

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
Mestrado em Imunologia

Alessa Sin Singer Brugiolo

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Echinodorus grandiflorus* NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NO MODELO DE ALERGIA PULMONAR INDUZIDA POR OVA**

Juiz de Fora  
2010

Alessa Sin Singer Brugiolo

**Avaliação do efeito do extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus* na modulação da resposta imune no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Imunologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ferreira

Juiz de Fora

2010

Brugiolo, Alessa Sin Singer.

Avaliação do efeito do extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus* na modulação da respostas imune no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA / Alessa Sin Singer Brugiolo. – 2010.

90 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Asma. 2. Alergia e imunologia. 3. Linfócitos. I. Título.

CDU 616.248

Alessa Sin Singer Brugiolo

**Avaliação do efeito do extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus* na modulação da resposta imune no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Imunologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em: 11/03/2010.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Ana Paula Ferreira (Orientadora)  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Profa. Dra. Lucila Grossi Gonçalves Pacifico  
FIOCRUZ – Centro de Pesquisas René Rachou

---

Profa. Dra. Jacy Gameiro  
Universidade Federal de Juiz de Fora

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Dra. Ana Paula Ferreira pela orientação, pela paciência, pelo carinho e pela confiança depositada ao encarar o desafio de estabelecer um novo modelo de pesquisa. Obrigada pelo exemplo de dedicação, seriedade e paixão pela Imunologia, que você faz crescer dentro de todos nós.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia do ICB-UFJF, Dr. Henrique Couto Teixeira, que tanto contribuiu para o meu crescimento e para a realização deste trabalho e Dra. Jacy Gameiro por ter me “adotado” logo que chegou à UFJF, pelos esclarecimentos, pela certeza do sorriso sincero e pela imensa boa vontade.

À Dra. Maria Aparecida de Souza, professora da Universidade Federal de Uberlândia, pelos ensinamentos, pela paciência, pelo carinho e por ter me ajudado tanto nos meus primeiros meses de laboratório.

À Dra. Lucila Grossi Gonçalves Pacífico, pesquisadora da FIOCRUZ, por quem tenho grande admiração, pela disponibilidade, pelas sugestões e pela contribuição na realização dos experimentos.

Aos professores Daniel Sales Pimenta, do Departamento de Botânica do ICB-UFJF, e Sônia Sin Singer Brugiolo, do Departamento de Zoologia do ICB-UFJF, pela sugestão de trabalhar com *Echinodorus grandiflorus*, pelo extrato e pelas valiosas informações sobre a planta.

Aos professores Elita Scio Fontes e Rodrigo Luiz Fabri, do Departamento de Bioquímica do ICB-UFJF, pela determinação do perfil cromatográfico e pela avaliação qualitativa do extrato aquoso de *E. grandiflorus*.

À professora Beatriz Julião Vieira Aarestrup, do Departamento de Morfologia do ICB-UFJF, e à Michele Fernandes Rodrigues, colega de laboratório, pelo auxílio na realização da análise histopatológica.

Aos pesquisadores da EMBRAPA-CNPGL, Ana Luisa Sousa Azevedo pela disponibilização do citômetro de fluxo e Marco Antonio Machado e Robert Domingues pela colaboração na realização do RT-PCR em tempo real.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia que me receberam tão bem. Obrigada pela presença, pelo companheirismo, pelas sugestões, pelas risadas, e, é claro,

pelas ricas discussões “imunológicas”. Agradeço especialmente ao Caio, à Ana Cláudia e à Alyria, pela imensa ajuda nos experimentos realizados.

Aos meus pais, Sônia e José Geraldo e Sílvia e João, pelo exemplo de vida e pelo incentivo constante. Aos meus irmãos, Inessa e Alexandre, Andressa e Felipe, por estarem sempre por perto e tornarem tudo mais divertido. À Fanny, Nalla e Maria Clara pela presença e amor incondicional.

Ao Gustavo pela imensa paciência, pela ajuda carinhosa, pela ótima companhia, pela alegria com que recebeu todas as minhas vitórias, pelo amparo em cada dúvida. Obrigada por compartilhar os meus sonhos.

À minha família “emprestada”, Vera e Gilson, Patrícia e Rogerinho, e aos meus queridos amigos, pessoas que transformaram essa estrada em um aprendizado constante. Obrigada pela torcida.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, ao Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia do ICB-UFJF e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

*“Renda-se, como eu me rendi.  
Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei.  
Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento. ”*

**Clarice Lispector**

## RESUMO

A asma é uma doença caracterizada por obstrução intermitente das vias aéreas e inflamação crônica e afeta cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo. É considerada um grave problema de saúde, trazendo consigo um grande encargo econômico. A resposta imunológica na asma é predominantemente de linfócitos Th2, com altos níveis de IgE total e alérgeno-específica e eosinofilia brônquica. O tratamento da asma visa ao controle da doença e os medicamentos utilizados atualmente apresentam efeitos colaterais sistêmicos e, em geral, não são eficazes nos casos de asma de difícil controle. Neste trabalho, foi investigado o efeito do extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus*, planta utilizada pela população por suas propriedades diurética e anti-inflamatória, no modelo de alergia pulmonar no qual camundongos BALB/c foram sensibilizados e desafiados com OVA. O tratamento com o extrato por via oral reduziu marcadamente o número de neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilos no lavado bronco-alveolar (LBA), a atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) no tecido pulmonar, os níveis de IgE específica para OVA no soro, os níveis de CCL11 e a expressão gênica de IL-4 e IL-13 no tecido pulmonar e a expressão de CD25 em células do LBA. Entretanto, o tratamento não alterou o infiltrado inflamatório e o número de eosinófilos no tecido pulmonar, os níveis das quimiocinas CCL2 e CCL5, das citocinas IL-4, IL-13, IL-10 e IL-17A e a expressão gênica de Foxp3 no tecido pulmonar e a expressão de CD28 e CD152 nas células do LBA. Esses resultados sugerem que o extrato aquoso de *E. grandiflorus* é capaz de modular alguns aspectos da inflamação pulmonar alérgica e pode ser útil no tratamento da asma.

Palavras-chave: Asma. Alergia pulmonar. *Echinodorus grandiflorus*. IgE. Linfócitos Th2.

## ABSTRACT

Asthma is a disease characterized by intermittent obstruction of the airways and chronic inflammation and affects about 300 million people around the world. It is considered a serious health problem, bringing a large economic burden. The immune response in asthma is predominantly Th2 lymphocytes, with high levels of total and allergen-specific IgE and bronchial eosinophilia. Asthma treatment is aimed at controlling the disease and the drugs used currently have systemic side effects and generally are not effective in cases of asthma are difficult to control. In this study we investigated the effect of aqueous extract of *Echinodorus grandiflorus*, plant used in folk medicine for its diuretic and anti-inflammatory properties, in the model of lung allergy in which BALB/c mice were sensitized and challenged with OVA. Oral treatment with the extract markedly reduced the number of neutrophils, lymphocytes, macrophages and eosinophils in bronchoalveolar lavage (BAL), the activity of eosinophil peroxidase (EPO) in lung tissue, levels of OVA-specific IgE in serum, levels of CCL11 in lung tissue, the gene expression of IL-4 and IL-13 in lung tissue and the expression of CD25 on BAL cells. However, the treatment did not alter the inflammatory infiltrate and the number of eosinophils in lung tissue, levels of chemokines CCL2 and CCL5, levels of cytokines IL-4, IL-13, IL-10 and IL-17A and gene expression of Foxp3 in the lung tissue and the expression of CD28 and CD152 on BAL cells. These results suggest that the aqueous extract of *E. grandiflorus* is able to modulate some aspects of allergic pulmonary inflammation and may be useful in the treatment of asthma.

