



Universidade Federal da Bahia

Instituto de Ciências da Saúde

**Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e
Sistemas**

Ana Tereza Cerqueira Lima

**PADRONIZAÇÃO E ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE DE
MODELOS EXPERIMENTAIS DE ASMA UTILIZANDO
ÁCAROS PARA O TESTE DE NOVAS DROGAS**

Salvador

2010

Ana Tereza Cerqueira Lima

**PADRONIZAÇÃO E ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE DE
MODELOS EXPERIMENTAIS DE ASMA UTILIZANDO
ÁCAROS PARA O TESTE DE NOVAS DROGAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. Área de Concentração: Distúrbios dos Órgãos e Sistemas.

**ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Camila A. Viana de Figueiredo
CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Neuza Maria Alcântara Neves**

Salvador
2010

Padronização e estudo da resposta imune de modelos experimentais de asma utilizando ácaros para o teste de novas drogas

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e sistemas, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Comissão Examinadora

Camila Alexandrina Viana de Figueiredo

Doutorado em Farmacologia pela Universidade Estadual de Campinas, Brasil (2005)
Professora Adjunta nível 1 da Universidade Federal da Bahia

Roberto Paulo de Araújo Correia

Doutorado em Odontologia pela Universidade Federal da Bahia, Brasil (1998).
Professor Titular da Universidade Federal da Bahia, Brasil.

Hendrik van Wilgenburg

Doutorado em Farmacologia pela Universidade de Amsterdã, Holanda (1970).
Universidade de Amsterdã, Holanda.
Professor Associado da Universidade de Amsterdã, Holanda.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Aos vinte dias do mês de setembro de dois mil e dez, reuniu-se em sessão pública o Colegiado do Programa de Pós- Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas com a finalidade de apreciar a Defesa de Dissertação da Pós-graduanda Ana Tereza Cerqueira Lima, através da Comissão Julgadora composta pelos Professores Henk Van Wilgenburg, Camila A. V. Figueiredo e Roberto Paulo Correia de Araújo. O título da Dissertação apresentado foi PADRONIZAÇÃO E ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE DE MODELOS EXPERIMENTAIS DE ASMA UTILIZANDO ÁCAROS PARA O TESTE DE NOVAS DROGAS PARA O TRATAMENTO DESTA PATOLOGIA. Ao final dos trabalhos os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Prof. Dr. Henk Van Wilgenburg aprovada

Profa. Dra. Camila A. V. Figueiredo aprovada

Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo aprovada

Franqueada a palavra, como não houve quem desejasse fazer uso da mesma lavrou-se a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada por todos.

Salvador, 20 de setembro de 2010.

Prof. Dr. Henk Van Wilgenburg

Profa. Dra. Camila A. V. Figueiredo

Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo

Dedico este trabalho a meus queridos pais, Miudete Cerqueira Lima e José Elson de Lima, e a meus irmãos Helder , Fábria e Vânia.

A Deus por ter me permitido chegar até aqui.

A todos os meus familiares, que sempre me apoiaram.

A Camila, minha orientadora, que sempre me incentivou e serviu de parâmetro para mim.

AGRADECIMENTOS

Este é um momento importantíssimo na minha vida, no qual realizo um sonho que foi sendo concretizado ao longo desses quase dois anos. Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter permitido que eu realizasse esse sonho, por ter me direcionado e me dado força para superar o cansaço, as limitações, e não ter deixado, em momento algum, que eu pensasse em desistir. Agradeço à minha família pelos incentivos, à minha amada mãe Miudete Cerqueira Lima, ao meu pai José Elson de Lima e também aos meus queridos irmãos.

Agradeço a todos os meus familiares e amigos que sempre me incentivaram, direta ou indiretamente.

Agradeço a meu namorado Rogério pela paciência.

Agradeço aos colegas da FIOCRUZ-LPBI, em especial a Luciana, Virginia, Tiana, Pablo e a Doutor Lain, pelo incentivo e, principalmente, pelo aprendizado que me propiciaram.

A todos meus colegas do LAA pelo companheirismo, pelo carinho e pela colaboração.

Agradeço ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, nas pessoas da Prof^a. Márcia Piuvezam, do Prof. José Maria Barbosa Filho e do Prof. Eduardo de J. Oliveira.

Ao Prof. Momtchilo Russo e a um querido amigo que fiz na USP, Renato Barbosa.

A meus colegas de mestrado, que tornaram as aulas ainda mais prazerosas.

Ao Programa de Pós-Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, na pessoa do Prof. Roberto Paulo Correia de Araújo.

Agradeço carinhosamente à professora Neuza pela confiança, pelos ensinamentos, por ter me acompanhado e por ter aberto as portas do LAA para mim.

E, de um modo muito especial, agradeço à minha orientadora Camila, por ter me guiado não só na pesquisa, desde a iniciação científica, mas também na vida profissional que pretendo seguir, pelos incentivos, por ter acreditado em mim e, principalmente, pela compreensão.

E, por fim, agradeço à Universidade Federal da Bahia por ter permitido navegar nesse maravilhoso mundo do conhecimento.

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim; esquenta e esfria, aperta e depois afrouxa e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre e amar, no meio da tristeza. Todo caminho da gente é resvaloso, mas cair não prejudica demais. A gente levanta, a gente sobe, a gente volta.”

Guimarães Rosa

“Aprendi que devemos sempre agradecer por tudo que acontece em nossas vidas, nunca sabemos o que Deus tem pra nos dar, mas Ele conhece nossos corações, nossos medos e nossas necessidades...”

Ariane Martins

Sumário

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIATURAS , NOTAÇÕES E SIGLAS	12
LISTA DE FIGURAS	14
INTRODUÇÃO	16
<u>1- REVISÃO DE LITERATURA.....</u>	20
1.1 Caracterização das doenças alérgicas e sua epidemiologia	21
1.2 Fisiopatologia da asma	22
1.3 Produtos naturais e asma.....	24
1.4 Modelos experimentais de asma.....	28
<u>2-OBJETIVOS</u>	31
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
<u>3- METODOLOGIA 33</u>	
3.1 Animais:.....	34
3.2 Obtenção dos antígenos de ácaros	34
3.3 Preparação e padronização do extrato de <i>C. sympodialis</i> (CsE)	34
3.4 Sensibilização e desafio	36
3.5 Tratamento com o extrato CsE , alcalóides e dexametasona.....	36
3.6 Obtenção do lavado bronco alveolar (BAL).....	37
3.7 Atividade de peroxidase do BAL	37
3.8 Análise histopatológica e quantificação de inflamação.....	38
3.9 Determinação do título de IgE anti BtE.....	38
3.10 Determinação do perfil de citocinas do BAL	38
3.11 Análise estatística	39
<u>4-RESULTADOS 40</u>	
4.1 Padronização da dose de BtE para a sensibilização.....	41
4.1.1 Contagem total, diferencial de células e avaliação de peroxidase de eosinófilos (EPO) no lavado brônquico alveolar (BAL), avaliação da arquitetura pulmonar e quantificação de IgE total e específica no soro.	41
4.1.2 Produção de citocinas no lavado brônquico alveolar (BAL).....	43
4.2. Avaliação da sensibilização de camundongos A/J com antígenos de BtE e Dp..	44

4.2.1 Contagem total, diferencial de células e avaliação de peroxidase de eosinófilos (EPO) no BAL.....	44
4.2.2 Avaliação da sensibilização de camundongos A/J com antígenos de BtE e Dp: Análise histopatológica do pulmão.....	45
4.2.3 Produção de citocinas no lavado brônquico alveolar (BAL).....	47
4.3 Eficácia de CsE, TAF e Wa em modelo de alergia respiratória ao ácaro <i>Blomia tropicalis</i>	48
4.3.1 Efeito de CsE , TAF e WA sobre a contagem total e diferencial de células e avaliação de peroxidase eosinofílica (EPO) no lavado brônquico alveolar (BAL)	48
4.3.2 Efeito do tratamento de CsE , TAF e WA sobre a arquitetura e a quantificação da inflamação	49
4.3.3 – Efeito do tratamento de CsE sobre a produção IgE anti-BtE pela técnica PCA (Anafilaxia Cutânea Passiva).....	51
4.3.4 Efeito do tratamento de CsE , TAF e WA sobre a produção de citocinas no BAL	51
<u>5-DISCUSSÃO</u>	53
<u>6-CONCLUSÃO</u>	61
<u>7-REFERÊNCIAS</u>	63

CERQUEIRA-LIMA, Ana Tereza. Padronização e estudo da resposta imune de modelos experimentais de asma utilizando ácaros para o teste de novas drogas. **2010. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.**

RESUMO

A asma é uma das doenças crônicas mais prevalentes em âmbito mundial. Estudos epidemiológicos indicam que os ácaros mais frequentemente envolvidos na asma e na rinite alérgica em países tropicais e subtropicais são, respectivamente, *Blomia tropicalis* (*BtE*) e *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Dp*). Embora ácaros sejam os agentes alergizantes mais importantes, o modelo experimental de alergia, a ovalbumina (Ova), é o mais abundantemente utilizado na literatura para o estudo da asma. A planta *Cissampelos sympodialis* (*CsE*) é usada para o tratamento de algumas doenças inflamatórias, incluindo a asma. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi padronizar modelo experimental de alergia a ácaros e avaliar o potencial de *CsE* e os seus alcaloides, especialmente, warifiteína (*Wa*). Camundongos AJ foram sensibilizados com 10µg por animal (s.c.) de *BtE* ou *Dp* e tratados ou não com 400 mg/Kg de *CsE* ou 8 mg/Kg da total fração de alcaloides (TAF) ou 4 mg/Kg de *Wa* (v.o.). Foram analisados os seguintes parâmetros: (a) número de células totais no lavado bronco-alveolar (BAL); (b) contagem diferencial de células do BAL; (c) atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) no BAL; (d) os níveis séricos de IgE total por ELISA; (e) IgE anti *BtE* por PCA; (f) os níveis de IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e IFN-γ no BAL; e (g) as alterações histopatológicas no pulmão. Após a sensibilização dos animais com baixa dose *BtE* (10µg/animal), eles apresentaram vários parâmetros imunológicos aumentados, relacionados à fisiopatologia da asma. Quando foi comparada a sensibilização de camundongos com *BtE* e *Dp*, os animais sensibilizados por *BtE* produziram mais eosinófilos, EPO, IL-13 e IL-5 no BAL que os animais sensibilizados com *Dp*. O tratamento dos animais com o *CsE*, *Wa* ou TAF levou a uma redução no número de células totais e de eosinófilos no BAL. A mesma redução foi observada nos níveis de EPO no BAL. Os níveis de IL-5 e IL-13 foram também reduzidos nos animais tratados com *CsE*, enquanto os níveis de IL-10 foram significativamente aumentados no BAL dos animais tratados com *CsE*. O tratamento também reduziu a densidade de células inflamatórias do pulmão verificada mediante exame histopatológico. Sendo assim, pôde-se demonstrar, neste trabalho: que a sensibilização com baixas doses de *BtE* consegue estimular parâmetros imunológicos importantes na fisiopatogênia da asma; que a sensibilização de animais com *BtE* estimula um padrão de resposta imunológico Th2; e que o potencial de *CsE*, mais do que seus alcaloides isolados, constitui um importante agente imunomodulador na asma, podendo ser um futuro candidato a droga para compor o arsenal terapêutico dessa patologia.

Palavras-Chave: asma; *Blomia tropicalis*; *Cissampelos sympodialis*; *Dermatophagoides pteronyssinus*; produtos naturais, Warefiteína.

CERQUEIRA-LIMA, Ana Tereza. Standardization and study of immune response in experimental models of asthma using mites for testing new drugs. **2010. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.**

ABSTRACT

Asthma is a chronic disease more prevalent worldwide. Epidemiological studies indicate that mites most frequently involved in allergic rhinitis and asthma in tropical and subtropical countries are, respectively, *Blomia tropicalis* (*BtE*) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Dp*). Although mites are the most important allergenic agents, the experimental model of allergy to ovalbumin (*Ova*) is the most abundantly used in the literature for the study of asthma. The plant *Cissampelos sympodialis* (*CsE*) is used to treat some inflammatory diseases, including asthma. In this context, the objective of this study was to standardize an experimental model of allergy to mites and evaluate the potential of *CsE* and its alkaloids, especially warifteine (*Wa*) in the standardized model. To this end, mice were sensitized with 10 µg per animal (sc) of *BtE* or *Dp* and treated or not with 400 mg / kg of *CsE* or 8 mg / kg of total alkaloid fraction (TAF) or 4 mg / kg of Warifteine (*Wa*) (v.o). We analyzed the following parameters: (a) number of total cells in broncho alveolar lavage (BAL), (b) differential cell count in BAL, (c) activity of eosinophil peroxidase (EPO) in BAL, (d) serum total IgE by ELISA (e) IgE anti *BtE* by PCA, (f) levels of IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-17 and IFN-γ in BAL, and (g) histopathological changes in the lung. After sensitization of animals with low doses *BtE* (10 µg / animal) animals showed increased immune parameters related to the pathophysiology of asthma. When comparing the sensitization of mice with *BtE* and *Dp* animals sensitized by *BtE* produced more eosinophils, EPO, IL-13 and IL-5 in BAL than animals sensitized with *Dp*. For this reason, we chose the *BtE* model for evaluating the efficacy of *Cissampelos sympodialis* Eichl and its alkaloids. The treatment of animals with the *CsE*, *Wa* or TAF led to a reduction in the number of total cells and eosinophils in BAL. The same reduction was observed in the levels of EPO in BAL. The levels of IL-5 and IL-13 were also reduced in animals treated with *CsE*, while the levels of IL-10 were significantly increased in BAL from animals treated with *CsE*. Treatment also reduced the density of inflammatory cells through the lung histopathology. Thus, in this work we have shown that the effect of sensitization by low dose *BtE* can stimulate important immunological parameters related to pathogenesis of asthma; the sensitization of animals with *BtE* promotes a Th2 immune response profile; and we demonstrated the potential of *CsE*, rather than its isolated alkaloids, as an important immunomodulatory agent in asthma which lead us to hypothesized that *CsE* may be a future drug to the therapeutic arsenal of this pathology.

Key words: Asthma; *Blomia tropicalis*; *Cissampelos sympodialis*; *Dermatophagoides pteronyssinus*; natural products; warifteína.

LISTA DE ABREVIATURAS, NOTAÇÕES E SIGLAS

CsE: Extrato de *Cissampelos sympodialis*

BtE: *Blomia tropicalis*

Dp: *Dermatophagoides pteronissinus*

Wa: Warifteína

TAF: Fração de alcalóides totais

BAL: Lavado bronco alveolar

s.c.: Via subcutânea

i.n.: Via intranasal

v.o.: Via oral

HBSS: Hanks' balanced salt solution

PCA: Anafilaxia Cutânea Passiva

IL: Interleucina

HCl: Ácido clorídrico

NaOH: Hidróxido de sódio

MeOH: Metanol

NMR: Ressonância magnética nuclear

RPM: Rotações por minuto

STAT6: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6

NF- κ B: Fator nuclear potencializador de células B ativadas

I κ B α : Fator nuclear inibidor de células B

TGF- β : Fator β de transformação do crescimento tumoral

IFN- γ : Interferon gama

CD4: Grupamento de diferenciação de linfócito T auxiliar

CD8: Grupamento de diferenciação de linfócito T citotóxico

CD25: Grupamento de diferenciação de linfócito T regulatório

HRB: Hiper reatividade brônquica

EPO: Peroxidase eosinofílica

GATA-3: Fator de transcrição

NFATc: Fator nuclear de células T ativadas

C-maf: Proteína proto oncogênica

GC: Glicocorticóide

AP-1: Proteína ativadora-1

Al(OH)₃: Hidróxido de alumínio

Th2: Linfócito T auxiliar do tipo 2

Th1: Linfócito T auxiliar do tipo 1

OVA: Ovalbumina

PBS: Solução fosfato tamponada bisódica

IgE: Imunoglobulina tipo E

MHC II: Complexo principal de histocompatibilidade classe 2

ELISA: Ensaio imunoenzimático

Der f 2: Proteína recombinante do ácaro *D. pteronissinus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cromatograma de extrato de <i>Cissampelos sympodialis</i>	35
Figura 2: Desenho experimental do protocolo de sensibilização.....	36
Figura 3: Desenho experimental do protocolo de tratamento.....	37
Figura 4: Padronização da dose de <i>BtE</i> para a sensibilização: Contagem total, diferencial de células e avaliação de EPO no BAL , análise histopatológica do pulmão e produção de IgE total e específica para <i>BtE</i>	40
Figura 5: Padronização da dose de <i>BtE</i> para sensibilização: Produção de citocinas no BAL.....	41
Figura 6: Avaliação da sensibilização de camundongos A/J com antígenos de <i>BtE</i> e <i>Dp</i> : Contagem total , diferencial de células e avaliação de EPO no BAL.....	43
Figura 7: Avaliação da sensibilização de camundongos A/J com antígenos de <i>BtE</i> e <i>Dp</i> : Análise histopatológica do pulmão.....	44
Figura 8: Avaliação da sensibilização de camundongos A/J com antígenos de <i>BtE</i> e <i>Dp</i> : Produção de IgE total no soro.....	44
Figura 9: Avaliação da sensibilização de camundongos A/J com antígenos de <i>BtE</i> e <i>Dp</i> : Produção de citocinas no BAL.....	45
Figura 10: Eficácia de <i>CsE</i> , TAF e <i>Wa</i> em modelo de alergia respiratória ao ácaro <i>Blomia tropicalis</i> : Efeito de <i>CsE</i> , TAF e <i>WA</i> sobre a Contagem total e diferencial de células e avaliação de EPO no BAL.....	47
Figura 11: Eficácia de <i>CsE</i> , TAF e <i>Wa</i> em modelo de alergia respiratória ao ácaro <i>Blomia tropicalis</i> : Efeito do tratamento de <i>CsE</i> , TAF e <i>WA</i> sobre a arquitetura e a quantificação da inflamação.....	49

Figura 12: Eficácia de *CsE*, TAF e Wa em modelo de alergia respiratória ao ácaro *Blomia tropicalis*: Efeito do tratamento de *CsE* sobre a produção IgE anti *BtE* pela técnica PCA (Anafilaxia Cutânea Passiva).....50

Figura 13: Eficácia de *CsE*, TAF e Wa em modelo de alergia respiratória ao ácaro *Blomia tropicalis*: Efeito do tratamento de *CsE* , TAF e WA sobre a produção de citocinas no BAL.....51

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Nos últimos quarenta anos, observou-se um aumento substancial da prevalência de doenças alérgicas, o que pode estar relacionado, pelo menos em parte, ao aumento da prevalência da asma. A asma tem sido considerada um problema mundial e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 300 milhões de pessoas em todo o mundo sofram dessa patologia. A mortalidade acompanhou também o aumento da prevalência. No Brasil, a situação epidemiológica da asma não é diferente da mundial, pois o país se encontra, no *ranking*, no 8º lugar na prevalência dessa doença. Na faixa dos adultos jovens, de 20 a 29 anos de idade, ela se tornou, em poucos anos, a primeira causa de internação. Porto Alegre, Recife e Salvador são as cidades com maior registro de pacientes com asma.

