW. Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;135:173-86.

176. Temple, R. (2006). Hy's law: Predicting serious hepatotoxicity. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 15, 241–243.
177. Tsuyuki S, Tsuyuki J, Einsle K, Kopf M, Coyle AJ. Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (TH2) immune response and altered airway responsiveness. *J Exp Med.* 1997 May 5;185(9):1671-9.
178. Tumes DJ, Connolly A, Dent LA. Expression of survivin in lung eosinophils is associated with pathology in a mouse model of allergic asthma. *Int Immunol.* 2009 Jun;21(6):633-44.
179. Uchida DA, Ackerman SJ, Coyle AJ, Larsen GL, Weller PF, Freed J, et al. The effect of human eosinophil granule major basic protein on airway responsiveness in the rat in vivo. A comparison with polycations. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:982–8.
180. Uller L, Mathiesen JM, Alenmyr L, Korsgren M, Ulven T, Högberg T, Andersson G, Persson CG, Kostenis E. Antagonism of the prostaglandin D2 receptor CRTH2 attenuates asthma pathology in mouse eosinophilic airway inflammation. *Respir Res.* 2007 Feb 28;8:16.
181. Van LP, Bardel E, Gregoire S, Vanoirbeek J, Schneider E, Dy M, Thieblemont N. Treatment with the TLR7 agonist R848 induces regulatory T-cell-mediated suppression of established asthma symptoms. *Eur J Immunol.* 2011 Jul;41(7):1992-9.
182. van den Elsen LW, Nusse Y, Balvers M, Redegeld FA, Knol EF, Garssen J, Willemsen LE. n-3 Long-chain PUFA reduce allergy-related mediator release by human mast cells in vitro via inhibition of reactive oxygen species. *Br J Nutr.* 2013 May 28;109(10):1821-31
183. Verpoorte R, Van der Heijden R, Memelink J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Res.* 2000;9(4-5):323-43
184. Vieira-de-Abreu A, Calheiros AS, Mesquita-Santos FP, Magalhães ES, Mourão-Sá D, Castro-Faria-Neto HC, Bozza MT, Bandeira-Melo C, Bozza PT. Macrophage migration

- inhibitory factor is essential for allergic asthma but not for Th2 differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Apr;44(4):509-16.
185. Von Köckritz-Blickwede M, Nizet V. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. *J Mol Med (Berl)*. 2009 Aug;87(8):775-83.
186. Wack A, Gallorini S. Bacterial Polysaccharides with Zwitterionic Charge Motifs: Toll-Like Receptor 2 Agonists, T Cell Antigens, or Both? *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2008 Aug 5:1-10.
187. Wang HB, Ghiran I, Matthaei K, Weller PF. Airway eosinophils: allergic inflammation recruited professional antigen-presenting cells. *J Immunol*. 2007 Dec 1;179(11):7585-92.
188. Wang J, & Slungaard A. Role of eosinophil peroxidase in host defense and disease pathology. *Arch Biochem Biophys*. 2006 445:256–60.
189. World Health Organization. acessado em 15/07/2013. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>.
190. World Health Organization. acessado em 15/07/2013. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/index.html>.
191. World Health Organization, Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneve, 2003. 1 vol.
192. World Health Organization (WHO) Geneva. Guidelines for the assessment of herbal medicine. 1991.
193. Williams, C.M., and S.J. Galli. 2000. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *J. Exp. Med*. 192:455–462.
194. Williams AP, Krishna MT, Frew AJ. The safety of immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2004 Apr;34(4):513-4.

195. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S.:271-5. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 2008 Oct 10;322(5899).
196. Won HY, Min HJ, Ahn JH, Yoo SE, Bae MA, Hong JH, et al. Anti-allergic function and regulatory mechanisms of KR62980 in allergen-induced airway inflammation. *Biochem Pharmacol*. 2010 Mar 15;79(6):888-96.
197. Wong CK, Hu S, Cheung PF, Lam CW Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and prosurvival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Sep;43(3):305-15.
198. Wu K, Bi Y, Sun K, Wang C. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol*. 2007 Aug;4(4):269-75.
199. Xu H, Liew LN, Kuo C, Huang CH, Goh DL, Chua KY. The modulatory effects of lipopolysaccharide-stimulated B cells on differential T-cell polarization. *Immunology*. 125, 218–228, 2008.
200. Yi, X.; Wei, B.; Tenj, J.; Gao, C.; Shipin. *Yu Fajiao Gongye* 2006, 32, 99 (CA 147: 405297).
201. Ying, S, Zhang, G, GU S, zhao J. How much do we know about asthma: where are we now? *Cell Mol Immunol*. 2006 3:321-332.
202. Young JD, Peterson CG, Venge P & Cohn ZA. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* 1986 321:613–16.
203. Yunes RA, Calixto JB. *Plantas medicinais – sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2001.
204. Zhang LL, Lin YM. Tannins from *Canarium album* with potent antioxidant activity. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2008 May;9(5):407-15.

205. Zhang X, Moilanen E, Kankaanranta H. Beclomethasone, budesonide and fluticasone propionate inhibit human neutrophil apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2001 Nov 23;431(3):365-71.
206. Zheutlin LM, Ackerman SJ, Gleich GJ, & Thomas L.L. Stimulation of basophil and rat mast cell histamine release by eosinophil granule-derived cationic proteins. 1984 *J Immunol* 133:2180–5.