Keywords: Asthma. Pulmonary allergy. *Echinodorus grandiflorus*. IgE. Th2 lymphocytes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Hipótese da higiene original e modificada .....	17
Figura 2	Resposta imune na asma .....	18
Figura 3	Distribuição geográfica de <i>Echinodorus grandiflorus</i> .....	28
Figura 4	<i>Echinodorus grandiflorus</i> : aspecto das folhas .....	29
Figura 5	<i>Echinodorus grandiflorus</i> : aspectos da inflorescência com flores em antese .....	29
Figura 6	Desenho experimental .....	36
Figura 7	Equipamento utilizado para nebulização .....	36
Figura 8	Amostras de parênquima pulmonar de camundongos BALB/c (aumento de 250X) .....	46
Figura 9	Amostras de parênquima pulmonar de camundongos BALB/c (aumento de 400X) .....	47
Figura 10	Número de eosinófilos no tecido pulmonar .....	48
Figura 11	Atividade da EPO no homogenato de tecido pulmonar .....	49
Figura 12	Níveis de quimiocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar .....	50
Figura 13	Níveis de IgE específica para OVA no soro .....	51
Figura 14	Contagem total e específica de células no LBA .....	53
Figura 15	Expressão de CD25 nas células do LBA .....	55
Figura 16	Expressão de CD28 nas células do LBA .....	57
Figura 17	Expressão de CD152 nas células do LBA .....	59
Figura 18	Níveis das citocinas IL-4, IL-13, IL-10 e IL-17A no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar .....	60
Figura 19	Expressão gênica de IL-4 e IL-13 nas amostras de tecido pulmonar .....	61
Figura 20	Expressão gênica de Foxp3 nas amostras de tecido pulmonar .....	62
Figura A1	Gráfico obtido no 2100 Bioanalyser demonstrando a integridade do RNA .....	87
Figura A2	Curva de dissociação do gene HPRT .....	90
Figura A3	Curva de dissociação do gene IL-13 .....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupos experimentais .....	37
Tabela A1	Nome e sequência dos oligonucleotídeos usados como <i>primers</i> e tamanho do produto final amplificado ( <i>amplicon</i> ) .....	88
Tabela A2	Quantidade de cDNA, concentração de <i>primer</i> e temperatura de dissociação de cada gene analisado .....	89
Tabela A3	Eficiência das reações de PCR .....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Alergia Pulmonar
APCs	“Antigen Presenting Cells”, Células Apresentadoras de Antígenos
CD	“Cluster of Differentiation”
cDNA	DNA complementar
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Ct	“Cycle threshold”
CTLA-4	“Cytotoxic T Lymphocyte-Associated 4”
DNA	“Deoxyribonucleic Acid”, Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Ótica
EAEg	Extrato Aquoso de <i>Echinodorus grandiflorus</i>
ECP	“Eosinophil Cationic Protein”, Proteína Catiônica Eosinofílica
EDN	“Eosinophil-derived Neurotoxin”, Neurotoxina Derivada de Eosinófilos
EDTA	“Ethylenediamine Tetraacetic Acid”, Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
EPO	“Eosinophil Peroxidase”, Peroxidase Eosinofílica
Foxp3	“Forkhead Box P3”
GATA-3	“GATA binding protein 3”
HE	Hematoxilina e Eosina
HPRT	“Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase”
HTAB	Hexadeciltrimetil brometo de amônio
I $\kappa$ B $\alpha$	“NF-kappa-B inhibitor alfa”
i.p.	intraperitoneal
IFN- $\gamma$	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LBA	Lavado Bronco-alveolar
MBP	“Major Basic Protein”, Proteína Básica Principal
MCP-1	“Monocyte Chemotactic Protein-1”
MHCII	“Major Histocompatibility Complex II”, Complexo de Histocompatibilidade Principal II

MIF	Média de Intensidade de Fluorescência
NF- $\kappa$ B	“Nuclear Factor kappa-B”
NK	“Natural Killer”
NO	Óxido nítrico
OPD	“o-phenylenediamine”, o-fenilenodiamina
OVA	Ovalbumina
PBS	“Phosphate Buffered Saline”, Solução de Tampão Fosfato
PBST	PBS-Tween 20
PCR	“Polymerase Chain Reaction”, Reação em Cadeia da Polimerase
PE	“Phycoerythrin”
PerCP	“Peridinin-chlorophyll-protein Complex”
RANTES	“Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted”
REST	“Relative Expression Software Tool”
RIN	“RNA integrity number”
RNA	“Ribonucleic Acid”, Ácido Ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
ROS	“Reactive Oxygen Species”, Espécies Reativas de Oxigênio
RT-PCR	“Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction”, Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa
SFB	Soro Fetal Bovino
TCR	“T cell receptor”, Receptor de Células T
TD	Temperatura de Dissociação
TGF- $\beta$	“Transforming Growth Factor beta”
Th	Linfócitos T “helper”
TNF- $\alpha$	“Tumor Necrosis Factor alfa”
Tregs	Linfócitos T reguladores
v.o.	via oral

## SUMÁRIO

<b>1 JUSTIFICATIVA</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
<b>2.1 Asma</b> .....	15
2.1.1 Considerações gerais .....	15
2.1.2 Resposta imunológica .....	18
2.1.3 Tratamento .....	22
2.1.4 Modelo murino de alergia pulmonar .....	23
2.1.5 Farmacologia experimental em modelo murino de alergia pulmonar .....	25
<b>2.2 <i>Echinodorus grandiflorus</i></b> .....	27
2.2.1 Considerações gerais .....	27
2.2.2 Etnofarmacologia .....	30
2.2.3 Toxicidade, farmacologia experimental e constituintes químicos .....	30
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	33
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	33
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	33
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
<b>4.1 Animais</b> .....	34
<b>4.2 Material vegetal e preparação do extrato aquoso de <i>Echinodorus grandiflorus</i></b> .....	34
<b>4.3 Delineamento experimental</b> .....	35
4.3.1 Modelo de alergia pulmonar induzida por OVA .....	35
4.3.2 Grupos experimentais e tratamentos .....	36
4.3.3 Obtenção de material biológico .....	37
4.3.4 Análise histopatológica .....	38
4.3.5 Determinação da atividade da peroxidase eosinofílica no tecido pulmonar .....	39
4.3.6 Dosagem de quimiocinas e citocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar .....	40
4.3.7 Detecção de anticorpo específico para OVA .....	41
4.3.8 Contagem total e específica de leucócitos no lavado bronco-alveolar ....	41

4.3.9 Expressão de marcadores celulares nas células do lavado bronco-alveolar .....	42
4.3.10 Extração de RNA e síntese de cDNA .....	42
4.3.11 RT-PCR em tempo real .....	43
<b>4.4 Análise estatística .....</b>	<b>44</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1 Análise histopatológica .....</b>	<b>45</b>
<b>5.2 Atividade da peroxidase eosinofílica no tecido pulmonar .....</b>	<b>48</b>
<b>5.3 Níveis de quimiocinas no homogenato de tecido pulmonar .....</b>	<b>49</b>
<b>5.4 Detecção de anticorpo específico para OVA .....</b>	<b>50</b>
<b>5.5 Contagem total e específica de leucócitos no lavado bronco-alveolar .....</b>	<b>51</b>
<b>5.6 Expressão de marcadores celulares nas células do lavado bronco-alveolar .....</b>	<b>54</b>
<b>5.7 Níveis de citocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar .....</b>	<b>60</b>
<b>5.8 Expressão gênica de IL-4 e IL-13 .....</b>	<b>61</b>
<b>5.9 Expressão gênica de Foxp3 .....</b>	<b>62</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>74</b>
<b>8 PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>86</b>

## 1 JUSTIFICATIVA

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas que afeta cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo. Apesar dos avanços no entendimento da sua fisiopatologia e na terapêutica específica para esta doença, existem evidências de que a asma está se tornando cada vez mais grave e problemática, sendo inquestionável o risco de morte em razão de uma crise de broncoespasmo. Atualmente, o tratamento da asma visa ao controle da doença e os medicamentos utilizados apresentam efeitos colaterais sistêmicos que, em geral, são observados com a utilização de doses elevadas por tempo prolongado. Além disso, essas medicações não são eficazes nos casos de asma de difícil controle, existindo a necessidade do desenvolvimento de novas drogas.