Asma é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por hiperreatividade brônquica (HRB) das vias aéreas inferiores e por limitação variável ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com tratamento, manifestando-se clinicamente por episódios recorrentes de sibilância, dispneia, aperto no peito e tosse. A asma começa a ser desenvolvida na fase intrauterina, e, além disso, tem se verificado a presença de genes polimórficos. Sendo assim, fatores genéticos e ambientais, durante o processo de desenvolvimento, contribuem para a susceptibilidade das vias aéreas a poluentes ambientais e para a sensibilização por aeroalérgenos.

Apesar de intensamente estudadas, as bases da asma ainda não estão completamente compreendidas. O processo inflamatório característico é complexo e envolve múltiplas células e mediadores. A programação fetal intrauterina, determinada pela mãe, e a falta relativa de infecções na primeira infância poderiam criar um ambiente biológico no qual células T indiferenciadas (T helper - Th) no neonato seriam direcionadas para o subtipo Th2. O perfil de resposta Th2 é iniciado, entre outros fatores, pela estimulação de células CD4+ a produzir IL-4 (interleucina 4) e essa, por sua vez, orchestra as células e moléculas necessárias para o desenvolvimento da inflamação brônquica característica da asma. A polarização Th2 estimula as respostas mediadas por anticorpos, ativa mastócitos, promove a eosinofilia tecidual e a hiperreatividade brônquica. Todos esses eventos associados às citocinas (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13) possuem papel importante na doença. A IL-5 é responsável pelo crescimento, pela diferenciação e ativação de eosinófilos, células de grande importância nas alergias. A IL-13 tem um papel importante na HRB e na produção IgE. A IL-9 tem seus efeitos mediados pela indução

da IL-13, sugerindo que essa última seja o caminho final das respostas inflamatórias do tipo Th2.

No entanto, nos últimos anos, o paradigma Th1/Th2 é adequado para descrever a doença alérgica das vias aéreas, mas não explica a totalidade e a complexidade das alterações imunes observadas na asma. As mudanças ambientais devem ter modificado os sistemas regulatórios, de modo que eles previnam a expressão exagerada de respostas Th1 e Th2 inadequadas em indivíduos predispostos. Com base nessa hipótese, o papel da IL-10 vem sendo estudado em detalhes. Apesar de ser inicialmente classificada como uma citocina Th2, sabe-se, hoje, que a IL-10 é produzida por uma ampla gama de tipos celulares.

Modelos experimentais são particularmente interessantes para se estudarem mecanismos relacionados ao processo saúde–doença, bem como para se estudar o mecanismo de ação de fármacos em um nível de detalhe que, com amostras humanas, não é possível, considerando especialmente questões éticas. Os ácaros são os agentes biológicos que mais causam doenças alérgicas, em especial a asma. Estudos epidemiológicos indicam que os ácaros mais prevalentes envolvidos na asma e na rinite alérgica em países tropicais e subtropicais do mundo, são, respectivamente, *Blomia tropicalis* (*BtE*) e *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Dp*). Muitos estudos têm mostrado que, apesar de uma alta homologia, esses dois ácaros estimulam respostas imunológicas diferentes.

No entanto, a maioria dos estudos relacionados aos mecanismos da asma utiliza o modelo experimental de asma a ovalbumina (OVA), uma proteína que, em humanos, não causa reação alguma do tipo asmática por via inalatória. Nesse sentido, a necessidade de um modelo experimental padronizado, que utilize reais agentes alergizantes, nos estimulou a padronizar um modelo de alergia respiratória a ácaros, bem como a investigar os mecanismos subjacentes à resposta imunológica desencadeada entre *BtE* e *Dp*, visto que alguns estudos mostram que ácaros diferentes podem estimular respostas imunológicas diferenciadas. Recentemente, um estudo demonstrou o efeito da sensibilização de diferentes linhagens de camundongos com *BtE*. Os resultados mostraram que a linhagem que melhor respondeu à sensibilização por esse acaro foi a A/J, a qual produziu mais elementos caracterizadores da asma. O tratamento da asma atualmente disponível está atrelado a grandes taxas de falhas e repleto de efeitos colaterais. Quatro das cinco classes de drogas utilizadas para o tratamento da asma têm origem nas plantas, mas, apesar disso, a classe de drogas mais utilizada para o tratamento da asma são os glicocorticoides. Essa classe de

medicamentos tem seu mecanismo baseado em sua ação anti-inflamatória inespecífica. No entanto, os efeitos colaterais dos glicocorticoides são, muitas vezes, superiores aos benefícios do tratamento. Nesse contexto, há a necessidade de novas alternativas terapêuticas. A planta *Cissampelos sympodialis* (*CsE*) EICHL (Menispermaceae) é uma espécie típica do Nordeste e do Sudoeste do Brasil e é utilizada etnofarmacologicamente para o tratamento de doenças inflamatórias, tais como a asma. Estudos têm mostrado o perfil imunomodulador de *CsE*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em especial em modelo experimental de asma que utiliza a OVA.

***REVISÃO DE
LITERATURA***

1- REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Caracterização das doenças alérgicas e sua epidemiologia

Nos últimos quarenta anos, observou-se um aumento substancial da prevalência de doenças alérgicas, o que pode estar, pelo menos em parte, relacionado ao aumento da prevalência da asma (MORAES et al ., 2001).

A asma tem sido considerada um problema mundial e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 300 milhões de pessoas em todo o mundo sejam acometidas por essa patologia (OMS ,2007). Em 2005, nos EUA, dados do NCHS (*National Center for Health Statistics E-Stats*) – *Division of Data Services do Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* estimavam em 22,2 milhões (7,7% da população) o número de pacientes com asma naquele país, o que representa 15,7 milhões de adultos (7,2% dos adultos) e 6,5 milhões de crianças (8,9% das crianças). Desse modo, ocorreram mais de 1,8 milhões de visitas a serviços de emergência em 2004 nos Estados Unidos (U.S. Department of Health and Human Services).

No Brasil, como já foi mencionado, a situação epidemiológica da asma não é diferente da mundial, pois o país se encontra, no *ranking*, no 8º lugar em prevalência dessa doença (ISAAC, 1998 e FIORI , FRISTCHER ,2001). Segundo o DATASUS, em 2005, a média de internações anuais foi de 350.000 para a asma, que constituiu a terceira ou quarta causa de hospitalizações pelo SUS (2,3% do total), conforme o grupo etário considerado. Na faixa dos adultos jovens, de 20 a 29 nos de idade, tornou-se até, em alguns anos, a primeira causa de internação. Porto Alegre, Recife e Salvador são as cidades com maior registro de pacientes com asma (OMS, 2005).

Devido ao aumento de sua frequência e severidade, a asma acarreta impactos socioeconômicos que envolvem custos diretos (hospitalizações e medicamentos) e indiretos (dia de trabalho perdido e morte prematura), sendo que, em 2005, morreram no mundo 255.000 pessoas por causa dessa patologia (OMS, 2007,.KHALED et al., 2001; BOUSQUET et al., 2005).

Caracterizada por hiperreatividade brônquica (HRB) das vias aéreas inferiores e por limitação variável de fluxo aéreo, a asma é uma doença inflamatória que se manifesta clinicamente por episódios recorrentes de sibilância, dispneia, aperto no peito e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao despertar. Resulta de uma interação entre genética, exposição ambiental e outros fatores específicos, como atopia, sexo, prematuridade, infecções respiratórias, fumaça de tabaco, os quais levam ao

desenvolvimento e à manutenção dos sintomas (SOLÉ et al., 1998 ; COOKSON, 1999 ; BUSSE et al., 2001; KUMAR ,2001).

1.2 Fisiopatologia da asma

Há indícios de que a tendência ao desenvolvimento da asma começa na fase intrauterina (WARNER et al., 1998). Segundo estudos de coorte, a predisposição à asma é, em grande parte, determinada durante o desenvolvimento fetal e nos primeiros três a cinco anos de vida (BRITO et al., 2010). Fatores genéticos e ambientais durante esse processo de desenvolvimento contribuem para a susceptibilidade das vias aéreas a poluentes ambientais e à sensibilização por aeroalérgenos (MARTINEZ, 1999). Estudos indicam que há vários genes polimórficos presentes em pacientes asmáticos, assim como nos mecanismos que fazem parte dessa patologia, a exemplo da resposta broncodilatadora. A descoberta desses genes polimórficos tem sido de muita importância para a farmacoterapia da asma (WARNER et al., 1994; LUGOGO & KRAFT ,2006).

A asma é uma doença cujas bases ainda não estão completamente compreendidas. O processo inflamatório característico é complexo e envolve múltiplas células e mediadores. Como resultado desse quadro inflamatório, as vias aéreas são hiper-reativas e contraem-se facilmente em resposta a uma ampla gama de estímulos. Essa alteração pode causar tosse, sibilos, dispneia, espirros e opressão torácica. É caracterizada pela presença de células inflamatórias nas vias aéreas, exsudação de plasma, edema, hipertrofia da musculatura lisa peribrônquica, tampões mucosos e desnudamento do epitélio brônquico (HOWARTH, 1997).

A programação fetal intrauterina determinada pela mãe e a falta relativa de infecções na primeira infância poderiam criar um ambiente biológico no qual células T indiferenciadas (T helper - Th) no neonato seriam direcionadas para o subtipo Th2. Os mecanismos de diferenciação não estão totalmente esclarecidos, mas são modulados por sinalização originada no microambiente local. O perfil de resposta Th2 é iniciado, entre outros fatores, pela estimulação de células CD4+ a produzirem IL-4 (interleucina 4), a qual, por sua vez, orchestra as células e moléculas necessárias para o desenvolvimento da inflamação brônquica característica da asma (WARNER et al., 1998). Nesse complexo mecanismo de diferenciação, estão envolvidas a transdução de sinal mediada pelo STAT-6 e a ativação de diversos fatores de transcrição (GATA-3), fator nuclear de células T ativadas-c (NFATc), e proteína proto oncogênica (c-maf). A polarização Th2 estimula as respostas mediadas por anticorpos, ativa mastócitos, promove a eosinofilia

tecidual e a hiper-reatividade brônquica. Todos esses eventos são associados às citocinas (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13), que possuem papel importante na doença (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Dentre todas essas citocinas de padrão Th2, destaca-se a interleucina 4 (IL-4), que é produzida pelos linfócitos CD4⁺ a partir de estímulos específicos, como os antígenos que são apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade classe 2 (MHC II); como exemplos desses antígenos, temos moléculas derivadas de ácaros. Em indivíduos sensíveis a esses agentes alergênicos, a apresentação dessas moléculas a células CD4⁺ provoca uma reação inflamatória exacerbada nas vias aéreas, estimulando os eventos característicos da asma (PIUVEZAM et al., 1999; SONG et al., 2002; JOHNSON et al., 2002).

A IL-13, produto de um gene localizado no cromossomo 5 no loco q31, local repetidamente implicado nos estudos genéticos da asma, é um potente indutor da resposta inflamatória dos eosinófilos, mastócitos e linfócitos, bem como da fibrose das vias aéreas, da metaplasia de muco, e da hiper-reatividade brônquica (HRB) (MARTINEZ, 1999; AKIHO et al., 2002; HERSHEY, 2003; KIBE et al., 2003).

A IL-5 é responsável pelo crescimento, pela diferenciação e ativação de eosinófilos, células de grande importância nas alergias. Trabalhos mostraram que a IL-5 atua na HRB e na inflamação (HAMELMANN et al., 1999; BOUSQUET et al., 2001). Por outro lado, alguns trabalhos evidenciaram que a HRB induzida por antígenos pode se desenvolver independentemente de IL-5 (CORRY et al., 1996; PROUST et al., 2003).

A IL-9 tem seus efeitos mediados pela indução da IL-13, sugerindo que essa última seja o caminho final das respostas inflamatórias do tipo Th2. A secreção de citocinas Th2 nas vias aéreas pode promover um padrão inflamatório eosinofílico e mastocitário, bem como mudanças estruturais típicas do fenótipo asmático.

Os eventos inflamatórios nas vias aéreas asmáticas são dinâmicos, pois há participação de células locais no processo inflamatório da asma (HOLGATE et al., 2003). Atualmente, a crescente compreensão da multiplicidade e da superposição das citocinas envolvidas na patogenia da asma vem trazendo à discussão o real valor do paradigma Th1/Th2 (JENNELMAN et al., 2001). Assim, o paradigma Th1/Th2 é adequado para descrever doença alérgica das vias aéreas, mas não explica a totalidade e a complexidade das alterações imunes observadas na asma. A “hipótese da higiene”, que associa o crescimento das doenças Th2, tais como a asma, à “limpeza” ambiental (redução da exposição a moléculas microbianas no ambiente), com consequente

diminuição dos potentes estímulos pró-Th1 necessários para a maturação imune, não consegue explicar a observação paradoxal de que a incidência de doenças Th1 (como diabetes tipo 1) também aumentou no mesmo período. Dessa forma, uma nova teoria vem surgindo para incorporar o conhecimento recente. Segundo essa teoria, as mudanças ambientais devem ter modificado os sistemas regulatórios de modo que eles previnam expressão exagerada de respostas Th1 e Th2 inadequadas em indivíduos predispostos (PRESCOTT et al., 2003). Baseado nessa hipótese, o papel da IL-10 vem sendo estudado em detalhes. Apesar de ser inicialmente classificada como uma citocina Th2, sabe-se, hoje, que a IL-10 é produzida por uma ampla gama de tipos celulares: células dendríticas, monócitos, macrófagos, células T (CD4+, CD8+ e NK; linfócitos T regulatórios CD4+ CD25+), neutrófilos e células epiteliais (KOULIS et al., 2000). Ela tem um papel importante de modular as respostas imunes exageradas em todo o sistema imune, inibindo a ativação de células T, a produção de IgE, o recrutamento de eosinófilos e muitos outros aspectos da inflamação alérgica (UMETSU DT, DE KRUYFF RH, 1999). Apesar do exposto acima, provavelmente nenhuma das teorias atuais é capaz de explicar totalmente os mecanismos envolvidos, mas elas vão sendo modificadas à medida que novos conhecimentos são agregados. Indiscutivelmente, o pulmão de um asmático é estrutural e funcionalmente diferente. Como resultado da interação entre fatores genéticos, componentes celulares com comportamento diverso do normal e modulação ambiental, mecanismos imunes anormais, modulados por numerosas citocinas, resultam nas alterações e disfunções observadas na asma (CAMPOS et al., 2007).

1.3 Produtos naturais e asma

A utilização de plantas medicinais como prática tradicional ainda existe entre os povos de todo o mundo, sendo mais evidente nos países em desenvolvimento, onde a maior parte da população pobre não tem acesso aos medicamentos da farmácia (CARRICONDE, 2002). Na primeira metade do século XIX, cerca de 80% dos remédios eram originados de plantas. Mesmo depois da Revolução Industrial e do grande domínio dos medicamentos sintéticos, pelo menos 25% dos medicamentos encontrados no Oriente são de origem vegetal (GILANI; RAHMAN, 2005). O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, bastante escasso nos países desenvolvidos, tem atualmente um valor econômico inestimável em diversas áreas.

Porém é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos que reside sua maior potencialidade (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; CALIXTO, 2005).

Historicamente, a medicina natural é uma importante fonte de fármacos para o tratamento da asma. Quatro das cinco classes de drogas atualmente utilizadas para esse fim (agonistas β 2, anticolinérgicos, metilxantinas e cromonas) são originadas de plantas (BARBOZA-FILHO et al., 2006; BEZZERA-SANTOS et al., 2006 ; COSTA et al., 2008).

Apesar do exposto, a classe de medicamentos mais utilizados para o tratamento da asma são os glicocorticoides (GC), apesar de seus marcantes efeitos adversos. Os glicocorticoides são medicamentos amplamente utilizados pelos seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores (PATRÍCIO et al., 2006). Dentre esses medicamentos, podem ser citados Hidrocortisona, Betametasona, Cortisona, Prednisona, Metilprednisona e Dexametasona (BUTTGEREIT et al., 1999). O mecanismo de ação dessa classe de medicamentos é baseado em sua ação sobre o DNA na modulação da transcrição gênica. Os glicocorticoides ativam a proteína ativadora-1 (AP-1), um fator de transcrição composto de dímeros da família de proteínas Jun e Fos (pode haver interação com outros fatores nucleares, como, por exemplo, Kappa B). Isso leva, mais frequentemente, à inibição da transcrição de vários genes envolvidos nas respostas inflamatórias e (ou) imunes, como citocinas, sintetase do óxido nítrico, ciclooxigenase, fosfolipase A2, elastase, colagenase, ativador de plasminogênio, compreendendo, dessa forma, uma ação inespecífica. Esse mecanismo de ação foi observado por meio dos efeitos *in vitro* na respiração, na síntese de proteínas e na ação da Na^+/K^+ ATPase e Ca^{2+} ATPase em tímócitos (BAMBERGER et al 1996; BUTTGEREIT et al, 1999).

A partir dessas vias, os GC desempenham sua ação, podendo ser tanto anti-inflamatória quanto imunossupressora, promovendo apoptose das células linfoides, inibindo a síntese de determinadas citocinas (tais como IL-2), modulando direta e indiretamente a função das células B, inibindo a proliferação e diferenciação de monócitos e a atividade de macrófagos, inibindo o movimento de células e fluidos a partir do compartimento intravascular, além da inibição da ação da histamina, da síntese das prostaglandinas e da ação dos ativadores do plasminogênio. Os GC interferem na circulação de células imunes, diminuindo o número de linfócitos periféricos, principalmente linfócitos T, e inibem o acúmulo de neutrófilos no local da inflamação (BAXTER, 1990; BAXTER, 1992; BAMBERGER et al., 1996; BARNES, 1998).

Os efeitos colaterais de uma mesma dose de corticosteroide são heterogêneos entre os indivíduos de uma população, porém a quantidade de reações adversas e sua intensidade são o bastante para que essa classe de medicamento seja motivo de muito desconforto entre as pessoas que a usam. A utilização prolongada dos corticosteroides leva à síndrome de *Cushing* iatrogênica, caracterizada pela desfiguração cosmética (*moon face*, giba dorsal, estrias), ganho de peso com acúmulo de gordura centripetamente, redução da tolerância a carboidratos, fragilidade vascular, miopatia e fraqueza muscular, hipertensão arterial, osteoporose, maior suscetibilidade a infecções (imunossupressão), alterações psiquiátricas e outros efeitos (FAIÇAL ; UEHARA ,1998).

A maior diferença dessa síndrome exógena, em relação ao hipercortisolismo endógeno, constitui na maior ação mineralocorticoide existente nesse último, resultando em mais hipertensão arterial e, ocasionalmente, hipocalemia e hirsutismo e (ou) virilização, principalmente quando é secundário a tumores adrenais. Além disso, alguns efeitos menos comuns, como hipertensão intracraniana benigna, necrose avascular óssea e glaucoma teriam maior relação com a síndrome de *Cushing* iatrogênica do que com o hipercortisolismo endógeno (FAIÇAL ; UEHARA ,1998).

Apesar dos benefícios inegáveis de GC para o tratamento de doenças inflamatórias, a exemplo da asma, os efeitos colaterais são, por sua vez, bastante intensos, principalmente, quando o uso desses medicamentos é por via oral ou seu uso é crônico, como acontece em muitos pacientes com asma e outras alergias. Sendo assim, a busca por novos fármacos tem sido de crucial importância, na tentativa de se encontrarem alternativas para o GC que tenham os mesmos benefícios com relação à sua capacidade anti-inflamatória e que apresentem menos efeitos colaterais.

As pesquisas com plantas medicinais têm aumentando em todo o mundo, como reflexo da sua importância na história da medicina da humanidade. Além disso, o uso de terapias baseadas em produtos mais naturais tem sido a escolha de uma parcela significativa de indivíduos (MACIEL et al .,2002).

Muitos medicamentos que hoje já fazem parte do cenário da indústria farmacêutica têm sua origem nas plantas, a exemplo da forskolina, obtida de *Coleus barbatus*, que apresenta promissores efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores (DE SOUZA, 1993), a artemisinina, presente em *Artemisia annua*, que exerce potente atividade antimalárica (KAMCHONWONGPAISON; MESHNICK, 1996) e o diterpeno anticancerígeno taxol, isolado de plantas do gênero *Taxus*, que, após sua síntese em escala industrial, já se encontra disponível no mercado farmacêutico, constituindo-se

numa grande esperança para pessoas portadoras de câncer nos ovários e pulmões (KINGSTON, 1991; HORWITZ, 1994; CORRÊA, 1995; FITOTERAPIA, 1995).

Nesse contexto, a planta *Cissampelos sympodialis* (*CsE*) EICHL (Menispermaceae) é uma espécie típica do nordeste e sudoeste do Brasil e é utilizada etnofarmacologicamente para o tratamento de doenças inflamatórias, tais como a asma (ALMEIDA et al., 1998 ; MELO et al., 2003). Conhecida popularmente por “milona”, “abuteira”, “jarrinha” ou “orelha-de-onça”, é uma planta trepadeira, muito comum em locais úmidos, e facilmente encontrada do Ceará a Minas Gerais (PORTO; BASÍLIO; AGRA, 2008).

Trabalhos com a planta *CsE* têm sido publicados na tentativa de justificar seu uso popular como droga anti-inflamatória. O primeiro trabalho publicado foi em 1995 por Thomas e colaboradores. Desde então, o número de publicações aumentou e todas têm mostrado um real potencial dessa planta como imunomoduladora. Estudos realizados em modelo experimental de asma, a ovalbumina (OVA), mostraram que o extrato hidroalcoólico da planta *Cissampelos sympodialis* (*CsE*) possui um efeito benéfico para o tratamento da asma. Podem ser ainda citados os trabalhos de Bezerra-Santos e colaboradores (2004) demonstrando que o tratamento por via oral com o extrato das folhas de *CsE* diminuiu os níveis de IgE total e específica e induziu a produção de citocinas do tipo Th1 em camundongos sensibilizados com ovoalbumina, e a administração oral do extrato aumentou a produção *in vitro* tanto de IFN- γ quanto de IL-10 pelas células estimuladas com Con-A.

Bezerra-Santos, Peçanha e Piuvezam (2005) demonstraram, no mesmo modelo de asma, a ovalbumina (OVA), que o extrato de *CsE* aplicado intraperitonealmente inibiu a reação de choque anafilático, a produção de IgE e a resposta proliferativa.

Ensaio com os produtos isolados dessa planta, a exemplo do seu principal alcaloide, a warifteína (Wa), mostraram que ele possui, assim como o *CsE*, efeitos imunomoduladores (BARBOSA-FILHO, 2001; COSTA et al., 2008).

Em modelo experimental de asma, camundongos BALB/c foram tratados com warifteína uma hora antes da sensibilização com OVA e, assim como no estudo de Bezerra-Santos e colaboradores (2004), tiveram o edema de pata reduzido com diminuição dos níveis séricos de IgE específica para OVA. A Wa também reduziu a morte de camundongos por reação de choque anafilático dependente de IgE, 30 minutos depois da sensibilização intravenosa com OVA. A resposta proliferativa de células T foi avaliada e notou-se que células do baço de animais sensibilizados com ovalbumina e

tratados com warifteína não demonstraram proliferação, quando comparadas com as células de animais não-tratados.

O perfil imunomodulador de *CsE* pode ser confirmado em ensaios e avaliações *in vitro* e *in vivo*, os quais mostraram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *CsE* aumentou a produção de interleucina 10 (IL-10) (ALEXANDRE- MOREIRA et al., 2003 e PIUVEZAM et al., 1999).

Apesar dos importantes trabalhos que demonstram o potencial da *CsE* como antiasmática, faz-se necessária uma avaliação em um modelo experimental de asma que mimetize a sensibilização em humanos.

1.4 Modelos experimentais de asma

O uso de modelos animais para estudar a fisiologia dos seres humanos e a fisiopatologia das doenças ocorre desde 1865, quando Claude Bernard lançou os princípios do uso de animais como modelo de estudo e transposição para a fisiologia humana (BERNARD, 1865). Seu trabalho, *Introdução ao Estudo da Medicina Experimental*, procurou estabelecer as regras e os princípios para o estudo experimental da medicina (FAGUNDES; TAHA, 2004). O modelo animal é usado virtualmente em todos os campos da pesquisa biológica nos dias de hoje (RUSSEL, 2001). A relação entre os humanos e os animais de outras espécies ganhou contornos mais definidos, e a indução dos resultados do animal para a espécie humana tem critérios claros e objetivos a serem preenchidos (FAGUNDES; TAHA, 2004). Esses modelos são particularmente interessantes para se estudarem os mecanismos relacionados ao processo saúde–doença, bem como para se avaliar o mecanismo de ação de fármacos em um nível de detalhes que, com amostras humanas, não é possível, considerando-se, especialmente, questões éticas.

Muitos agentes físicos e químicos podem desencadear respostas alérgicas. Os ácaros são os agentes biológicos que mais causam doenças alérgicas, em especial a asma. Estudos epidemiológicos indicam que os ácaros mais prevalentes envolvidos na asma e na rinite alérgica, em países tropicais e subtropicais do mundo, são, respectivamente, *Blomia tropicalis* (*BtE*) e *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Dp*) (ARLIAN et al., 1993; CHEONG et al., 2003; BAQUEIRO et al., 2006; CARVALHO et al., 2004 e CHUA et al., 2007).

Acredita-se que esses ácaros podem ser responsáveis pelo aumento das reações IgE mediadas em pacientes sensibilizados, possivelmente devido à sua alta prevalência e associação filogenética (SATO et al., 2002).

Estudos têm mostrado que *B. tropicalis* tem uma baixa ou moderada reatividade cruzada a IgE com as espécies de *Dermatophagoides ssp*, mesmo compartilhando entre 30 a 40% de homologia. Nessa primeira espécie, que pertence à família das Glycyphagidae, estão presentes os maiores e mais importantes alérgenos responsáveis pela sensibilização de pacientes, a exemplo do Blot 5 (primeiro a ser descoberto e mais estudado antígeno de *BtE*), Blot 1 (que possui modesta alergenicidade), Blot 3, Blot 4, Blot 6, Blot 10, Blot 11, Blot 12, Blot 13 e, mais recentemente, Blot 19 (CARABALLO et al., 1994; CHEW et al., 1999; CHEONG et al., 2003; BAQUEIRO et al., 2006; CHUA et al., 2007).

Apesar de os dados epidemiológicos apontarem para altas prevalências desses ácaros envolvidos em doenças alérgicas respiratórias, pouco se sabe a respeito da fisiopatogênia alérgica nos indivíduos sensibilizados por eles. Mesmo sabendo que o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas respiratórias é a exposição a ácaros, o modelo experimental mais utilizado e consolidado na literatura para o estudo da asma é modelo experimental de ovalbumina (OVA) (PLATTS-MILLS et al., 1997; CHIBA et al., 2009). A ovalbumina é uma macromolécula, caracterizada por uma resposta imune exclusivamente Th2. Encontrada no ovo da galinha, ela causa, frequentemente, sintomas de hipersensibilidade em alguns indivíduos. No entanto, como indutora de inflamação de vias aéreas pulmonares em seres humanos, está longe de ser um evento comum (LANGELAND, 1983; HOLEN et al., 1996; BAPTISTA, 2004). Como foi descrito anteriormente, a resposta Th2 na asma é caracterizada pela produção de citocinas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13) e também pela presença de células inflamatórias, como os eosinófilos, mecanismos que foram estudados extensivamente em seres humanos. A eosinofilia pulmonar tem um papel central na asma, pois a migração dessas células para os sítios de inflamação envolve adesão a receptores e ativação de fatores como citocinas, quimiocinas e quimioatraentes (GONZALO et al., 1996).

Estudos realizados com o modelo experimental de asma, a OVA, mostram que a sensibilização por esse antígeno estimula a resposta Th2, com a participação de citocinas e células inflamatórias, a exemplo dos eosinófilos. No entanto, muitos outros trabalhos têm mostrado que a asma é uma doença de manifestações imunológicas

heterogêneas, a exemplo da participação da resposta imunológica, além de Th2, Th17 e T regulatória (SHARKHUU et al., 2006).

Nesse sentido, a necessidade de um modelo experimental padronizado, que utilize reais agentes alergizantes, estimulou a realização deste trabalho, que busca padronizar um modelo de alergia respiratória a ácaros, bem como investigar os mecanismos subjacentes à resposta imunológica desencadeada entre *BtE* e *Dp*, visto que alguns estudos mostram que ácaros diferentes podem estimular respostas imunológicas diferenciadas (SATO et al., 2002).

Recentemente, dados do nosso grupo demonstraram o efeito da sensibilização de diferentes linhagens de camundongos com *BtE*. Os resultados mostram que a linhagem que melhor respondeu à sensibilização por esse acaro foi a A/J, por produzir mais elementos caracterizadores da asma. Além disso, nosso grupo e outros também demonstraram que a sensibilização pelo extrato de *BtE* estimula mais intensamente a produção de eosinófilos, um importante marcador da inflamação nas vias aéreas do pulmão, do que a sensibilização por OVA (ROTHENBERG, 1998; BAQUEIRO, 2007). Existem evidências de que os alérgenos de *BtE* são diferentes e que existe baixa reação cruzada com os alérgenos das espécies de *Dermatophagoides* (CHEW et al., 1999). A sensibilização dos agentes alergênicos de *BtE* tem mostrado algumas peculiaridades, como a presença de algumas subclasses de IgG não comumente presentes na sensibilização por outros ácaros, e a presença de diferentes populações celulares no lavado brônquico alveolar, característica que parece ser a principal (ARRUDA et al., 1997; MORI et al., 1999; PUERTA et al., 1999; SATO et al., 2002, 2004; BAQUEIRO et al., 2010). No presente trabalho, foi comparada a sensibilização de animais A/J com *BtE* e *Dp*, e foi avaliado o efeito da sensibilização de animais usando baixas doses do antígeno de *BtE* e a capacidade imunomodulatória do extrato hidroalcoólico de *Cissampelos sympodialis* Eichl (*CsE*), da sua fração de alcaloides totais (TAF) e do seu alcaloide bisbenzilisquinolínico warifteína, em modelo de alergia respiratória ao ácaro *Blomia tropicalis* (*BtE*).

OBJETIVOS

2-OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Padronizar um modelo experimental de asma com utilização de ácaros, para avaliar o efeito de *CsE*, alcaloides totais e Warefiteína, no que diz respeito a seu efeito imunomodulador e para o teste de novas drogas.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 – Padronizar o modelo experimental de alergia respiratória utilizando baixas doses do antígeno de *BtE*.

2.2.2 – Estudar comparativamente os parâmetros imunológicos a partir da sensibilização de animais com antígeno de *BtE* e *Dp*.

2.2.3 – Avaliar os efeitos anti-inflamatórios de *CsE* e seus produtos no modelo experimental padronizado.

2.2.4 – Avaliar os efeitos imunomoduladores de *CsE* e seus produtos no modelo experimental padronizado.

METODOLOGIA

3- METODOLOGIA

3.1 Animais:

Foram utilizados camundongos da linhagem A/J (25 -30g) e ratos Wistar (250-300g), tendo cada grupo entre 5 e 6 animais obtidos do Biotério da Fundação Oswaldo Cruz, Bahia, Brasil. Os animais foram mantidos com livre acesso à comida e à água. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, Brasil (Protocolo 02/09).

3.2 Obtenção dos antígenos de ácaros

Os ácaros foram cultivados em estufa BOD e, após processo de expansão, foram lisados em solução salina 0,15M de tampão fosfato, pH 7.4(PBS), com auxílio de um misturador (51BL30; Waring comercial, Torrington, CO, E.U.A). Após a centrifugação com éter para a remoção de lipídios (4500 RPM / 10min), o teor de proteína foi determinado pelo método de Lowry (Lowry et al 1951) e, em seguida, o extrato foi armazenado a -70 ° C até o uso. A quantidade de *BtE* utilizada nos experimentos foi padronizada, medindo-se a concentração de Blo t 5 no *BtE* com auxílio de um kit comercialmente disponível pela técnica de ELISA de captura (INDOOR Biotecnologias, Charlottesville, VI, E.U.A.). Todos os lotes utilizados continham de 30 a 40 ng desse alérgeno por mg de proteína. O antígeno de *D. pteronyssinus* foi obtido comercialmente da GREER.

3.3 Preparação e padronização do extrato de *C. sympodialis* (*CsE*)

O extrato de *CsE* foi obtido com o grupo de colaboradores deste trabalho, no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Resumidamente, as folhas cultivadas no horto de plantas medicinais da UFPB foram identificadas (voucher modelo Agra 1456) e secas a 50 ° C e pulverizadas. O pó foi extraído com etanol a 70% em água, a 70° C, durante 5 dias. O extrato seco foi dissolvido em água filtrada. Volumes conhecidos foram utilizados para determinar a concentração final dos componentes solúveis em água. A produção desses componentes tem demonstrado ser de 22% em média (Piuvezan et al 1999). A warifteína (Wa) foi isolada mediante um procedimento padrão de extração ácido-base. A figura 1 mostra o

cromatograma do extrato hidroalcoólico (*CsE*) (Figura 1), uma solução de warifteína (Wa) (Figura 1b), e uma solução da fração alcaloide total (Figura 1c), demonstrando que a separação da warifteína foi conseguida sem interferentes do extrato, no mesmo tempo de retenção do alcaloide (Figura 1). Esse método cromatográfico foi utilizado para quantificação de Wa no extrato etanólico e em todos os experimentos subsequentes, conforme é descrito por Cerqueira-Lima e cols. 2010.