Quanto à *Echinodorus grandiflorus*, sabe-se que é uma planta muito utilizada pela população para tratamento de diversas enfermidades. O chá das folhas é utilizado principalmente por seus efeitos diurético, hipotensor e anti-inflamatório, e, embora muitas pesquisas tenham demonstrado seus efeitos antinociceptivos, anti-inflamatórios, diuréticos, anti-hipertensivos e vasodilatadores, dentre outros, em modelos *in vitro* e *in vivo*, não foram encontrados na literatura consultada estudos sobre seus efeitos em modelos de alergia pulmonar.

Considerando que a asma é uma doença inflamatória e que *E. grandiflorus* apresenta grande potencial anti-inflamatório, o objetivo do presente trabalho foi verificar a ação desta planta sobre o quadro pulmonar característico da asma, mimetizado em modelo murino.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Asma

#### 2.1.1 Considerações gerais

A asma é um distúrbio respiratório no qual as vias aéreas inferiores apresentam obstrução intermitente acompanhada por inflamação crônica. A obstrução é em parte devido à hiperresponsividade brônquica em resposta a diversos estímulos. A redução do diâmetro dos brônquios prejudica a passagem de ar para os pulmões, sendo assim, as manifestações clínicas são principalmente os episódios recorrentes de sibilância, a dispnéia e a sensação de aperto no peito. A obstrução brônquica é agravada pela inflamação crônica, hipersecreção de muco e remodelamento das vias aéreas (revisado por BUKSTEIN *et al.*, 2006; revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005).

Considerada um grave problema de saúde, estima-se que a asma afete mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo, acarretando cerca de 250 mil mortes por ano, acometendo indivíduos de ambos os sexos e de todas as idades, grupos raciais, culturas e níveis econômicos (GINA, 2007). No Brasil, segundo dados da Organização Mundial de Saúde descritos nas DIRETRIZES BRASILEIRAS NO MANEJO DA ASMA (2006), a asma é responsável por cerca de 350.000 internações por ano, constituindo-se na quarta causa de hospitalização pelo Sistema Único de Saúde (SUS). O risco de morte de um paciente como resultado de uma crise aguda de broncoespasmo é estimada em 18 por 1.000.000 de indivíduos (revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005). Dados do “The International Study of Asthma and Allergies in Childhood”, que investigou de maneira extensiva a prevalência da asma no mundo, revelaram que em países industrializados, de cultura ocidental e de língua inglesa, e em alguns países da América Latina, como, por exemplo, o Brasil e o Peru, a prevalência de asma é maior do que em países em desenvolvimento (revisado por PONTE, RIZZO e CRUZ, 2007).

Embora a causa precisa para o desenvolvimento da asma seja desconhecida, parece resultar de uma interação entre fatores genéticos e exposição ambiental a estímulos irritantes, tais como endotoxinas bacterianas, alérgenos, fumaça de cigarro e pêlos de animais (revisado por BUKSTEIN *et al.*, 2006). Adicionalmente, o estilo de vida do indivíduo, que está relacionado à dieta, hábitos sociais e ambiente de trabalho, possui significância para o desenvolvimento da doença (revisado por CORRÊA, MELO e COSTA, 2008).

Os fatores genéticos são importantes para explicar a variabilidade da prevalência da asma no mundo, entretanto, a genética não explica o acentuado crescimento recente da prevalência da asma verificado em vários países, o que provavelmente está relacionado com mudanças ambientais ocorridas nas últimas décadas. De acordo com a “hipótese da higiene”, as melhorias sanitárias, associadas à menor incidência de infecções virais e infestações parasitárias e a incorporação de novas vacinas nos programas de saúde levam a um direcionamento do sistema imune para um fenótipo de linfócitos T helper 2 (Th2) e são acompanhadas por um aumento na incidência de doenças atópicas. Os resultados de diversas pesquisas confirmam esta hipótese, entretanto, os mecanismos imunológicos envolvidos neste processo ainda não foram esclarecidos (revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005; revisado por PONTE, RIZZO e CRUZ, 2007).

Evidências de pesquisas independentes sugerem que a hipótese da higiene da maneira atual simplifica muito o papel dos sinais derivados de patógenos no desenvolvimento e na modulação das doenças alérgicas, o que levou ao desenvolvimento da “hipótese da higiene modificada”, na qual o aumento na frequência da asma é devido à reduzida incidência de certas infecções como hepatite A, enquanto certas infecções respiratórias, causadas, por exemplo, pelo vírus sincicial respiratório e vírus influenza, favorecem o seu desenvolvimento (revisado por SCHRÖDER e MAURER, 2007). As diferenças entre a hipótese da higiene original e modificada podem ser vistas na Figura 1.

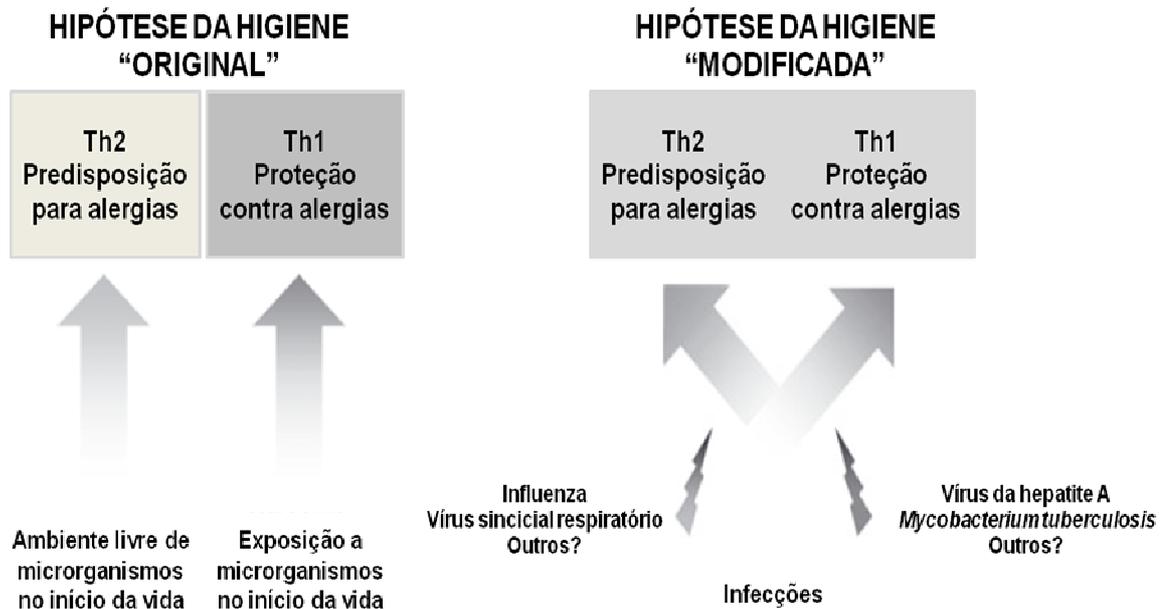


Figura 1. Hipótese da higiene original e modificada. Adaptado de Schröder e Maurer, 2007.

Em relação aos tipos de asma, podemos diferenciar a asma em alérgica ou não alérgica, de acordo com os fatores etiológicos envolvidos no seu desenvolvimento. Quando a asma é causada por um alérgeno é referida como alérgica, atópica ou asma extrínseca e é caracterizada por aumento de imunoglobulina (Ig) E no soro e acúmulo e ativação de linfócitos Th2, eosinófilos e mastócitos. Quando a causa é outra que não os alérgenos, como por exemplo a realização de exercícios físicos, a asma é referida como não atópica e é caracterizada por acúmulo de células IL-8<sup>+</sup>, neutrófilos e mastócitos, sem elevação dos níveis de IgE no soro (revisado por IWAKURA *et al.*, 2008; revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005).

Outro fator importante a ser considerado é o grande encargo econômico imposto pela doença, incluindo tanto custos diretos, como hospitalizações e serviços médicos, quanto custos indiretos, como perda de dias de escola e trabalho. A asma causa sério impacto na qualidade de vida, restringindo significativamente as atividades do indivíduo (revisado por BUKSTEIN *et al.*, 2006).

### 2.1.2 Resposta imunológica

Uma das funções do sistema imune é proteger o indivíduo contra agentes infecciosos e o funcionamento inadequado deste sistema pode levar ao desenvolvimento de doenças, como as alergias (revisado por PONTE, RIZZO e CRUZ, 2007). A asma alérgica é caracterizada por uma resposta de hipersensibilidade imediata, sendo a sequência típica de eventos iniciada com a exposição a um alérgeno, por via inalatória (revisado por AVERBECK *et al.*, 2007). Essa resposta é predominantemente de células Th2, com altos níveis de IgE total e alérgeno-específica, eosinofilia brônquica e produção de citocinas de perfil Th2 (VIEIRA *et al.*, 2007). Um esquema com as principais células e moléculas envolvidas na resposta imune na asma pode ser observado na Figura 2.

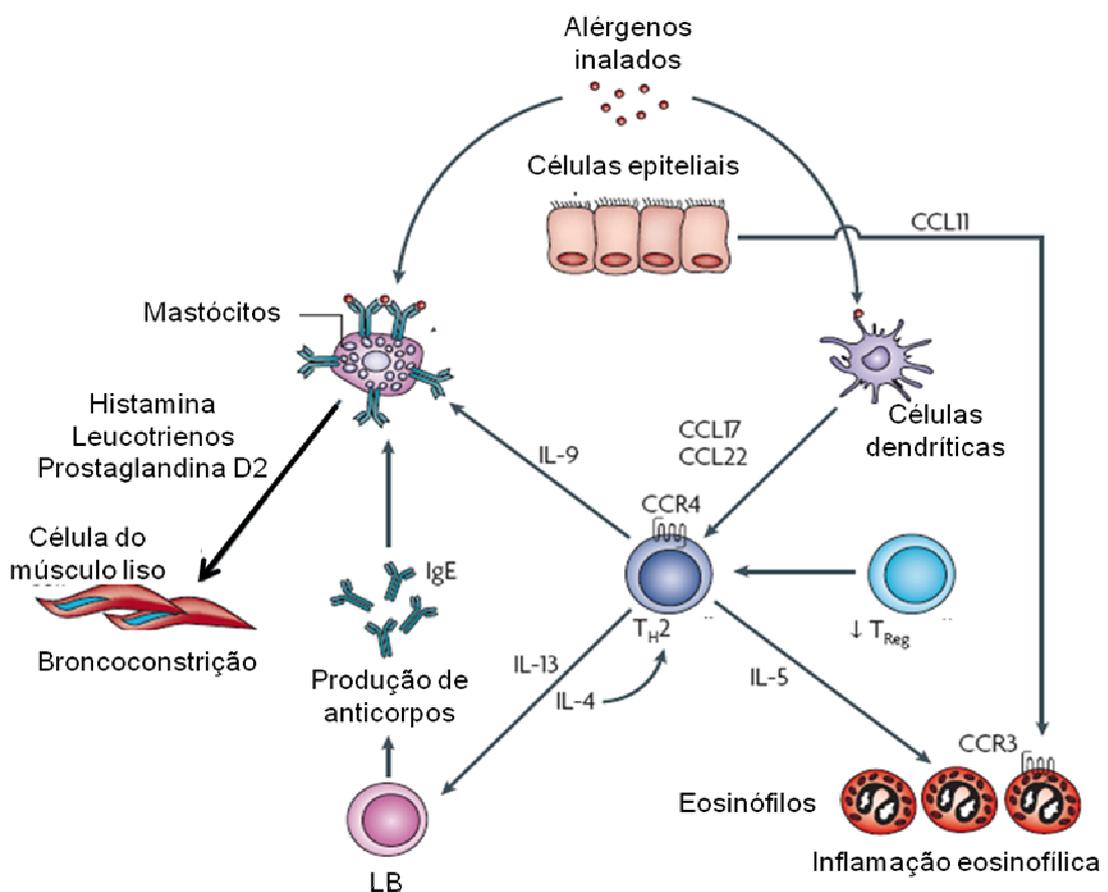


Figura 2. Resposta imune na asma. Modificado de Barnes, 2008.

Os alérgenos inalados são processados por células dendríticas que, por sua vez, liberam as quimiocinas CCL17 e CCL22, que interagem com seus receptores CCR4 nos linfócitos, atraindo essas células para o sítio inflamatório (revisado por BARNES, 2008). Os linfócitos T e B são cruciais no desenvolvimento da asma. Em pacientes asmáticos foi observado aumento do número de células T CD4<sup>+</sup> nas vias aéreas, com predomínio de linfócitos Th2. A diferenciação das células “naive” em linfócitos Th2 é regulada pela ligação do seu receptor TCR (receptor da célula T) e da molécula co-estimuladora CD28 nas células apresentadoras de antígenos (APCs) (revisado por BARNES, 2008).

Os linfócitos Th2 liberam as citocinas interleucina-4 (IL-4), que leva à troca de isotipo para IgE pelos linfócitos B, IL-5, que recruta e ativa eosinófilos, IL-13, que tem sido associada ao desenvolvimento de hiperresponsividade das vias aéreas e IL-9, que é quimioatratante e ativador de mastócitos (revisado por BARNES, 2008; revisado por RENAULD, 2001).

Os linfócitos B produzem IgE alérgeno-específica em grandes quantidades e esta IgE se liga a receptores de alta afinidade para a porção Fc de IgE (FcεRI) presente em mastócitos e basófilos, é a chamada fase de sensibilização da hipersensibilidade imediata. Quando o indivíduo entra em contato novamente com o antígeno e este se liga à IgE, os mastócitos e basófilos são ativados (revisado por BARNES, 2008).

Os mastócitos da mucosa são recrutados para a superfície das vias aéreas, através de moléculas liberadas pelas células epiteliais e após ativação, liberam mediadores inflamatórios, incluindo histamina, mediadores lipídicos, como os leucotrienos C4, D4 e E4 e a prostaglandina D2, além de citocinas inflamatórias. A liberação dessas moléculas leva ao aumento da permeabilidade vascular e à contração da musculatura lisa, caracterizando a fase efetora da hipersensibilidade imediata (revisado por AVERBECK *et al.*, 2007).