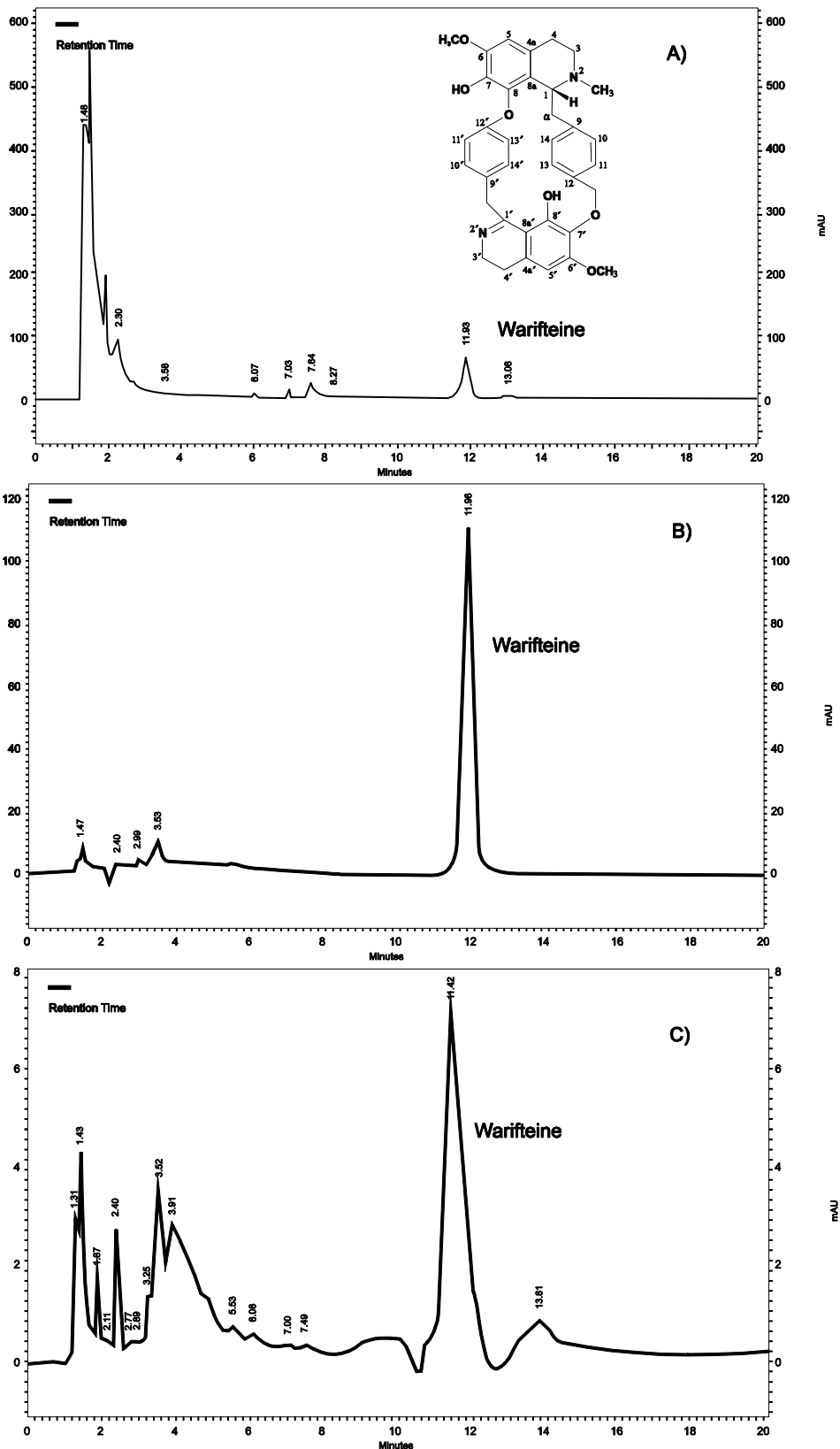


Figura 1: Padronização do extrato de *CsE* utilizado para a realização dos experimentos. A figura 1a mostra a estrutura química do alcaloide Wa. O cromatograma mostra o pico de Wa na amostra de *CsE* em 11,5 minutos (Figura 1a), quando comparado com o padrão (solução de Wa) (Figura 1b), que também apresenta o pico em 11,5 minutos. O pico de Wa também pôde ser observado na Figura 1c na solução com TAF.

3.4 Sensibilização e desafio

Animais A/J(n=5) foram sensibilizados com duas injeções subcutâneas (dia 0 e dia 7) com *BtE* ou *Dp* (10µg de proteína) adsorvido em hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) a 4mg/ml em solução salina. Um dia após a segunda injeção, os animais foram desafiados por via intranasal (in) com *BtE* ou *DpE* (10 µg de proteína), em 50 µl de solução salina, em uma das narinas, durante quatro dias alternados (Gaspar et al 1997). Vinte e quatro horas depois, os animais foram sacrificados com xilazina e quetamina (40 mg / kg de peso corporal, via intraperitoneal). Os grupos de animais foram definidos como: **controle** – animais não sensibilizados (salina); ***BtE*** – animais sensibilizados com *BtE*; e ***Dp*** – animais sensibilizados com *Dp*. O desenho experimental esta esquematizado na figura a seguir (Figura 2).

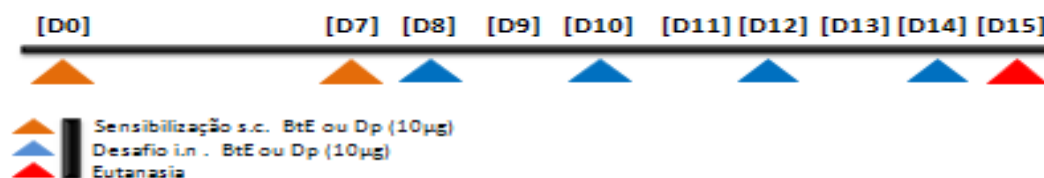


Figura 2: Desenho experimental do protocolo de sensibilização e desafio com antígenos de *BtE* ou *Dp*.

3.5 Tratamento com o extrato *CsE*, alcaloides e dexametasona

A dose e a via de *CsE* foram determinadas com base em estudos anteriores realizados por nossos colaboradores (BEZZERA-SANTOS et al., 2006; PIUVEZAN et al., 1999). Uma hora depois de cada sensibilização com *BtE*, os animais foram tratados com 400mg/Kg de *CsE*, 8mg/Kg de TAF, 4mg/Kg de Wa e 3mg/Kg de dexametasona (Dx).

Entre as duas sensibilizações, foram feitos dois tratamentos (dias 2 e 4), uma hora depois dos desafios com as mesmas doses. Os grupos de animais foram definidos como: **controle** – animais não sensibilizados (salina) e tratados com solução salina; **BtE** – animais sensibilizados com *BtE* e tratados com salina; **BtE/CsE** – animais sensibilizados com *BtE* e tratados com *CsE*; **BtE/TAF** – animais sensibilizados com *BtE* e tratados com a fração de alcaloides totais (TAF); **BtE/Wa** – animais sensibilizados com *BtE* e tratados com *Wa*; e **BtE/Dx** – animais sensibilizados com *BtE* e tratados com dexametasona. O desenho experimental está esquematizado na figura seguinte (Figura 3).

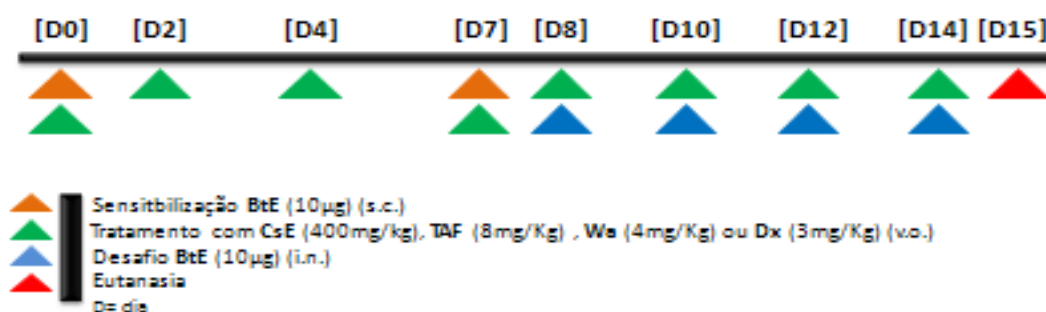


Figura 3: Desenho experimental do protocolo de sensibilização e desafio com antígenos de *BtE* e tratamento com *CsE*, TAF, *Wa* e Dexametasona (Dx).

3.6 Obtenção do lavado bronco alveolar (BAL)

A traqueia foi canulada e os pulmões foram lavados três vezes com 0,5 mL de PBS pH. 7,4. Cerca de 1,5 mL de BAL foram obtidos de cada camundongo. A contagem total de leucócitos no BAL foi imediatamente realizada em um hemocítômetro. A contagem diferencial de células foi obtida com o uso do *cytopsin*, as quais foram posteriormente coradas por hematoxilina e eosina. A contagem diferencial de pelo menos 100 células foi feita de forma “cega” e de acordo com critérios morfológicos padronizados.

3.7 Atividade de peroxidase do BAL

A atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) das células obtidas do lavado brônquico alveolar foi medida de acordo com o método descrito anteriormente (STRATH M, WARREN DJ, SANDERSON CJ, 1985). Resumidamente, as suspensões de células foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido. Após centrifugação

a 4°C, durante 10 min, a 1000 g, o sobrenadante de células foi colocado em placas de 96 poços (75 uL / poço), procedimento seguido pela adição de 1,5 mmol / L de o-fenilenodiamina e 6,6 mmol / L de H₂O₂ em 0,05 mol / L Tris-HCl, pH 8.0. Após 30 minutos em temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de 75µl de ácido cítrico a 0,2mol/L, e a absorbância da amostra foi determinada a 492 nm em um leitor de placas ELISA.

3.8 Análise histopatológica e quantificação de inflamação

As alterações histopatológicas e a quantificação da inflamação pulmonar foram realizadas conforme descrito anteriormente (VASCONCELOS et al 2008). Resumidamente, os tecidos do pulmão foram retirados, sendo que, previamente, com um auxílio de uma cânula na traqueia, foi adicionado paraformaldeído 4%. Logo após esse procedimento, amostras do tecido foram obtidas e mantidas embebidas na mesma solução. As secções de tecido (5 mm) foram coradas com hematoxilina e eosina, e as alterações histopatológicas foram analisadas por microscopia óptica, utilizando-se objetiva de 20x. Os dados sobre a quantificação da inflamação pulmonar foram determinados para cada animal utilizando-se o software Image-Pro Plus versão 6.1 (Media Cybernetics, San Diego, CA, E.U.A.), por meio da mensuração do montante total de células inflamatórias por mm².

3.9 Determinação do título de IgE anti BtE

A determinação dos títulos de IgE foi realizada por anafilaxia cutânea passiva (PCA). Diferentes diluições de soros dos camundongos foram inoculadas por via intradérmica no dorso raspado de ratos Wistar. Após 48 h, os ratos receberam injeção com *BtE* (4 mg de proteína / kg) na solução de azul de Evans (1%). Trinta minutos depois, os ratos foram eutanasiados, e a pele dorsal removida. As manchas foram medidas com auxílio de um paquímetro, e a última diluição que produziu mancha de 5mm foi considerada como o título do PCA (HOLT et al., 1981).

3.10 Determinação do perfil de citocinas do BAL

As concentrações de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- γ foram quantificadas no BAL por kits de ELISA, conforme recomendações do fabricante (BD Pharmigen, E.U.A.).

3.11 Análise estatística

Para a comparação de dois grupos que apresentaram distribuição normal, foi utilizado o Teste “*t*”. Para os que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o *Mann – Whitney test*. Para as análises com mais de dois grupos que apresentaram distribuição normal foi utilizado o *ANOVA*, com pós-teste de *Tukey*. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, foram utilizados o *Kruskal-Wallis* e o pós-teste de *Dunn*. Diferenças com os valores de $P \leq 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Cada experimento foi repetido, no mínimo, duas vezes. O programa utilizado para fazer as análises foi o Graph Pad Prism versão 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, U.S.A.).

RESULTADOS

4-RESULTADOS

4.1 Padronização da dose de BtE para a sensibilização

4.1.1 Contagem total, diferencial de células e avaliação de peroxidase de eosinófilos (EPO) no lavado brônquico alveolar (BAL), avaliação da arquitetura pulmonar e quantificação de IgE total e específica no soro.

Como pode ser visto na Figura 4a, camundongos A/J sensibilizados com 10 μ g de *BtE* apresentam uma alta produção de células inflamatórias no BAL (Figura.3a, $P < 0,01$ # #, Teste “t”), em especial de eosinófilos, quando comparados com os controles negativos (Figura 4b, $P < 0,01$ # # , ANOVA-Duns). Com relação à atividade de peroxidase, os animais sensibilizados com *BtE* tiveram uma maior produção de peroxidase no BAL, em comparação com os controles negativos (Figura 4c, $P < 0,01$ # #, Teste “t”). A produção de IgE total no soro foi maior também nos animais sensibilizados com *BtE*, quando comparados com os controles negativos (Figura 4d, $P < 0,05$ # Mann-Whitney). Na análise histopatológica do pulmão, as setas mostram (Figura. 4g) um denso infiltrado de células na região peribroncovascular, em comparação com os controles negativos (Figura 4f).

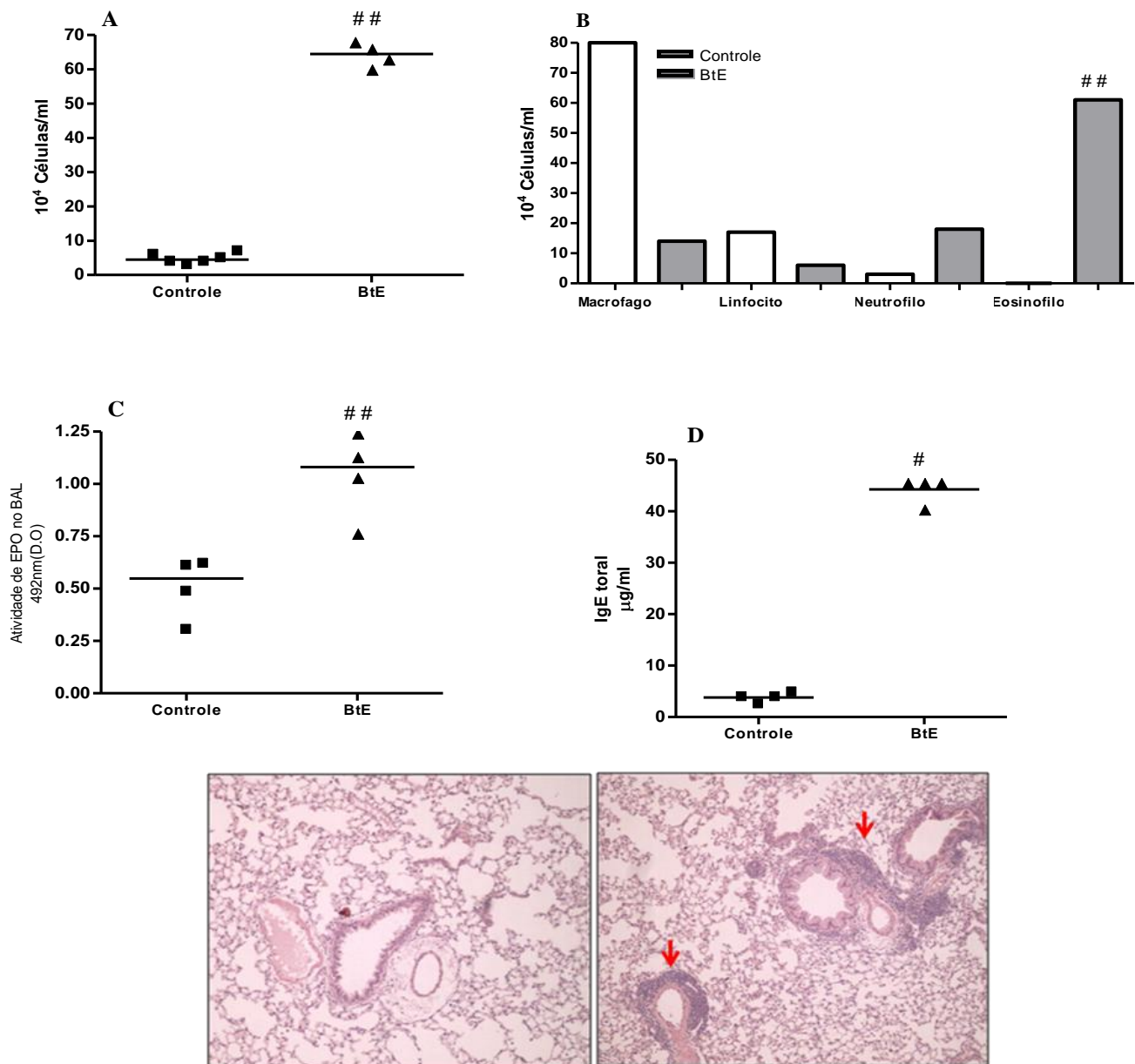


Figura 4: Efeito da sensibilização de animais A/J com 10µg de *BtE* na produção de células inflamatórias, na produção de peroxidase eosinofílica no BAL, na produção de IgE total e específica para *BtE* e na arquitetura pulmonar. Os animais controles foram manipulados com a administração de solução salina (controle). (A) contagem total de células no BAL; (B) contagem diferencial de células no BAL; (C) níveis de peroxidase eosinofílica (EPO) no BAL; (D) IgE total; (E) título de anticorpos IgE anti-*BtE* determinado pela anafilaxia cutânea passiva (PCA). Cada ponto corresponde ao resultado obtido a partir de um animal individual. (F e G) secções do pulmão coradas com hematoxilina e eosina de um animal controle negativo (F) animal sensibilizado com *BtE*(G) com aumento de 20X. Os dados são representativos de três experimentos

independentes. # $P < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$. A,C , t de Student; B ANOVA-Tukey e D, teste de Mann-Whitney. $P > 0,05$ não está representado.