As células epiteliais das vias aéreas liberam ainda a quimiocina CCL11 (eotaxina), envolvida no recrutamento de eosinófilos via CCR3 (revisado por LLOYD e RANKIN, 2003; revisado por ROLLINS, 1997). Os eosinófilos, por sua vez, estão associados a condições alérgicas e respostas imunes contra infestações helmínticas e contêm proteínas catiônicas armazenadas nos grânulos do seu citoplasma, incluindo a peroxidase eosinofílica (EPO), proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), capazes

de induzir lesão tecidual e disfunção. Além disso, os grânulos dos eosinófilos possuem quimiocinas pré-formadas, fatores de crescimento e diversas citocinas. Essas proteínas são rápida e seletivamente secretadas em resposta a diferentes estímulos, o que é fundamental para as atividades dos eosinófilos. Em conjunto, os constituintes dos grânulos dos eosinófilos podem ser de grande importância para explicar o broncoespasmo, o edema e os danos vistos no tecido na inflamação alérgica (revisado por NEVES e WELLER, 2009; revisado por EGESTEN *et al.*, 2001).

Além da CCL11, diversas quimiocinas estão envolvidas na resposta alérgica. Nos modelos de inflamação pulmonar ocorre, logo após o desafio com OVA (ovalbumina) em animais previamente sensibilizados, migração de monócitos e macrófagos para o tecido pulmonar em associação com a expressão de CCL2 (MCP-1, Monocyte Chemotactic Protein-1). Em seguida, ocorre acúmulo de eosinófilos e linfócitos em associação com a expressão de CCL5 (RANTES, Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted) e CCL11 (eotaxina) (revisado por ROLLINS, 1997). Na asma, fatores quimiotáticos são secretados principalmente pelas células epiteliais das vias aéreas (revisado por BARNES, 2008).

Outras moléculas importantes na regulação da função das células T são CD28 e CD152 (CTLA-4, "cytotoxic T lymphocyte-associated 4"). Esses receptores são expressos predominantemente na superfície das células T e interagem com seus ligantes, CD80 e CD86, encontrados nas APCs. Embora tenham similaridade estrutural, as funções de CD28 e CD152 parecem quase completamente opostas, com CD28 desenvolvendo um papel importante na promoção da resposta dos linfócitos T, enquanto o CD152 atua como um inibidor de ativação (revisado por SANSOM e WALKER, 2006).

A persistência de uma resposta Th2, com lesão repetida das vias aéreas seguida por processo de reparação excessivo, leva ao remodelamento das mesmas, caracterizado por deposição de colágeno e fibras elásticas, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, hipertrofia das glândulas produtoras de muco e aumento da vascularização (revisado por HOGAN *et al.*, 2008; revisado por BARNES, 2008; VIEIRA *et al.*, 2007).

Nos últimos anos tem ficado claro que o desequilíbrio do sistema imunológico ocorrido nas respostas alérgicas não pode ser explicado somente pela

predominância de uma resposta Th2 em detrimento de uma resposta Th1, havendo participação tanto de linfócitos T reguladores (Tregs) quanto da subpopulação de linfócitos Th17 nesse processo (revisado por BARNES, 2008).

Quanto aos linfócitos Tregs, podemos dividi-los em duas categorias principais. Os primeiros são linfócitos Tregs que ocorrem naturalmente, derivam do timo e expressam CD4 e CD25, além de altos níveis do fator de transcrição Foxp3, o qual é essencial para o seu desenvolvimento e função, dependente de contato celular. A outra subpopulação de linfócitos T reguladores é antígeno-específica e pode ser induzida sob condições particulares de estimulação antigênica *in vitro* e *in vivo*, secretam citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e/ou TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) e regulam as respostas imunes e patologias inflamatórias (revisado por HAWRYLOWICZ e O'GARRA, 2005). Os linfócitos Tregs são componentes importantes da homeostase do sistema imune e atuam normalmente suprimindo respostas Th2 para alérgenos, sendo assim, a deficiência na atividade dessas células pode estar relacionada ao desenvolvimento de doenças alérgicas (revisado por SHI e QIN, 2005).

A subpopulação de linfócitos Th17 produz principalmente a citocina IL-17 e coordena a inflamação tissular através da indução de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alfa). Alguns estudos sugerem que essas células estão envolvidas no desenvolvimento de doenças auto-imunes e alérgicas, entretanto, o seu papel nessas últimas permanece controverso (BURGLER *et al.*, 2009). Por um lado, autores sugerem que existe uma possível contribuição dos linfócitos Th17 e da IL-17A na patogênese da asma crônica e mudanças vistas no remodelamento das vias aéreas, além de induzir a liberação de citocinas e quimiocinas por eosinófilos, amplificando a inflamação alérgica e atuando de forma sinérgica às citocinas Th2 (HERBERT *et al.*, 2008; revisado por HUNG *et al.*, 2008). Por outro lado, diferentes estudos reportaram que a IL-17A tem pouca ou nenhuma contribuição ou papel regulador no modelo de eosinofilia pulmonar predominantemente Th2, sendo de maior importância no modelo de alergia pulmonar neutrofílica não Th2 (revisado por HUNG *et al.*, 2008; SCHNYDER-CANDRIAN *et al.*, 2006). Adicionalmente, foi demonstrado que a sensibilização intraperitoneal com alúmen induz a uma fraca resposta de células Th17 e recrutamento de neutrófilos (revisado por IWAKURA *et al.*, 2008).

### 2.1.3 Tratamento

Considerando as características da resposta imune na asma e sabendo que não há cura para a doença até o momento, o principal objetivo do tratamento é a obtenção e manutenção do controle dos sintomas e a prevenção das exacerbações (DIRETRIZES BRASILEIRAS NO MANEJO DA ASMA, 2006).

Nesse sentido, a combinação de corticóides inalatórios com beta-agonistas de ação prolongada caracteriza a terapia mais eficaz disponível atualmente, com atuação sinérgica dos anti-inflamatórios e broncodilatadores. Entretanto, alguns efeitos colaterais, como por exemplo, desenvolvimento de catarata e osteoporose, podem ser observados quando essas drogas são utilizadas em altas doses e por tempo prolongado (revisado por ADCOCK, CARAMORI e CHUNG, 2008; revisado por CORRÊA, MELO e COSTA, 2008). Nas crises de asma o tratamento deve ser instituído imediatamente para resgate dos sintomas agudos, sendo os medicamentos de escolha os beta-2 agonistas inalatórios de curta duração, podendo ainda haver a necessidade do uso de corticosteróides orais (GINA, 2007).

A maioria dos asmáticos responde bem aos tratamentos disponíveis atualmente, mas 5 a 10% dos pacientes tem doença grave, de difícil controle (revisado por ADCOCK, CARAMORI e CHUNG, 2008). Nesses casos as opções terapêuticas são reduzidas e os resultados dos tratamentos com drogas alternativas como ciclosporina, methotrexate, dapsona, sais de ouro e colchicina são variáveis e devem ser avaliados individualmente (DIRETRIZES BRASILEIRAS NO MANEJO DA ASMA, 2006).

Diversas drogas encontram-se em diferentes estágios de testes. Entre elas, os inibidores da enzima fosfodiesterase 4 (PDE4), com ação anti-inflamatória e broncodilatadora, e os inibidores de leucotrienos, com ação de inibição do broncoespasmo e redução da permeabilidade vascular, da produção de muco, da quimiotaxia e ativação de leucócitos. Outros estudos propõem a diminuição do processo inflamatório através do uso de inibidores de TNF- $\alpha$ , inibidores de prostaglandinas, moduladores de citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição, anticorpos monoclonais anti-IgE, entre outros (revisado por ADCOCK, CARAMORI e CHUNG, 2008; revisado por CORRÊA, MELO e COSTA, 2008).

O uso de plantas para aliviar os sintomas provocados pela asma vem desde os primórdios da humanidade: *Ephedra sinica* pelos chineses, *Hyoscyamus muticus* pelos egípcios, plantas do gênero *Datura* (Solanaceae) pelos indianos, *Cissampelos sympodialis* (Menispermaceae) pelos índios. Diversos fármacos com ação contra a asma já foram isolados de plantas de uso medicinal em problemas respiratórios, incluindo a atropina, a teofilina e as cromonas (revisado por CORRÊA, MELO e COSTA, 2008).

Juntamente com o tratamento convencional, uma grande parcela da população asmática usa plantas como tratamento complementar ou alternativo. No Brasil, podemos citar o uso da canela, eucalipto, espinheira santa, gengibre, guaco, entre outros, porém não foram encontrados na literatura trabalhos que tivessem comprovado a ação desses fitoterápicos (MACEDO, OSHIWA e GUARIDO, 2007; ROCHA e SANTOS, 2007). Em revisão realizada em 2000, Huntley e Ernst citam que várias plantas foram testadas como *Ginkgo biloba*, *Lingusticum wallichii*, *Picrorrhiza kurroa*, *Solanum xanthocarpum*, *Solanum trilobatum* e Marihuana não evidenciando eficácia devido, principalmente, à heterogeneidade e metodologia de baixa qualidade dos estudos, com pequeno número de pacientes.

Uma nova geração de agentes terapêuticos para o tratamento da asma que visem contribuir na busca de uma terapia eficaz, de fácil acesso, menor custo e efeitos adversos reduzidos, tem se destacado, incluindo fármacos derivados de plantas, o uso da própria planta ou de suas partes, dietas suplementares e alimentos funcionais (revisado por CORRÊA, MELO e COSTA, 2008).

#### 2.1.4 Modelo murino de alergia pulmonar

A falta de um tratamento farmacológico mais eficaz para a asma alérgica é em grande parte devido ao fato de as alterações imunológicas e bioquímicas específicas que a causam permanecerem desconhecidas. A pesquisa básica e estudos clínicos em pacientes asmáticos são fundamentais para o avanço da compreensão da patogênese da asma. Todavia, existem obstáculos científicos e éticos que impedem o esclarecimento de certos aspectos da doença. O surgimento, nas últimas décadas de modelos animais de alergia pulmonar estimulou a

investigação neste campo, sendo essencial para o entendimento dos mecanismos imunopatológicos que levam ao desenvolvimento dessa doença das doenças e subsequente desenvolvimento de novas e efetivas drogas para o seu tratamento (BRAUN *et al.*, 2008; FERNANDEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2008; revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005).

Por razões científicas e econômicas e pela maior facilidade no manuseio, a espécie animal universalmente utilizada para induzir o modelo de alergia pulmonar é o camundongo. Comparado com outras espécies, outra vantagem é a possibilidade de manipulação genética, produzindo animais transgênicos e nocautes, e imunológica, produzindo camundongos imunodeficientes (revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005).

Vários protocolos para indução de alergia pulmonar, tanto aguda quanto crônica, tem sido publicados empregando uma ampla variedade de antígenos, rotas de aplicação, doses, sequências e avaliações. A maioria dos modelos para a indução de alergia pulmonar em camundongos utiliza uma sensibilização sistêmica com diferentes tipos de proteínas, seguido por um período de desafio que consiste na exposição inalatória repetida do antígeno (revisado por SCHRÖDER e MAURER, 2007).

Em relação à linhagem de camundongos, a mais comumente usada é a BALB/c, pois os camundongos dessa linhagem exibem uma tendência geneticamente determinada para desenvolver uma resposta imune desviada para Th2. Entre os antígenos empregados, encontra-se a OVA que oferece a oportunidade de realizar experimentos de ativação e proliferação de células T detalhados devido à viabilidade de camundongos transgênicos exibindo TCR específico para este antígeno, além de haver no mercado a disponibilidade de um grande número de anticorpos para estudar a presença de imunoglobulinas específicas para OVA em camundongos (revisado por SCHRÖDER e MAURER, 2007).

Para a sensibilização, a abordagem mais frequente é a injeção intraperitoneal do antígeno adsorvido ao adjuvante hidróxido de alumínio, promovendo um aumento da fagocitose do antígeno e induzindo uma resposta imune de células Th2 associada a uma marcada produção de IgE específica para OVA (revisado por WEGMANN, 2008).

Similarmente aos humanos, os camundongos desenvolvem hiperreatividade das vias aéreas, inflamação peribrônquica com infiltrados consistindo principalmente de linfócitos e eosinófilos, aumento na IgE total, desenvolvimento de anticorpos IgE específicos para o antígeno e hiperplasia das células caliciformes (revisado por SCHRÖDER e MAURER, 2007). Em adição, nos modelos de alergia pulmonar crônica, os animais apresentam mudanças estruturais nas vias aéreas (revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005).

#### 2.1.5 Farmacologia experimental em modelo murino de alergia pulmonar

No modelo murino de alergia pulmonar induzido por OVA, diversos fármacos, moléculas sintéticas, extratos de plantas e substâncias específicas extraídas de plantas tem sido avaliados, e os trabalhos na literatura apontam resultados promissores. Dentre os mais recentes, encontra-se a avaliação dos efeitos da administração oral da lectina isolada do látex da planta *Synadenium carinatum* (cega-olho), com inibição do extravasamento de neutrófilos e eosinófilos, redução das contagens de eosinófilos e células mononucleares no sangue periférico, redução nos níveis de IL-4 e IL-5, aumento nos níveis de IFN- $\gamma$  (interferon gama) e IL-10 e inibição da degradação de I $\kappa$ B $\alpha$  (NF-kappa-B inibitor alfa) (ROGERIO *et al.*, 2007a).

O tratamento oral com os flavonóides quercetina e isoquercitrina reduziu as contagens de eosinófilos no LBA (Lavado Bronco-Alveolar), no sangue e no parênquima pulmonar quando comparados com o grupo controle (ROGERIO *et al.*, 2007b).

Lee e colaboradores (2008) investigaram a ação do licopeno e observaram diminuição da hiperresponsividade das vias aéreas, inibição do infiltrado de células inflamatórias nos pulmões, redução da atividade da metaloproteinase-9 da matrix e da expressão de EPO no LBA, redução dos níveis de RNAm de GATA-3 no tecido pulmonar e da expressão de IL-4 no LBA, aumento dos níveis de RNAm de T-bet no tecido pulmonar e da expressão de IFN- $\gamma$  no LBA.

O tratamento com lupeol, um triterpenóide isolado da planta *Diploptropis ferruginea* (sucupira preta), reduziu a celularidade, o número de eosinófilos no LBA, a produção de muco, a inflamação pulmonar e os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 (VASCONCELOS, *et al.*, 2008).

O PG102, um extrato aquoso preparado da *Actinidia arguta*, foi capaz de melhorar os sintomas asmáticos, incluindo a hiperresponsividade das vias aéreas e a eosinofilia pulmonar, além de reduzir os níveis de IL-5 no LBA e IgE total e específica para OVA no soro e aumentar a expressão de heme-oxigenase-1 e a expressão de RNAm para Foxp3, TGF- $\beta$ 1 e IL-10 no tecido pulmonar (KIM *et al.*, 2008).

O tratamento com o extrato etanólico de *Lafoensia pacari* ou com ácido elágico, isolado da mesma planta, reduziu significativamente o infiltrado de células inflamatórias no LBA e os níveis de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (ROGERIO *et al.*, 2008).

Medeiros e colaboradores (2009) avaliaram os efeitos preventivos e curativos do flavonóide glicosídeo kaempferol isolado da planta *Solanun asperum* e observaram desenvolvimento atenuado da inflamação alérgica das vias aéreas, decréscimo da inflamação eosinofílica, redução de linfócitos CD4 e B220, redução da expressão de CD40 e MHCII (Complexo de Histocompatibilidade Principal II) nas células CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>, redução da produção de citocinas IL-5 e IL-13 no LBA, redução da hipersecreção de muco e melhora da hiperresponsividade das vias aéreas.