4.1.2 Produção de citocinas no lavado brônquico alveolar (BAL)

A sensibilização de camundongos A/J com 10 μg de *BtE* estimulou a produção de citocinas como IL-13 (Figura 5a, $P < 0,05$ # , Teste “t”) e IL-5 (Figura 5b, $P < 0,001$ ## # , Teste “t”) no BAL em relação ao controle negativo. Apesar de não estatisticamente significante, a sensibilização com *BtE* mostrou uma tendência à produção aumentada de IL-4 (figura 5c, $P > 0,05$, Teste “t”) no BAL desses animais.

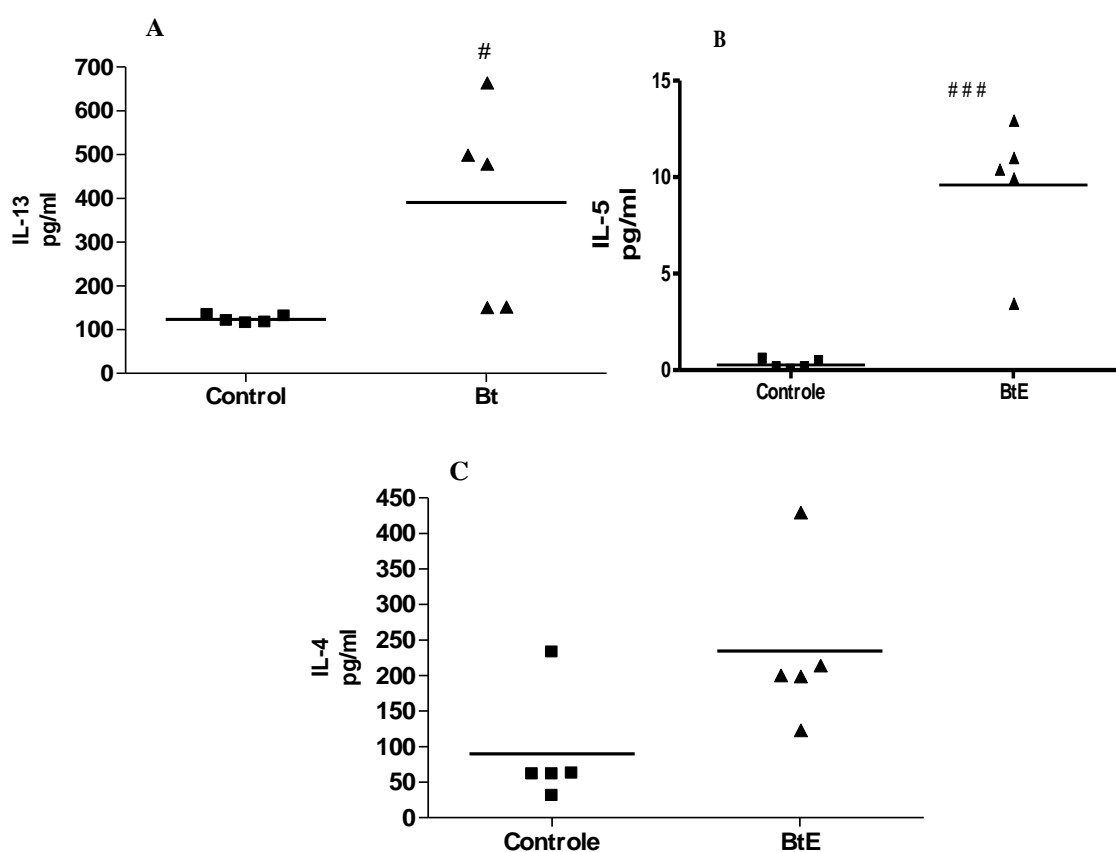


Figura 5: Efeito da sensibilização de camundongos A/J com 10 μg de *BtE* na produção de citocinas do BAL: IL-13(A), IL-5 (B) e IL-4(C). Cada ponto corresponde ao resultado obtido a partir de um animal individual. Os resultados são expressos em média e desvio padrão. Foram considerados estatisticamente significantes ### $P < 0,01$ e # $P < 0,05$.

A avaliação desses resultados indica que a sensibilização de animais da linhagem A/J com 10µg de *BtE* foi capaz de induzir parâmetros imunológicos importantes na fisiopatogênia da doença asmática.

4.2. Avaliação da sensibilização de camundongos A/J com antígenos de *BtE* e *Dp*.

4.2.1 Contagem total, diferencial de células e avaliação de peroxidase de eosinófilos (EPO) no BAL

A Figura 6a mostra o efeito da sensibilização pelos antígenos *BtE* ou *Dp* na produção de células totais no BAL. Tanto a sensibilização por *BtE* quanto a por *Dp* produziram células no BAL em relação ao controle negativo (figura 6a, $P < 0,001$ # # # ANOVA-Tukey). Os animais sensibilizados com *BtE* também produziram mais células totais no BAL que os animais sensibilizados por *Dp* (figura 6a, $P < 0,001$ # # # ANOVA-Tukey). Na Figura 4b verifica-se que tanto o grupo sensibilizado com *BtE* quanto o sensibilizado com *Dp* produziram mais eosinófilos em relação ao controle negativo (figura 6b, $P < 0,001$ # # # ANOVA-Tukey). Entretanto, os animais sensibilizados por *BtE* produziram mais eosinófilos que os sensibilizados por *Dp* (Figura 6b, $P < 0,05$ # ANOVA-Tukey). Com relação à produção de neutrófilos, a sensibilização com *BtE* estimulou mais a sua produção, tanto em relação ao controle negativo quanto em relação à sensibilização por *Dp* (figura 6c, $P < 0,05$ # ANOVA-Tukey). Avaliando a EPO, os dois grupos sensibilizados com os diferentes ácaros produziram peroxidase eosinofílica no BAL em relação ao controle negativo, e o grupo sensibilizado por *BtE* produziu maior quantidade de EPO que os sensibilizados por *Dp* (figura 6d, $P < 0,001$ # # # ANOVA- Tukey).

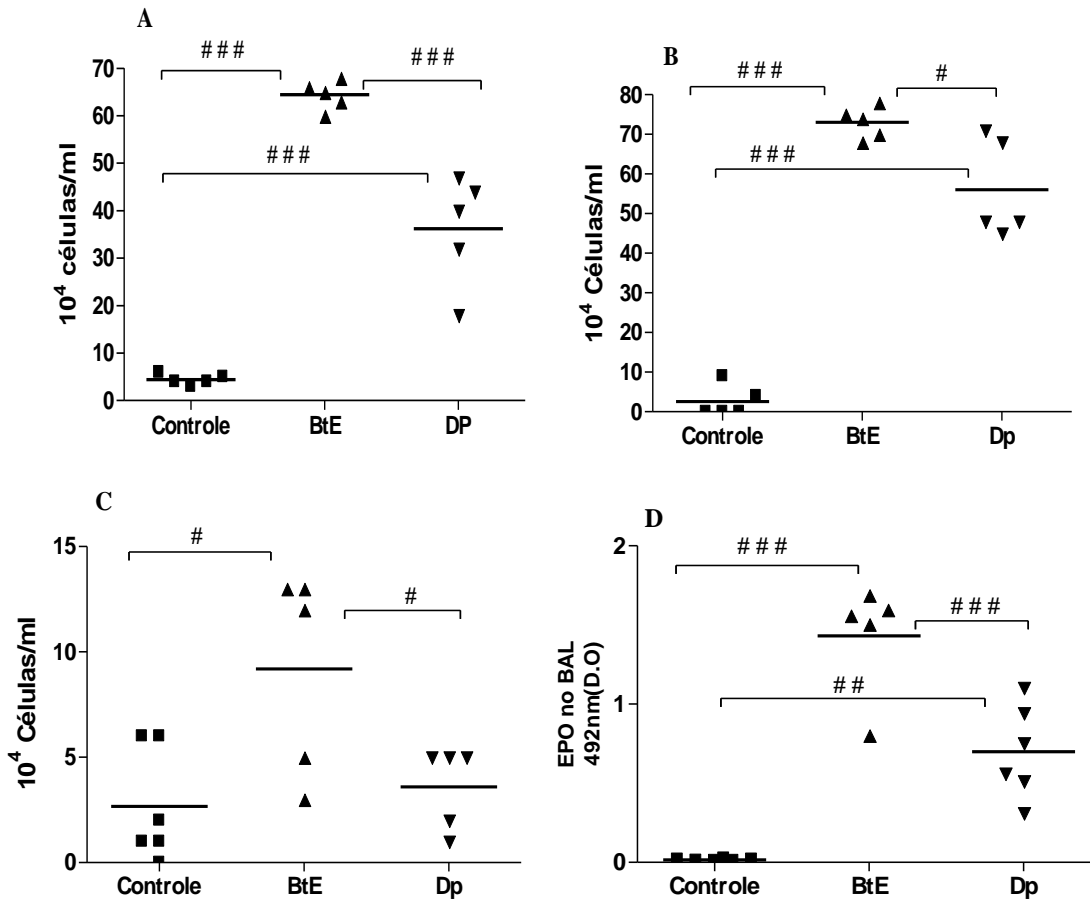


Figura 6: Efeito da sensibilização de animais A/J com antígenos *BtE* e *Dp* na produção de células totais (A), na produção de eosinófilos (B), neutrófilos(C) e na produção de EPO no BAL (D). Cada ponto corresponde ao resultado obtido a partir de um animal individual. Os resultados são expressos em média e desvio padrão, e foi utilizado o ANOVA-Tukey para todos os resultados. Foram considerados estatisticamente significantes ### P < 0,001; ## P < 0,01 e # P < 0,05.

4.2.2 Avaliação da sensibilização de camundongos A/J com antígenos de *BtE* e *Dp*: análise histopatológica do pulmão.

Ocorreu um considerável aumento no infiltrado de células inflamatórias na arquitetura pulmonar dos grupos sensibilizados por *BtE* (7b) e sensibilizados por *Dp* (7c) em relação os controle negativo (Figura 7a).

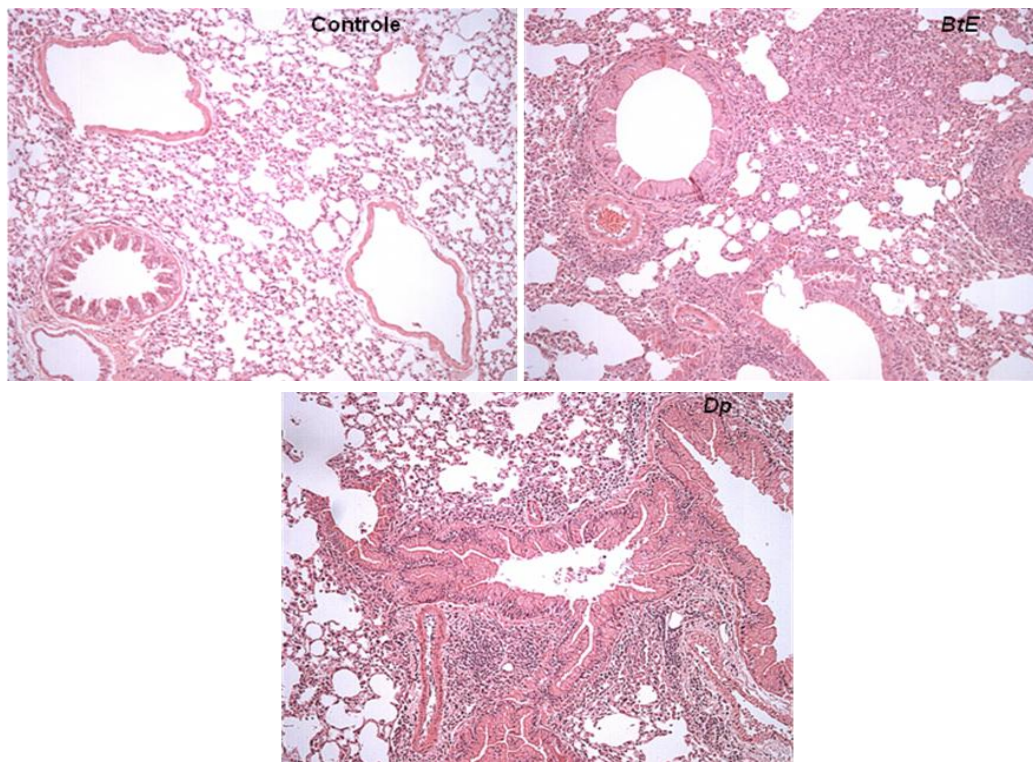


Figura 7: Efeito da sensibilização de animais A/J com antígenos *BtE* e *Dp* na arquitetura pulmonar dos animais com aumento de 20X (A-C).

4.2.3 Avaliação da sensibilização de camundongos A/J com antígenos de *BtE* e *Dp*: produção de IgE total no soro

Ao avaliarmos a produção de IgE total, a sensibilização com os alérgenos de *BtE* e *Dp* estimularam mais a produção de IgE total no soro dos animais em relação aos animais controles negativos (Figura 8, $P < 0,001$ # # # ANOVA-Tukey). Não houve diferença estatística entre os grupos sensibilizados pelos diferentes alérgenos (Figura 8, $P > 0,05$, ANOVA-Tukey).

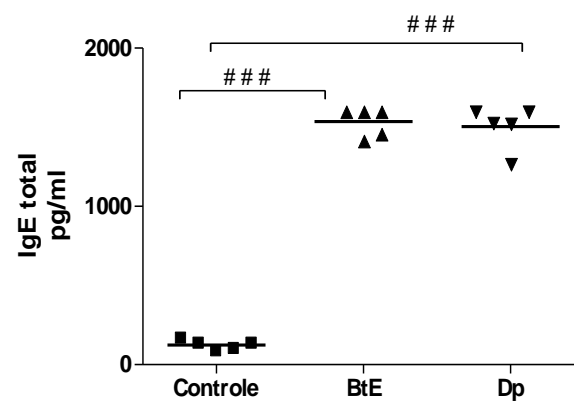


Figura 8: Cada ponto corresponde ao resultado obtido a partir de um animal individual. Os resultados são expressos em média e desvio padrão, e foi utilizado o ANOVA-Tukey. Foram considerados estatisticamente significantes ### $p < 0,001$

4.2.3 Produção de citocinas no lavado brônquico alveolar (BAL)

Os resultados a seguir mostram o efeito da produção de citocinas no BAL quando os animais foram sensibilizados pelos diferentes tipos de ácaros. A sensibilização dos animais com o *BtE* estimulou a produção de IL-13 (Figura 9a, $P < 0,05$ # ANOVA-Tukey) e de IL-5 em relação ao grupo controle negativo (Figura 9b, $P < 0,05$ # ANOVA-Tukey). Com relação à produção de IL-4, apesar de não estatisticamente significativa, os animais sensibilizados com *BtE* mostraram uma tendência a produzir mais IL-4 que os sensibilizados por *Dp* (Figura 9c, $P > 0,05$, ANOVA-Tukey).

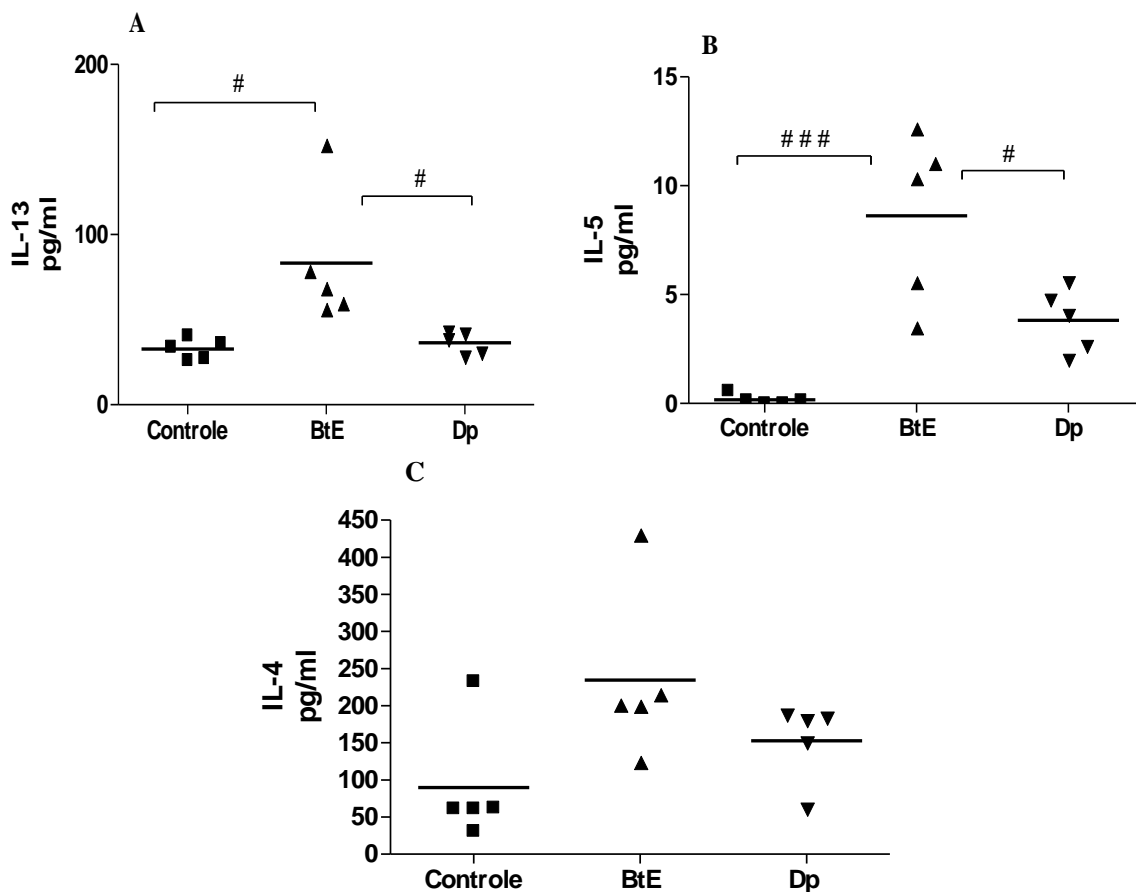


Figura 9: Efeito da sensibilização de camundongos A/J com antígenos *BtE* e *Dp* na produção de citocinas do BAL: IL-13 (A), IL-5 (B) e IL-4 (C). Os resultados são expressos em média e desvio padrão. Cada ponto corresponde ao resultado obtido a partir de um animal individual. Foram considerados estatisticamente significantes ###

$P < 0,001$ e # $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas usando-se o ANOVA-Tukey.

A partir das análises feitas, avaliando a sensibilização entre *BtE* e *Dp* (Figuras 6,7 e 8), verifica-se que o grupo dos animais sensibilizados pelo antígeno de *BtE* foi capaz de induzir estatisticamente mais parâmetros imunológicos importantes na fisiopatogênia da doença asmática que o grupo sensibilizado por *Dp*. Sendo assim, o modelo de alergia ao ácaro *Blomia tropicalis* foi escolhido para a realização da análise do perfil imunomodulador da planta *Cissampelos sympodialis* e seus compostos isolados, TAF e Wa.

4.3 Eficácia de CsE, TAF e Wa em modelo de alergia respiratória ao ácaro *Blomia tropicalis*.

4.3.1 Efeito de CsE, TAF e WA sobre a contagem total e diferencial de células e avaliação de peroxidase eosinofílica (EPO) no lavado brônquico alveolar (BAL)

Como esperado, a sensibilização com *BtE* levou a um aumento na contagem de células total no BAL (Figura 10a, $P < 0,001$ # # # ANOVA-Tukey). Por outro lado, quando os camundongos sensibilizados por *BtE* foram tratados com o *CsE*, a contagem total de células diminuiu significativamente (Figura 10a, $P < 0,001$ *** ANOVA-Tukey). Adicionalmente, o número de células no BAL de animais tratados com TAF e Wa também foi reduzido (Figura 10a, $P < 0,001$ *** ANOVA- Tukey, respectivamente). Quanto à contagem diferencial de células no BAL, nenhuma diferença foi encontrada em macrófagos, neutrófilos e linfócitos nos grupos tratados e não-tratados. No entanto, um aumento significativo do número de eosinófilos foi encontrado em camundongos sensibilizados por *BtE* (Figura 10b, $P < 0,001$ # # # ANOVA-Tukey). O tratamento com *CsE*, TAF e Wa levou a uma diminuição significativa na contagem de eosinófilos no BAL em relação a animais não-tratados porém sensibilizados por *BtE* (Figura 10b, $P < 0,001$ *** ANOVA-Tukey). Como esperado, a sensibilização dos animais com *BtE* estimulou a produção de peroxidase eosinofílica no BAL (Figura 10c, $P < 0,001$ # # #, ANOVA Tukey). Apenas quando os animais foram tratados com *CsE* ocorreu uma redução significativa de peroxidase eosinofílica no BAL (Figura 10c, $P < 0,05$ * ANOVA Tukey). No entanto, o tratamento com TAF e Wa mostrou uma tendência à redução, embora não fosse estatisticamente significante. A droga-padrão dexametasona foi capaz de reduzir todos os parâmetros analisados.

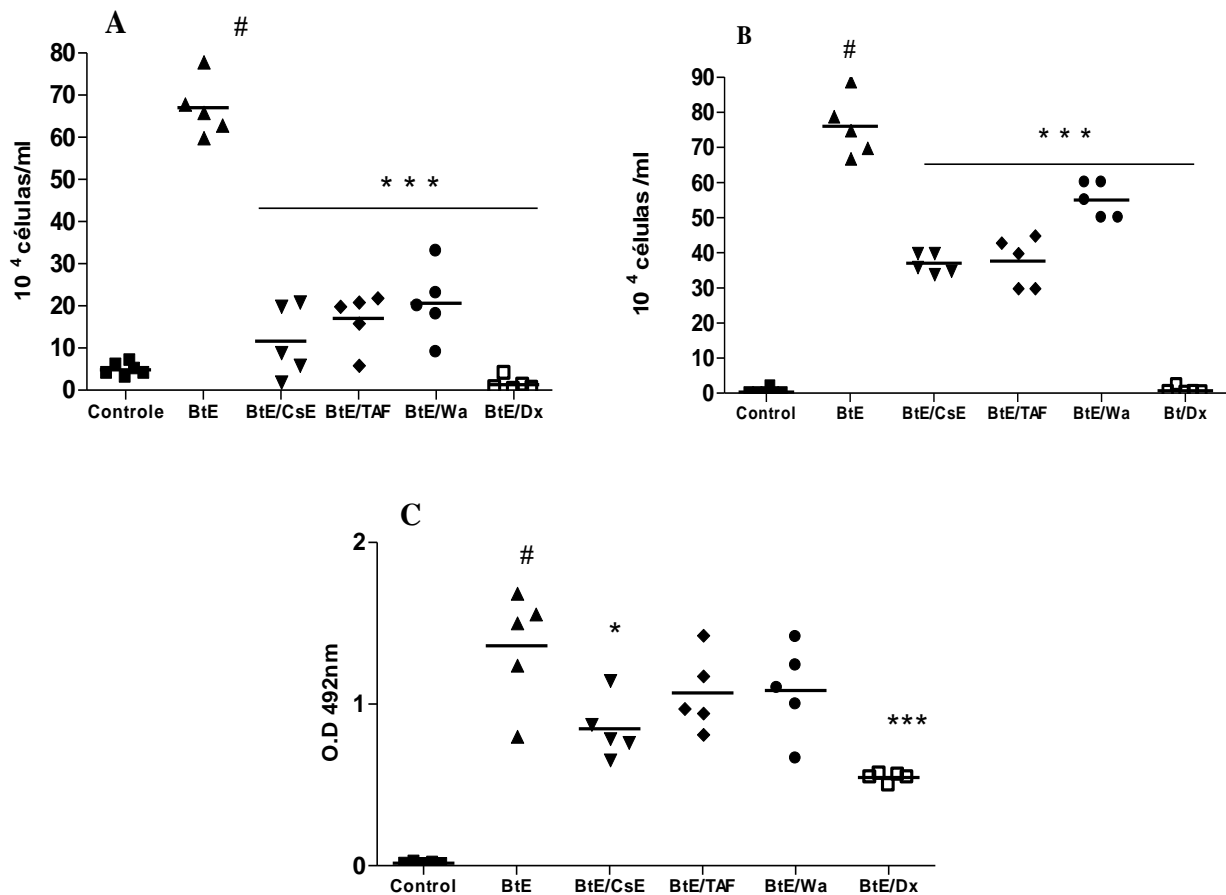


Figura 10: Efeito do tratamento de camundongos experimentalmente sensibilizados com *BtE* com extrato hidroalcoólico de *Cissampelos sympodialis* (*CsE*), fração de alcaloides totais (TAF) ou warifteína (Wa) na contagem total (A) e diferencial (B) de células do BAL e na EPO do BAL (C). # # # P <0,001 em relação ao controle; * P <0,05 em relação ao *BtE* grupo sensibilizado, *** p <0,001 em relação ao *BtE* grupo sensibilizado. Cada ponto corresponde ao resultado obtido a partir de um animal individual. Os resultados são expressos em média e desvio padrão, ANOVA-Tukey.

4.3.2 Efeito do tratamento de *CsE* , TAF e WA sobre a arquitetura e a quantificação da inflamação

O tratamento com *CsE* reduziu a densidade de células inflamatórias ao redor da região peribroncovascular (Figura 11c), aproximando-se dos animais controles negativos (Figura 11 a) em comparação aos animais apenas sensibilizados com 10µg de *BtE* (Figura 11b). No entanto, a densidade dessas células não foi expressivamente reduzida quando os animais foram tratados com TAF (Figura 11d) e Wa (Figura 11e). A análise quantitativa do infiltrado celular corrobora essas observações, pois sua redução foi significativa apenas nos animais tratados com *CsE* (Figura 11f, P<0,05 * ANOVA-Tukey), mas não com o tratamento com TAF nem Wa.

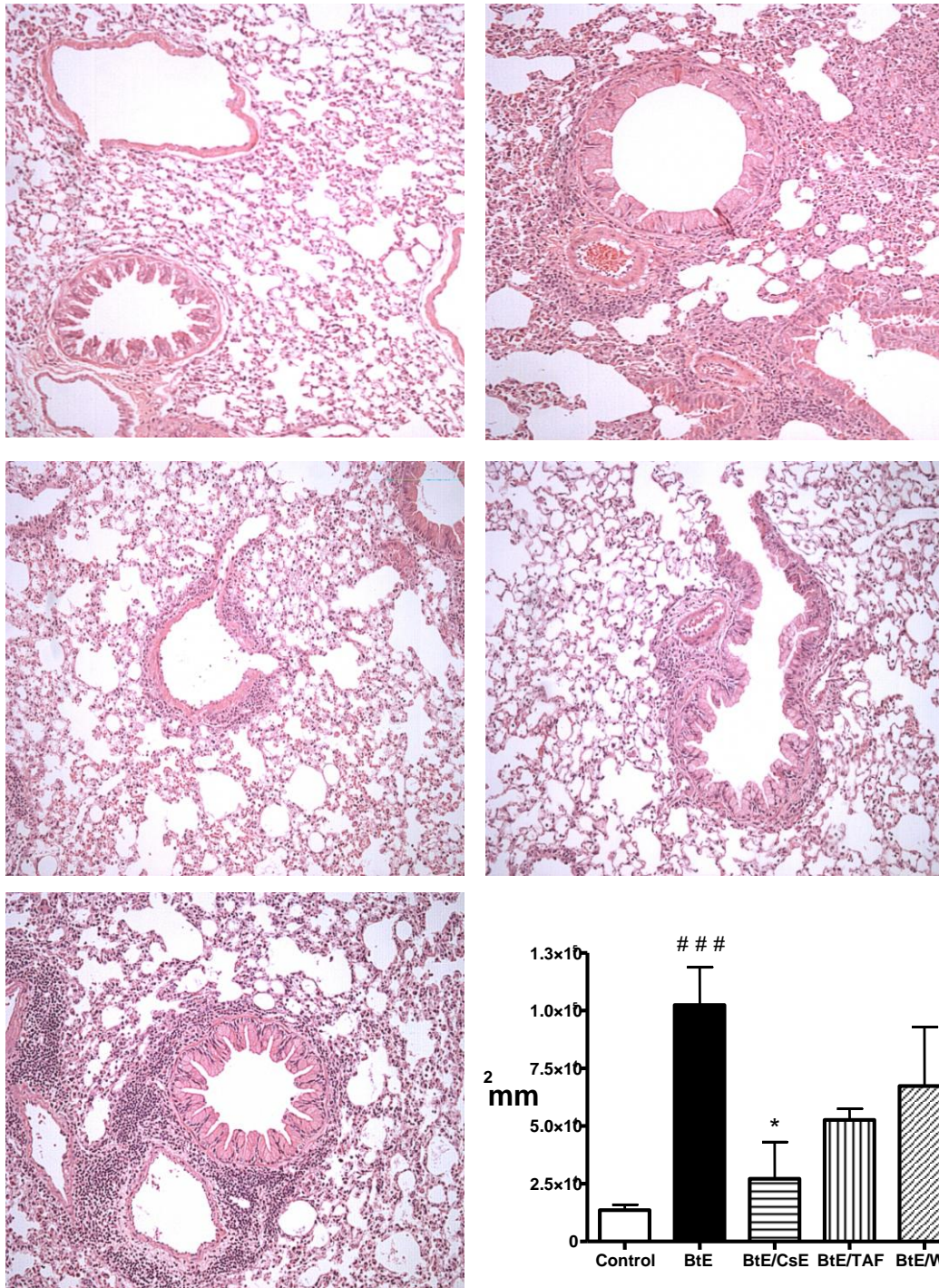


Figura 11 : Efeito do tratamento com *CsE* , TAF e Wa em animais sensibilizados com 10µg de *BtE* sobre a arquitetura pulmonar, com aumento de 20X (A-E) e a quantificação da inflamação (F). Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. Foi utilizado ANOVA-Tukey. ### p < 0,001 entre os animais controles negativos e controles positivos, e * p < 0,05 entre os animais tratados e controles positivos.

4.3.3 – Efeito do tratamento de *CsE* sobre a produção IgE anti-*BtE* pela técnica PCA (Anafilaxia Cutânea Passiva)

Como pode ser visto na Figura 12, a sensibilização dos animais com *BtE* induziu um aumento significativo de IgE específica para *B. tropicalis* (Figura 12 $P < 0,01$ # # ANOVA -Dunn). O tratamento de animais sensibilizados com *CsE* reduziu o título dessa imunoglobulina específica para o ácaro utilizado na sensibilização, embora não tenha se revelado estatisticamente significativo (Fig. 12 $P > 0,05$ ANOVA-Dunn).

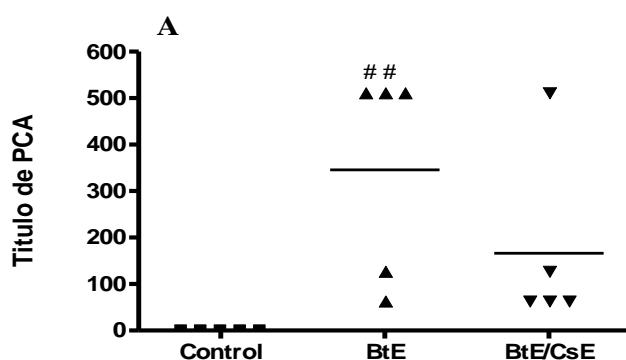


Figura 12: Efeito do tratamento de animais sensibilizados com 10 μ g de *BtE* com *CsE*, na produção de IgE anti-*BtE* (A). Os resultados estão expressos em mediana. Foi utilizado o ANOVA-Dunn. Cada símbolo corresponde ao resultado obtido a partir de um animal individual. Foram considerados estatisticamente significante # # # $p < 0,001$.

4.3.4 Efeito do tratamento de *CsE*, TAF e WA sobre a produção de citocinas no BAL

A sensibilização com *BtE* estimulou significativamente a produção de citocinas Th2, a exemplo de IL-5 (Figura 13a, $P < 0,001$ # # # ANOVA-Tukey) e IL-13 (Figura 13b, $P < 0,05$ # ANOVA-Tukey). Por outro lado, o tratamento dos animais sensibilizados com *CsE* reduziu significativamente a produção da citocina IL-5 (Figura 13a, $P < 0,05$ * ANOVA-Tukey). No entanto, o tratamento com TAF e Wa, apesar da forte tendência, a redução da produção dessa citocina não foi estatisticamente significativa. Com relação à produção de IL-13, a sensibilização com *BtE* induziu um aumento dessa citocina no BAL (Figura 13 b, $p < 0,05$ # ANOVA-Tukey). No entanto, nenhum dos tratamentos reduziu essa citocina no BAL dos animais. Adicionalmente, o tratamento com *CsE*

estimulou significativamente a produção da citocina imunorregulatória, IL-10, em relação aos animais sensibilizados com *BtE* (Figura 13c, $P < 0,05$ *ANOVA-Tukey).