O efeito do extrato aquoso da raiz de *Platycodon grandiflorum*, chamado de changkil, reduziu o infiltrado celular inflamatório, os níveis de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 e IL-13 e da quimiocina CCL2, os níveis de IgE no LBA e no soro, o infiltrado celular no tecido pulmonar e a hipersecreção de muco. Além disso, aumentou a geração de ROS (espécies reativas de oxigênio) intracelular, preveniu a traslocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo celular e reduziu a atividade das metaloproteases da matriz 2 e 9 (CHOI *et al.*, 2009).

## 2.2 *Echinodorus grandiflorus*

### 2.2.1 Considerações gerais

*Echinodorus grandiflorus* (Chamisso & Schlechtendal) Micheli pertence à família Alismataceae, a qual reúne plantas herbáceas, aquáticas ou semi-aquáticas, com folhas submersas, flutuantes ou emergentes, que podem ser reconhecidas pela produção de látex, placentação basal e frutos do tipo aquênio. O gênero *Echinodorus* ocorre dos Estados Unidos até a Argentina, sendo restrito ao hemisfério ocidental (Figura 3). As plantas desse gênero crescem ao nível do mar ao longo do fluxo de água dos rios e riachos, mais comumente no delta de rios. A floração e a frutificação ocorrem de novembro a maio na América do Sul e de abril a outubro nos Estados Unidos (revisado por LEHTONEN, 2008; BEVILAQUA *et al.*, 2001).

Em toda a literatura consultada predomina a denominação popular chapéu-de-couro, referindo-se tanto à espécie *E. grandiflorus*, quanto à espécie *E. macrophyllus* (Kunth) Micheli, as quais são muito semelhantes morfológicamente e são utilizadas para os mesmos fins medicinais (TIBIRIÇÁ *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2000), se diferenciando principalmente pela presença de 11 a 13 nervuras principais salientes na face inferior das folhas, pêlos tectores e células diafragmáticas em *E. macrophyllus* (LEITE *et al.*, 2007).

Ambas são conhecidas também por chá-mineiro, erva-de-pântano, erva-de-bugre, congonha-do-campo, congonha-do-brejo, erva-do-brejo e chá-de-campanha (LEITE *et al.*, 2007; CARDOSO *et al.*, 2005; CARDOSO *et al.*, 2003).

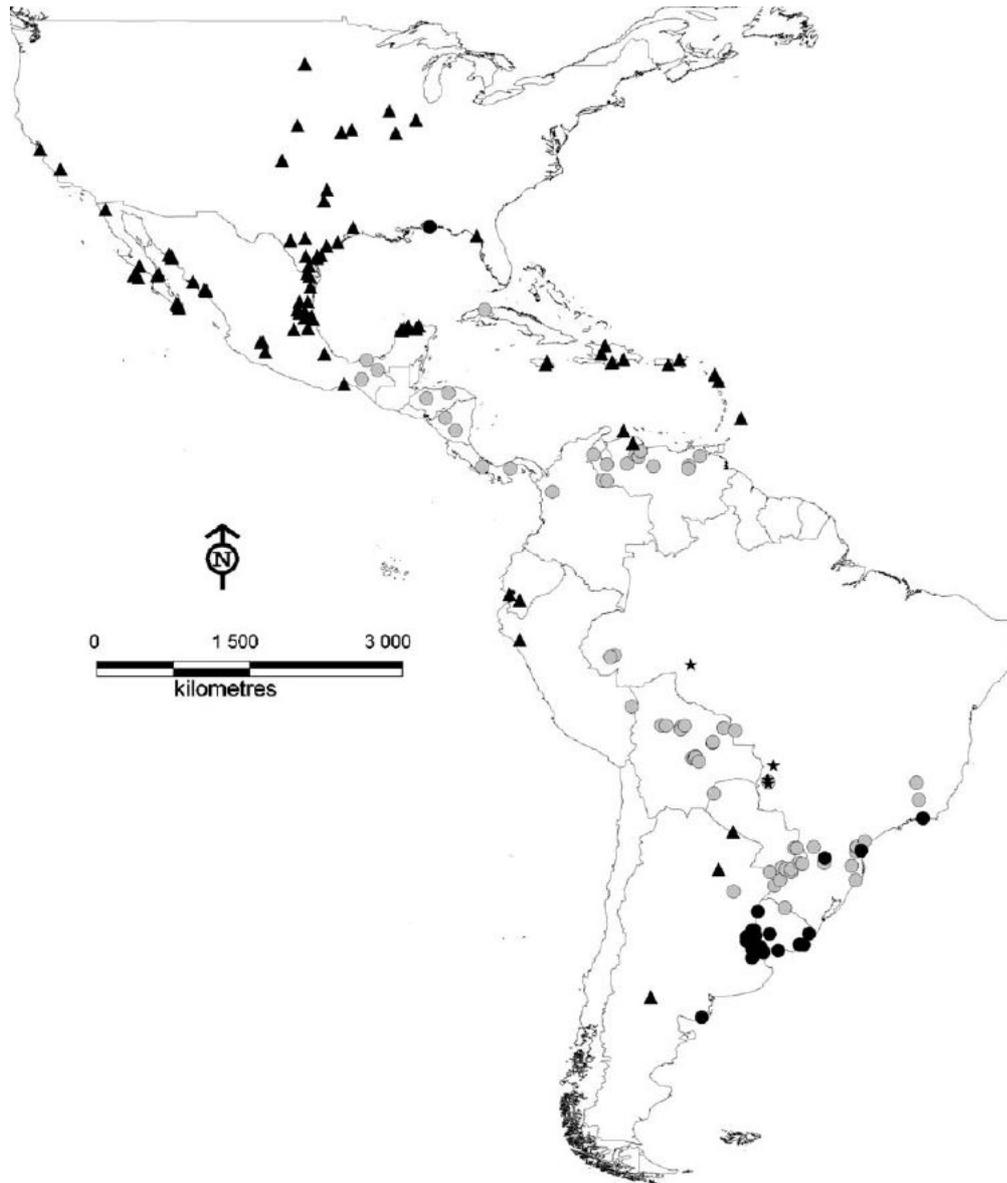


Figura 3. Distribuição geográfica de *Echinodorus grandiflorus* (pontos pretos) e outras espécies do gênero *Echinodorus* (triângulos, pontos cinza e estrelas), baseado em material de herbários georreferenciados (Modificado de LEHTONEN, 2008).

*E. grandiflorus* é uma planta perene, com rizomas horizontais, pecíolos e pedúnculos glabros a pubescentes. As folhas são emersas, com lâminas ovais, glabras a estrelado-pubescentes, com cerca de 7 a 13 vasos na superfície inferior, o ápice é agudo e a base é atenuada a levemente cordada (revisado por LEHTONEN, 2008). As inflorescências são paniculadas, com verticilos eretos, acima das folhas. As flores são levemente perfumadas, com sépalas eretas, pétalas expandidas, brancas, não aderidas, sobressaindo-se acima das folhas, com estames amarelos, expostos, anteras articuladas e carpelos numerosos. Cada inflorescência permanece

florida por aproximadamente 30 dias. A antese das flores ocorre pela manhã e cada flor dura cerca de oito horas. Seu tipo morfológico permite o acesso de diversos insetos, sendo as abelhas os principais polinizadores. Os frutos são oblanceolados, eretos, alongados e glandulares (revisado por LEHTONEN, 2008; VIEIRA e LIMA, 1997). O aspecto das folhas e das inflorescências com flores em antese pode ser observado nas Figuras 4 e 5.



Figura 4. *Echinodorus grandiflorus*: aspecto das folhas. Foto: PIMENTA, D. S. (2002), com autorização.



Figura 5. *Echinodorus grandiflorus*: aspectos da inflorescência com flores em antese. Foto: PIMENTA, D. S. (2002), com autorização.