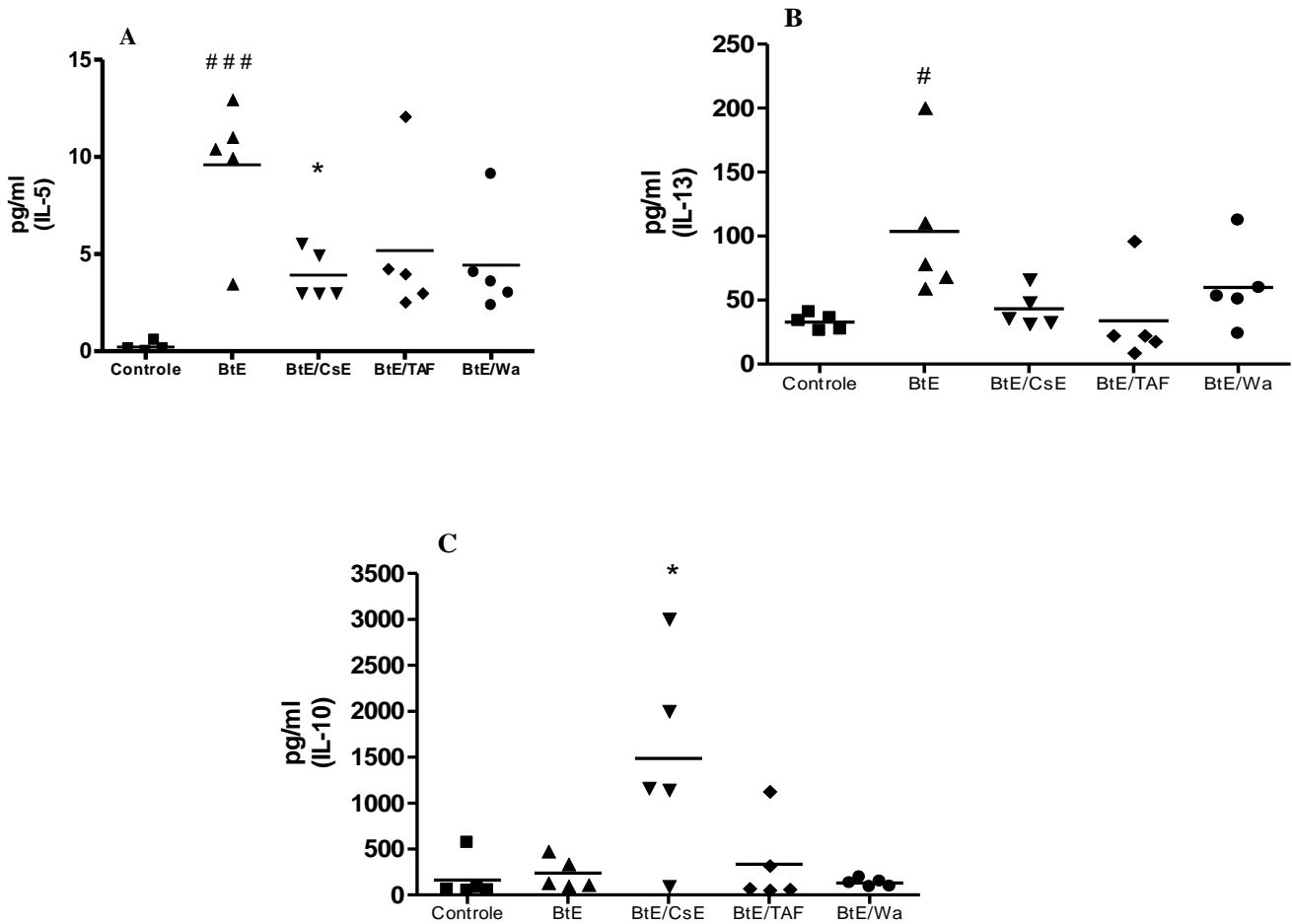


Figura 13: Efeito do tratamento com *CsE*, TAF e Wa em animais sensibilizados com 10 μ g de *BtE* sobre a produção das citocinas IL-5(A) , IL-13(B) , IL-10(C). Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. Foi utilizado ANOVA e pós-teste de Tukey. Cada ponto corresponde ao resultado obtido a partir de um animal individual. Foram considerados estatisticamente significantes ### $P < 0,001$; # $p < 0,05$ entre os animais controles negativos e controles positivos, e * $p < 0,05$ entre controles positivos e animais tratados.

DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos o efeito da sensibilização de camundongos A/J por baixa dose de *BtE*, avaliamos comparativamente o efeito da sensibilização de animais por *Dp* ou *BtE* e demonstramos a eficácia de *CsE*, TAF e Wa em animais sensibilizados com antígenos do ácaro *Blomia tropicalis*.

O uso de modelo experimental para estudar uma determinada patologia faz-se necessário, na medida em que possibilita, em parte, desvendar mecanismos fisiopatológicos da doença de interesse. Como foi dito, a asma é uma doença prevalente em todo mundo, embora sua fisiopatologia não esteja totalmente desvendada (MORAES et al., 2001; CAMPOS et al., 2007).

Muitos agentes físicos e químicos podem desencadear respostas alérgicas. Os ácaros são os agentes biológicos que mais causam doenças alérgicas, em especial a asma.

Na tentativa de montar um modelo experimental que mimetize a asma em humanos, nosso grupo previamente descreveu o modelo experimental de asma no qual camundongos A/J eram sensibilizados com 100 µg de *BtE* por animal em várias linhagens de camundongos, comparando-o com o clássico modelo de ovalbumina (BAQUEIRO, 2007; BAQUEIRO et al., 2010). No presente trabalho, demonstramos que, quando sensibilizamos os animais com uma baixa dose de *BtE* (10 µg por animal), os parâmetros imunológicos típicos da fisiopatogênica da asma foram semelhantes à sensibilização por altas doses (BAQUEIRO et al., 2007).

A sensibilização com 10 µg de *BtE* produziu células inflamatórias como os eosinófilos, altos níveis de EPO e IgE total e específica para *BtE*, assim como induziu a produção de citocinas como IL-5, IL-13 e IL-4, importantes para o desenvolvimento e a manutenção da resposta Th2, perfil imunológico característico da asma (WARNER et al., 1998; HOLGATE et al., 2003; ABBAS; LICHTMAN 2005; VIEIRA-DE ABREU et al 2005; BAQUEIRO et al., 2010).

Os ácaros *Blomia tropicalis* e *Dermatofagoides pteronyssinus* são os agentes alergizantes mais comuns de doenças alérgicas respiratórias em países tropicais. Apesar da forte associação filogenética e homóloga desses dois ácaros, eles possuem baixa reatividade cruzada e parecem estimular diferentes perfis imunológicos (SATO et al., 2002; CHUA et al., 2007).

Neste trabalho, demonstramos que a sensibilização de camundongos A/J por *BtE* foi, pelo menos na dose avaliada (10µg/animal), a sensibilização mais significativa, pois

produziu mais eosinófilos do que a verificada em animais sensibilizados por *Dp*. Um aumento significativo de EPO pôde ser constatado nos animais sensibilizados com *BtE*, acompanhando, assim, a eosinofilia vista no BAL desses animais (LEE et al., 2007). Adicionalmente, houve um aumento da densidade de células inflamatórias semelhantes nos dois grupos de animais sensibilizados, em comparação com o controle negativo, assim como na produção de IgE total.

O mais interessante é que a sensibilização com *BtE* produziu mais significativamente citocinas-chave para o perfil imunológico da asma (CHUNG; BARNES, 1999; ABBAS; LICHTMAN, 2005). Houve maior produção de IL-13, importante citocina para o desenvolvimento da HRB, e produção de muco (MARTINEZ, 1999; AKIHO et al., 2002; HERSHEY, 2003; KIBE et al., 2003). A produção de IL-5, citocina importante para o recrutamento de eosinófilos, também foi aumentada no modelo experimental de asma a *BtE*. (HAMELMANN et al., 1999; BOUSQUET et al., 2001). A produção de IL-4 entre os animais sensibilizados com *BtE* foi maior que nos animais sensibilizados com *Dp*, apesar de não estatisticamente significativa. IL-4 possui um papel crucial para o desenvolvimento da asma, já que essa citocina orquestra o perfil inflamatório Th2 (WARNER et al., 1998).

Os nossos achados, portanto, contrastam com os achados de Sato e colaboradores (2002) e Carvalho e colaboradores (2004), os quais constataram que a sensibilização de camundongos A/Sn com *Dp* induz uma maior produção de eosinófilos e de IL-5 que os animais sensibilizados com *BtE*, ao passo que a sensibilização desses mesmos animais por *BtE* produz mais neutrófilos. No trabalho em questão, a sensibilização por *BtE* produziu mais eosinófilos, assim como IL-5. Corroborando, em parte, os nossos achados, tem sido constatado que a proteína recombinante Der f 2 tem sido associada com uma maior infiltração de neutrófilos e poucos eosinófilos no BAL de camundongos A/J (YASUE et al., 1997). Esses contrastes podem ser observados durante a sensibilização por *BtE* e *Dp* em diferentes trabalhos acerca do influxo celular para as vias aéreas, assim como o perfil de citocinas induzido pode estar relacionado, pelo menos em parte, aos diferentes alérgenos que compõem os diferentes tipos de ácaros. Além disso, a diferença no perfil imunológico apresentado na sensibilização por esses dois ácaros também pode estar relacionada à linhagem utilizada, fato que também foi observado pelo nosso grupo, quando avaliamos, em quatro linhagens diferentes de camundongos singênicos, o efeito de altas doses de *BtE*, que também apresentou perfis distintos (BAQUEIRO et al., 2007; BAQUEIRO et al., 2010).

Tendo em vista que a sensibilização por *BtE* apresentou parâmetros inflamatórios mais evidentes quando comparados aos dos animais sensibilizados com *Dp*, o modelo de asma escolhido para testar o efeito imunomodulador de *CsE*, TAF e Wa foi o de *BtE*.

A seguir, discutimos a importância de cada um desses parâmetros avaliados na mediação do quadro alérgico e o efeito de *CsE* e seus alcalóides sobre tais parâmetros. Os parâmetros analisados foram a produção de IgE específica, a migração celular e as alterações histopatológicas nos pulmões, a produção de peroxidase eosinofílica (EPO) no lavado bronco-alveolar (BAL) e a produção de citocinas.

Estudos anteriores descreveram previamente a presença de eosinófilos no infiltrado inflamatório nos pulmões de camundongos sensibilizados com antígeno de *BtE* (GONZALO et al., 1996 ; BAQUEIRO et al., 2005). Drogas que modulem o recrutamento de eosinófilos e (ou) ativação podem ser importantes para reduzir a inflamação pulmonar na asma, quando ela é induzida por ácaros.

A redução da infiltração de eosinófilos para o pulmão tem sido demonstrada em outros estudos que avaliaram o efeito das plantas sobre a asma. Sohn et al. (2009) constataram, em células cultivadas, que a *Rotundifolia vitex*, uma planta popularmente utilizada para o tratamento da asma, promoveu uma redução na produção de substâncias quimiotáticas para os eosinófilos. Nossos resultados confirmam o potencial antialérgico de *CsE* e Wa observado por Bezerra-Santos e colaboradores (2006) e Costa e colaboradores (2008), pois *CsE* e seus alcalóides reduziram o número de eosinófilos no BAL, a produção de IgE, a ativação de leucócitos, a hiperalgesia térmica e a degranulação dos mastócitos em animais sensibilizados por OVA.

A eosinofilia pulmonar é uma característica fundamental da asma alérgica, e a infiltração das vias aéreas por eosinófilos parece ser central na patogênese da doença (GLEICH, 1990; GONZALO, 1996). Presume-se que o tráfego de eosinófilos para os sítios de reações alérgicas é regulamentado em três níveis distintos: receptores de adesão (selectinas e integrinas) que medeiam a adesão ao endotélio vascular inflamado, ativação de fatores (citocinas, quimiocinas e quimioatraentes) que induzem a expressão de selectinas e seus ligantes, e que ativam integrinas e seu antirreceptor endotelial, atraindo esse subtipo de leucócitos para o sítio inflamatório e os leucócitos que estão presentes no local da inflamação que regulam a expressão e a liberação desses fatores de ativação (RESNICK; WELLER 1993). Apesar de as moléculas ou células envolvidas em qualquer desses três níveis de regulação não serem específicas dos eosinófilos, podem fornecer diversidade combinatória suficiente para permitir o seletivo

recrutamento de eosinófilos para o pulmão *in vivo* (BUTCHER, 1991; RESNICK; WELLER, 1993; GONZALO et al., 1996).

Estudos anteriores também descreveram o efeito inibitório de compostos naturais, tais como D-pinitol (LEE et al., 2007) e o extrato fenólico do pólen de abelha (MEDEIROS et al., 2008), na degranulação de eosinófilos, por meio de ensaio de peroxidase eosinofílica. Ao contrário das outras peroxidases, a EPO tem uma alta carga catiônica, com um ponto isoelétrico de 10,8, e liga-se fortemente à matriz extracelular (THOMSEN et al., 2000), causando danos ao tecido. A redução da liberação da EPO, quando os animais foram tratados por *CsE*, pode ser de relevância para a melhoria da inflamação e (ou) remodelamento tecidual na asma alérgica. O resultado obtido de supressão da atividade de EPO acompanha a redução de eosinófilos induzida pelo tratamento com *CsE* em animais sensibilizados com *BtE*.

IgE é a principal classe de imunoglobulina associada com doenças alérgicas, e o papel que ela desempenha como efetor de eventos relacionados com a ativação de eosinófilos e degranulação de mastócitos é bem conhecido (TURNER H, KINET JP, 1999). A produção de IgE depende de citocinas de tipo Th2, como IL-4. Maturação, migração e ativação de eosinófilos são estimuladas pela IL-5 (CORRY; KHERADMAND 1998). A supressão da produção, ou o bloqueio da IgE, constitui uma importante estratégia para o tratamento de doenças alérgicas, como demonstra a existência de drogas relativamente eficazes, como Omalizumabe (HOLGATE et al., 2009) e o anticorpo monoclonal anti-IL-4 Pascolizumabe (HART et al., 2002), que foram projetados com essa finalidade.

O efeito protetor do *CsE* sobre os títulos de IgE observados neste estudo não foi estatisticamente significativo, e isso pode ser devido à falta de eficácia na modulação da IL-13 que, além de IL-4, também é importante reguladora da produção de IgE. IL-13 é uma citocina produzida por células T, mastócitos, células dendríticas e muitos outros tipos de células (KIBE et al., 2003). A IL-13 está especialmente relacionada com a produção de muco por células caliciformes no epitélio da via aérea e, em associação com IL-4, pela interação com cadeia IL-4R α e ativação do fator de transcrição STAT 6, induz o *switch* de classe para IgE (WYNN, 2003). No entanto, estudos recentes têm mostrado que, em paralelo a essa clássica ativação por meio da cadeia IL-4R α , um novo caminho para a sinalização de IL-13, independente de STAT 6, tem sido sugerido (MATTES et al., 2001). Em humanos, os níveis de IL-13 estão sistemicamente aumentados no pulmão durante ataques de asma (PRIETO et al., 2000). Os níveis de IL-13 não foram significativamente modulados pelo tratamento por *CsE*, TAF, um fato que

pode explicar o efeito não-significativo na redução dos níveis de IgE quando os animais foram tratados com *CsE*, como mencionado anteriormente. A literatura apresenta dados interessantes a respeito da IL-13 em modelos de asma alérgica em camundongos. A administração de anticorpo anti- IL-13 (YANG et al., 2004) e receptor $\alpha 2$ de IL-13 (LEIGH et al., 2004) diminui a HRB. Por outro lado, há evidências sugerindo que a HRB ocorre na ausência de IL-13 (PROUST et al., 2003).

O papel desempenhado pela IL-5 na patogênese da asma está bem definido (LEE et al., 2007), e diversos estudos demonstraram o papel dessa citocina no desenvolvimento, ativação e migração de eosinófilos (ROGERIO et al., 2008; STEIN et al., 2008). A baixa produção de IL-5 pode explicar o impacto do tratamento do *CsE* sobre a infiltração de leucócitos, principalmente eosinófilos, nos pulmões. IL-5, portanto, seria a principal citocina envolvida na patogênese nesse modelo de alergia respiratória. O mecanismo pelo qual o *CsE* afeta os níveis de IL-5 permanece desconhecido, mas uma possibilidade é que ele module o fator de transcrição relacionado com a produção de IL-5. A ausência de um efeito estatisticamente significativo da TAF e Wa em níveis de IL-5 (Figura 10a) pode ser atribuída a um efeito aditivo ou sinérgico dos alcaloides diferentes, que estão presentes no *CsE*, e de outras substâncias com propriedade anti-inflamatória da planta. Conforme foi descrito por Chen e colaboradores (2007), quando os animais sensibilizados por OVA foram tratados com a budesonida, um glicocorticoide amplamente utilizado para o tratamento da asma, uma redução da expressão de um fator de transcrição relacionado com a IL-5 foi observada. O fato de a IL-5, mas não a IL-13, ter sido significativamente reduzida pelo *CsE* pode estar relacionado à inibição do fator de transcrição STAT 6, que regula a produção de IL-5, mas não é o único fator de associado à IL-13.

Além disso, *CsE*, mas não TAF e Wa, promoveu um aumento significativo na produção de IL-10. Estudos anteriores descreveram a capacidade de o *CsE* estimular a produção de IL-10 *in vitro* e *in vivo* (PIUVEZAM et al. 1999 e BEZERRA-SANTOS et al. 2006). A produção de citocinas reguladoras é um mecanismo importante para inibir o desenvolvimento de asma, já que essas moléculas podem controlar a inflamação excessiva causada por influxo maciço de eosinófilos e também regular as reações de hipersensibilidade mediadas por IgE, que envolvem a degranulação dos mastócitos e contribuem marcadamente para a patogênese da asma alérgica (PEARLMAN, 1999). A principal função da IL-10 parece ser limitar e, finalmente, encerrar a resposta inflamatória. Além dessas atividades, a IL-10 regula o crescimento e (ou) diferenciação

de células B, células NK, células T citotóxicas e auxiliares, mastócitos, granulócitos, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais. IL-10 desempenha um papel fundamental na diferenciação e função de um tipo recém-identificado de células T, as células T reguladoras, que constituem um tipo de célula importante no controle das respostas imune e na manutenção da tolerância imunológica *in vivo* (MOORE et al., 2001).

A ação imunomodulatória de IL-10 resulta da inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , da diminuição da atividade dos neutrófilos e macrófagos, da redução da expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II. Além disso, a IL-10 também inibe a produção de citocinas Th2, como IL-5 e IL-13, envolvidas na patogênese da asma, e a liberação de histamina pelos mastócitos e basófilos, além de estimular a produção de anticorpos bloqueadores IgG4 (CHAI et al., 2005 e ROBINSON, 2009). É possível, portanto, que a diminuição dos níveis de IL-5 e a conseqüente a redução no número de eosinófilos no BAL, em animais tratados com *CsE*, podem ser devidas ao efeito regulatório de IL-10.

O mecanismo molecular pelo qual o *CsE* estimula a produção de IL-10 permanece desconhecido, mas a imunossupressão exercida por essa citocina, na resposta imune Th2, pode ser explicada, pelo menos em parte, pela inibição de fatores de transcrição relacionados às citocinas Th2, como a STAT6. Além disso, a IL-10 também suprime a via NF-kB, pelo menos por duas maneiras: pela ativação do inibidor da quinase do I κ B-similar de salicilato e inibindo a ligação do NFkB ao DNA (MOORE et al., 2001). Um estudo conduzido por Lentsch e colaboradores (1997) demonstrou que a IL-10 inibe a expressão de NF-kB, e esse evento foi associado com a diminuição da inflamação no pulmão, e que a inibição do NF-kB foi conseguida pela inibição da degradação de I κ B α . Esse mesmo grupo demonstrou que a administração oral de IL-10 em camundongos inibiu a lesão pulmonar pelo complexo imune IgG em 95% e reduziu os níveis de TNF- α no BAL desses animais (MULLIGAN et al., 1997).

Adicionalmente, o extrato hidroalcoólico do *CsE* apresentou melhores resultados em todos os parâmetros analisados, em comparação com a fração de alcaloides totais ou warifteína, um alcaloide bisbenzilisoquinolínico isolado de *CsE*. Esse fato pode ser explicado pelo efeito aditivo ou sinérgico de diferentes compostos no extrato, sugerindo o recente conceito de pureza-atividade com relação aos produtos naturais (JAKI et al., 2008).

Nesse contexto, a capacidade de o *CsE* restaurar o equilíbrio fisiológico por meio da IL-10 aparenta ser um possível caminho para o tratamento da asma, tendo em questão a ausência de toxicidade e o baixo custo. Dessa forma, os resultados apontam para a possibilidade de utilização dessa droga em algumas aplicações clínicas, tais como a asma e outras doenças imunomediadas. Estudos adicionais fazem-se necessários com o objetivo de elucidar o mecanismo molecular pelo qual *CsE* desempenha sua ação antialérgica e trabalhos clínicos que permitam a avaliação de sua eficácia em humanos.

CONCLUSÃO

6 – CONCLUSÃO

A sensibilização de animais A/J com baixas doses do *BtE* induziram parâmetros imunológicos característicos do quadro alérgico. O *BtE* induziu mais potentemente características inflamatórias da asma do que *Dp*, além de distintos padrões celulares. O extrato da planta *Cissampelos sympodialis* (*CsE*) reduziu efetivamente parâmetros imunológicos no modelo experimental de asma induzida pelo ácaro *BtE*, mimetizando a asma humana. A redução desses parâmetros pôde demonstrar a capacidade e as propriedades, respectivamente anti-inflamatória e imunomoduladoras, de *CsE* e seus alcaloides.

7-REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. E A. H. LICHTMAN. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005. 576 p.
- ARLIAN LG, VYSZENSKI-MOHER DL, FERNANDES-CALDAS E: Allergenecity of the mite, *Blomia tropicalis*. **J Allergy Clin Immunol** , V. 91, p.1042–1950, 1993.
- ALEXANDRE-MOREIRA et al. *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae) leaf extract induces interleukin-10-dependent inhibition of *Trypanosoma cruzi* killing by macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36 , p. 199-205, 2003.
- ALMEIDA, R. N. et al. Antidepressant effect of an ethanolic extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 63, p. 247-252, 1998.
- BAQUEIRO, TF. Investiga o sobre adjuvantes da resposta Th1 e obten o de ant genos recombinantes de *Blomia tropicalis* voltados para aplica o em vacinas e imunoterapia contra enfermidades al rgicas. Salvador, 2007. Tese (Mestrado em Imunologia) universidade Federal da Bahia.
- BAMBERGER, C.M. SCHULTE, H.M. CHROUSOS, G.P. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. **Rev.** v.17, p. 245-61,1996.
- BAXTER, J.D. Minimizing the side effects of glucocorticoids therapy. **Adv Intern Med.** v.35, p.173-94, 1990.
- BAXTER, J.D. The effects of glucocorticoid therapy. **Hosp Pract.** v. 27, p.111-123, 1992.
- BERNARD C. An introduction to the study of experimental medicine. In: Images from the history of medicine division. **National Library of Medicine**, 1865.
- BEZERRA-SANTOS , C. R. et al. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae): oral treatment decreases IgE levels and induces a Th1-skewed cytokine production in ovalbumin-sensitized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95 , p. 191-197, 2004.
- BEZERRA-SANTOS CR et al. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **Int Immunopharmacol.** v.6 (7): 1152-60, 2006.
- BLACK, J. L. & JOHNSON, P. R. Airway smooth muscle in asthma. **Respirology.** v.1, p. 153-158,1996.
- BOUSQUET, J et al . Allergic rhinitis and its impact on asthma. **Journal of allergy and clinical immunology.** Montpellier, v 108 ,n 21, p 147-334, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas. Estatísticas de saúde e mortalidade. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

BUSSE WW, LEMANSKE RF. Asthma. **N Engl J Med**. v.344, p.350-62, 2001.

BUTCHER, EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. **Cell** , v. 67, p.1033–1036, 1991.

BUTTGEREIT, F. BRAND, M.D. BRUTMESTER, G-R. Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. **Biochem Pharmacol**. v.58, p. 363-8, 1999.

CARRICONDE, C. **Introdução ao uso de fitoterápicos nas patologias de APS: direcionado aos profissionais do programa de saúde da família**. Olinda, CNMP, p.91, 2002.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J Ethnopharmacol**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CHAI JG et al. Regulatory T cells, derived from naive CD4+CD25- T cells by in vitro Foxp3 gene transfer, can induce transplantation tolerance. **Transplantation**, v. 79(10), p. 1310-1316, 2005.

CHUA KY et al. The Blomia tropicalis allergens. **Protein Pept Lett**, v. 14(4), p.325-33, 2007.

CHEN XH et al. Budesonide attenuates airway remodeling and modulates the expression of Janus protein tyrosine kinase 1, and signal transducers and activators of transcription 6 in asthma: an experiment with mice. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi** 2007; 87(23): 1627-32.

CHUNG KF, BARNES PJ: Cytokines in asthma. **Thorax** , v. 54:825–857, 1999

COCKCROFT, D. W et al. Bronchial reactivity of inhaled histamine: a method and clinical survey. **Clin. Allergy**. v. 7, p. 235–243, 1977.

COOKSON W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. **Nature** v.402, p.5-11.1999.

CORRÊA, A. G. **Quím. Nova** , v. 18, p. 460, 1995.

COSTA HF et al Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. **Int Immunopharmacol**. v. 8, p.519-25, 2008.

CORRY DB, KHERADMAND F. Induction and regulation of the IgE response. **Nature**, v. 402 , p.18–23, 1998.

DE SOUZA, N. J.; **J. Ethnopharmacol** , v.38, p.177, 1993.

FAIÇAL S., UEHARA M.H.. **Efeitos sistêmicos e síndrome de retirada em tomadores crônicos de corticosteróides. Disciplina de Endocrinologia** – Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP.

FAGUNDES, DJALMA JOSÉ AND TAHA, MURCHED OMAR. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir. Bras.** v.19, p. 59-65, 2004.

FERNÁNDEZ-CALDAS E et al. Mite fauna, Der p I, Der f I and Blomia tropicalis allergen levels in a tropical environment. **Clinical & Experimental Allergy**, v. p. 292 – 297 2008.

FIORI R, FRISTCHER CC. Variação na prevalência de asma e atopia em um grupo de escolares de Porto Alegre/RS. **J Pneumol** 2001;27:237-42.

FITOTERAPIA. **Suplemento dedicado inteiramente à química e farmacologia do taxol e derivado** , v.62 , 1995.

GASPAR ELSAS MI et al. Rapid increase in bone-marrow eosinophil production and responses to eosinopoietic interleukins triggered by intranasal allergen challenge. **Am J Respir Cell Mol Biol.** v. 17 , p. 404-413, 1997.

GILANI, A.H.;RAHMAN, A.U. Trends in ethnopharmacology. **J Ethnopharmacol**, v. 100, p. 43-49, 2005.

GLEICH, G. The eosinophilic and bronchial asthma. Current understanding. **J. Allergy Clin. Immunol** , v. 85 p. 422–436, 1990.

GONZALO JA et al. Eosinophil Recruitment to the Lung in a Murine Model of Allergic Inflammation. **J. Clin Invest**, v. 98, p. 2332–2345, 1996.

HART TK et al. Preclinical efficacy and safety of pascolizumab (SB 240683): a humanized anti-interleukin-4 antibody with therapeutic potential in asthma. **Clin Exp Immunol** , v.130, p. 93-100, 2002.

HOLEN E, ELSAYED S. Specific T cell lines for ovalbumin, ovomucoid, lysozyme and two OA synthetic epitopes, generated from egg allergic patients' PBMC. **Clin Exp Allergy.** v.26, p.1080–8, 1996.

HOLGATE S et al. Effects of omalizumab on markers of inflammation in patients with allergic asthma. **Allergy**, v. 64, p. 1728-36, 2009.

HOLT PG et al. Induction of adjuvant independent IgE responses in inbred mice: primary, secondary, and persistent IgE responses to ovalbumin and ovomucoid. **Int Arch Allergy Appl Immunol.** v. 65 , p. 42-50, 1981.

HORWITZ, S. B.; **Nature.** v. 367, p. 593, 1994.

The International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISSAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of asthma symptoms: The International Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISSAC). **Eur Respir J** 1998;12:315-35.

JAKI BU et al. Purity-Activity Relationships of Natural Products: The Case of Anti-TB Active Ursolic Acid. **J Nat Prod** , v. 71: 1742–1748, 2008.

KIBE A et al. Differential regulation by glucocorticoid of interleukin-13-induced eosinophilia, hyperresponsiveness, and goblet cell hyperplasia in mouse airways. **Am.J.Respir.Crit Care Med** , v. 167, p. 50-56, 2003.

KAMCHONWONGPAISON, S.; MESHNICK, S. R.; **Gen. Pharmac.** v. 27, p. 587, 1996.

KINGSTON, D. G. I.; **Pharmac. Ther.** v. 52, p. 1, 1991.

KUMAR RK. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy. **Pharmacol Ther** . v.91, p.93-104, 2001.

LANGELAND T, HARBITZ O. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. V. Purification and identification of a major allergen (antigen 22) in hen's egg white. **Allergy**. v.38, p.131–9, 1993.

LEE JS et al. D-pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma. **FEBS Lett** , v.581, p. 57-64, 2007.

LEIGH, R et al.. Is interleukin-13 critical in maintaining airway hyperresponsiveness in allergenchallenged mice? **Am.J.Respir.Crit Care Med** , v. 170, p. 851-856, 2004.

LENTSCH AB et al. In Vivo Suppression of NF κ B and Preservation of I κ B α by Interleukin-10 and Interleukin-13. **J. Clin. Invest**, v. 100, p. 2443–2448, 1997.

LOWRY OH et al. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** v.193 , p.265-275, 1951.

MATTES J et al. IL-13 induces airways hyperreactivity independently of the IL-4 R alpha chain in the allergic lung. **J Immunol** , v. 167, p. 1683–92, 2001.

MEDEIROS KC et al. Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. **J Ethnopharmacol** , v.119(1), p. 41-6, 2008.

MELO PS et al. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicol Lett**, v. 142 (1-2), p.143-51. 2003.

MILIÁN E, DÍAZ AM. Allergy to house dust mites and asthma. **P R Health Sci J.** v.23(1):47-57, 2004.

MORAES, LÍLLIAN S et al . Fatores de risco, aspectos clínicos e laboratoriais da asma em crianças. **J. Pediatr.** v.77, p. 447-454, 2001.

- MOORE KW et al. Interleukin-10 and the interleukin- 10 receptor. **Annu Rev Immunol** , v. 19 , p. 683–765, 2001
- MUKHERJEE R, KEIFER PA. Warifteine and methylwarifteine: H-1 and C-13 assignments by two-dimensional NMR spectroscopy. **Magn Reson Chem.** v.41(3), p.213-218, 2003.
- MULLIGAN, MS et al. Protective effects of IL-4, IL-10, IL-12 and IL-13 in IgG immune complex-induced lung injury: role of endogenous IL-12. **J. Immunol** , v.159, p. 3483–3489, 1997.
- NADEL, J. A. & BUSSE, W. W. Asthma. **Am.J.Respir.Crit Care Med.** v.157, p.130-138, 1998.
- NJIRA L. LUGOGO et al. Epidemiology of Asthma. **Clin. Chest Med** v.27, p. 1 – 15,
- PEARLMAN DS. Pathophysiology of the inflammatory response. **J. Allergy Clin. Immunol** , v. 104 , p.132–137, 1999.
- PIUVEZAM MR et al. *Cissampelos sympodialis* Eichl. leaf extract increases the production of IL-10 by concanavalin-A treated BALB/c spleen cells, **J Ethnopharmacol.** v. 67 , p.93–101, 1999.
- PORTO, N. M.; BASÍLIO, I. J. L. D.; AGRA, M. F. Estudo farmacobotânico de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 102-107, 2008.
- PLATTS-MILLS TAE et al: Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. **J Allergy Clin Immunol**, v. 100 , p.2-24, 1997.
- PRIETO J et al. Increased interleukin-13 mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells of atopic patients with mild asthma after repeated low dose allergen provocations. **Respir Med** , v. 94, p. 806-814, 2000.
- PROUST, B et al. Persistence of bronchopulmonary hyper-reactivity and eosinophilic lung inflammation after anti-IL-5 or -IL-13 treatment in allergic BALB/c and IL-4 α knockout mice. **Clin.Exp.Allergy**, v. 33, p. 119-131, 2003.
- REED, C. AND TOWNLEY, R. G. Asthma L classification and pathogenesis, in **Allergy: Principles and Practice**, St. Louis. Middleton, E., Jr., Reed, C. E., and Ellis, E. F., eds. CV Mosby, p. 811–831,1983.
- RESNICK, M.B., AND P.F. WELLER. Mechanisms of eosinophil recruitment. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol** , v.8, p. 349–355, 1993.
- ROBINSON DS. Regulatory T cells and asthma. **Clinical & Experimental Allergy** , v. 39 , p. 1314–1323, 2009.

ROGERIO AP et al. Anti-inflammatory effects of Lafoensia pacari and ellagic acid in a murine model of asthma. **Eur J Pharmacol** , v. 580 , p. 262-70, 2008.

ROTHENBERG ME. Eosinophilia. **N Engl J Med** . v.338, p. 1592-600, 1998.
SATO et al 2002

RUSSELL B. **História do pensamento ocidental**. São Paulo: Ed. Publicações S/A; 2001.

SOHN SH et al. Inhibition effects of Vitex rotundifolia on inflammatory gene expression in A549 human epithelial cells. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 103(2), p. 152-9, 2003.

STEIN ML et al. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy reduces eosinophil activation ex vivo and increases IL-5 and IL-5 receptor levels. **J Allergy Clin Immunol**, v. 121, p. 1473-83, 2008.

STRATH M, WARREN DJ, SANDERSON CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **J Immunol Methods**. v.83, p. 209-215, 1985.

TANG E, WIESCH D, SAMET J. Epidemiology of asthma and allergic disease. In: Adkinson Jr NF, Yunginger JW, Busse WW, et al, editors. **Middleton's allergy: principles and practice**. Philadelphia Mosby, V.6 , P. 1127 – 44 , 2003.

TOWNLEY, R. G., DENNIS, M., AND ITKIN, J. M. Comparative action of acetyl-beta-methacholine, histamine and pollen antigens in subjects with hay fever and patients with bronchial asthma. **J. Allergy** v. 36, p. 121–137, 1965.

TOWNLEY, R. G et al. M. Methacholine inhalation challenge studies. **J. Allergy Clin. Immunol**. v. 64, p.569–574, 1979.

THOMAS, G. et al . Preliminary studies on the hydroalcoholic extract of the root of Cissampelos sympodialis Eichl in guinea-pig tracheal strips and bronchoalveolar leucocytes. **Phytotherapy Research**, v. 9, p. 473-477, 1995.

THOMSEN AR et al. The status of half-cystine residues and locations of N-glycosylated asparagine residues in human eosinophil peroxidase. **Arch Biochem Biophys**, v. 379, p. 147-152, 2000.

TURNER H, KINET JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor FcεRI. **Nature**, v. 402, p. 24–30, 1999.

UMETSU DT, DE KRUYFF RH. Interleukin-10: The missing link in asthma regulation? **Am J Respir Cell Mol Biol** , v. 21, p. 562-3, 1999.

U.S. Department of Health and Human Services - Centers for Disease Control and Prevention - National Center for Health Statistics E-Stats – Division of Data Services – Fact Sheet. Disponível na Internet via www. Arquivo capturado em 29 de maio de 2008.

VASCONCELOS JF et al. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. **International Immunopharmacology**. v. 8, p.1216–1221, 2008.

VIEIRA-DE-ABREU A et al. Anti-allergic properties of the bromeliaceae *Nidularium procerum*: inhibition of eosinophil activation and influx. **Int Immunopharmacol**, v. 5(13-14): 1966-1974, 2005.

XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical and I Encontro de Medicina Tropical. 2005. Florianópolis, Brasil. Obtenção de modelo experimental de alergia respiratória a *Blomia tropicalis* para investigação de adjuvantes da resposta TH1 voltados para aplicação em vacinas e imunoterapia contra enfermidades alérgicas. Maio 6-10, 2005; Eds. TeC Art, Revista Brasileira de Medicina Tropical; p. 430-431.

YANG, G et al. Anti-IL-13 monoclonal antibody inhibits airway hyperresponsiveness, inflammation and airway remodeling. **Cytokine**, v. 28, p. 224-232 , 2004.

YASUE M et al: Inhibition of airway in rDer f 2-sensitized mice by oral administration of recombinant Der f 2. **Cell Immunol**, v. 181:30–37, 1997.

WOOLCOCK, A. J., SALOME, C. M.; YAN, K. The shape of the dose-response curve to histamine in asthmatic and normal subjects. **Am.Rev.Respir.Dis.** v.130 ,p.71-75,1984.

WYNN TA. IL-13 effector functions. **Annu Rev Immunol** , v. 21, p. 425–456, 2003.