### 2.2.2 Etnofarmacologia

As partes de *E. grandiflorus* usadas para o tratamento de diversas enfermidades são as folhas e os rizomas. As folhas de *E. grandiflorus* constituem matéria-prima para um dos chás mais empregados como diurético e depurativo. Seu uso é muito difundido tanto nos grandes centros como no interior do país. O chá das folhas de *E. grandiflorus* é utilizado pela população como diurético, preventivo da arteriosclerose, laxativo, adstringente, anti-artrítico, anti-reumático, depurativo, tônico, antinociceptivo, anti-inflamatório, contra picada de cobra, para baixar o colesterol, contra doenças da bexiga e feridas, problemas renais e hepáticos, como sedativo, para combater gripes e resfriados e como anti-helmíntico, especialmente contra *Ascaris lumbricóides*. A decocção das folhas também é usada para problemas renais e como analgésico, especialmente contra dores de cabeça (CARDOSO *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2003; DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Em algumas regiões, o chá é utilizado não só por suas propriedades medicinais, mas também como bebida refrescante de ampla aceitação popular. *E. grandiflorus* é componente dos produtos “Mineirinho<sup>®</sup>”, industrializado pela empresa “Refrigerantes Flexa Ltda.”, com ampla área de cultivo da espécie em Tanguá – RJ, e “Mate Couro<sup>®</sup>”, produzido em Belo Horizonte – MG (CARDOSO *et al.*, 2005; PIMENTA, 2002).

### 2.2.3 Toxicidade, farmacologia experimental e constituintes químicos

Embora muito utilizada pela população, a toxicidade de *E. grandiflorus* ainda não foi estudada adequadamente, sendo encontrados poucos trabalhos na literatura pesquisada. Pimenta (2002) não observou extrato com destacada citotoxicidade, avaliando os extratos brutos aquoso, hexânico e metanólico e suas partições. Lima (2006) avaliou, através do ensaio de indução lisogênica (induteste), o infuso e os extratos aquoso e etanólico das folhas e não observou genotoxicidade. Em 2005, Polacchine avaliou a toxicidade aguda em camundongos, não registrando mortes

nas 24 horas de observação. Brugiolo (dados não publicados) avaliou o efeito do extrato aquoso administrado por via oral a ratas Wistar e não observou alteração na performance reprodutiva, mas registrou anemia e alterações histopatológicas no baço, nos rins e no fígado nas doses de 250mg/kg, 500mg/kg e 1000mg/kg, além de leucocitose na dose de 1000mg/kg/dia.

Os efeitos demonstrados para os diversos extratos de *E. grandiflorus* em modelos *in vitro* e *in vivo* incluem atividades anti-inflamatória, analgésica, diurética, hipotensora, anti-hipertensiva, vasodilatadora, descolesterolizante, cicatrizante, antimicrobiana, tripanocida, leishmanicida e antineoplásica.

A atividade anti-inflamatória de *E. grandiflorus* foi demonstrada em modelos de edema plantar induzido pelo composto 48/80, histamina e carragenina, através da inibição da migração celular após injeção intraperitoneal de ácido acético e através da inibição da migração leucocitária e redução do volume de exsudato no modelo de pleurisia induzida por carragenina (PIMENTA, 2002; CARDOSO *et al.*, 2003; DUTRA *et al.*, 2006).

A atividade antinociceptiva foi demonstrada em camundongos através da redução do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético e da redução do tempo da lambida da pata induzida por formalina (CARDOSO *et al.*, 2003; DUTRA *et al.*, 2006).

O efeito diurético foi evidenciado pelo aumento do volume de urina excretado por camundongos em 4 horas de observação após administração do extrato aquoso das folhas por via oral (PIMENTA, 2002; CARDOSO *et al.*, 2003).

Diversos efeitos tem sido observados sobre o sistema cardiovascular. Em ratos naturalmente hipertensos foi demonstrada redução acentuada da pressão sanguínea e da frequência cardíaca (RIBEIRO *et al.*, 1986). Em ratos normotensos, com hipertensão induzida por L-Name ou em ratos espontaneamente hipertensos foi observado efeito hipotensor reversível e dependente da dose (PIMENTA, 2002). A ação anti-hipertensiva foi observada tanto com o tratamento agudo endovenoso quanto com o tratamento crônico em ratos normotensos e hipertensos (POLACCHINE, 2005; LESSA *et al.*, 2008). Adicionalmente, foram observados potente efeito vasodilatador na microcirculação renal de coelhos e relaxamento no modelo de aorta isolada de coelhos (PIMENTA, 2002; TIBIRIÇA *et al.*, 2007).

A avaliação da atividade do extrato aquoso sobre os níveis plasmáticos de colesterol em camundongos revelou redução destes níveis tanto em animais

normais quanto nos animais recebendo solução oleosa de colesterol (CARDOSO *et al.*, 2005).

Os extratos de folhas e pecíolos tiveram atividade contra os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans* (TANAKA, 2000). O extrato aquoso das folhas demonstrou atividade contra as bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* (DUARTE *et al.*, 2002). O extrato metanólico das folhas teve atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* (SOUZA *et al.*, 2004).

A atividade tripanocida *in vitro* das folhas de *E. grandiflorus* foi demonstrada contra a forma tripomastigota proveniente de cultura de LLCMK2 infectadas com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (PIMENTA, 2002).

Pimenta (2002) demonstrou atividade leishmanicida contra promastigotas de *Leishmania major in vitro*.

Extratos das folhas de *E. grandiflorus* inibiram a proliferação, *in vitro*, de linhagens de células tumorais de mieloma (SP2/0), linfoma (BW) e plasmocitoma de camundongos (P3653) (PIMENTA, 2002).

Quanto aos constituintes químicos, estudos mais amplos da caracterização farmacognóstica de *E. grandiflorus*, evidenciaram grupos químicos de relevância terapêutica, os princípios ativos, como os compostos fenólicos, triterpenos, flavonóides, saponinas e taninos (MANNIS e HARTMANN, 1993; TANAKA *et al.*, 1997; COSTA *et al.*, 1999; TANAKA, 2000; DUARTE *et al.*, 2002; PIMENTA, 2002; PIMENTA, 2006; LIMA, 2006; SCHNITZLER, PETEREIT e NAHRSTEDT, 2007).

Devido ao potencial terapêutico atribuído à *E. grandiflorus*, principalmente por suas propriedades anti-inflamatórias, e sabendo que a asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, verificou-se neste trabalho a ação do extrato aquoso desta planta sobre o quadro inflamatório pulmonar mimetizado em modelo murino.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus* (EAEG) na modulação da resposta imune no modelo murino de alergia pulmonar induzida por OVA.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Estimar o grau de infiltrado celular inflamatório no tecido pulmonar e realizar a contagem de células com morfologia sugestiva de eosinófilos nos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (HE);
- Determinar a atividade da EPO no homogenato de tecido pulmonar através de ensaio enzimático;
- Analisar o perfil de produção das quimiocinas CCL2, CCL5 e CCL11 no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar através de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay);
- Detectar IgE específica para OVA no soro através de ELISA;
- Realizar as contagens total e específica de células no LBA;
- Caracterizar o perfil de expressão dos marcadores celulares CD3, CD25, CD28 e CD152 nas células do LBA através da citometria de fluxo;
- Avaliar o perfil de produção das citocinas IL-4, IL-10, IL-13 e IL-17A no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar;
- Determinar a expressão gênica das citocinas IL-4 e IL-13 e para o fator de transcrição Foxp3 no tecido pulmonar através de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa) em tempo real.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, com aproximadamente 6 a 8 semanas de idade, pesando em média 22g, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno, tendo como forma de alimentação água e ração própria oferecidas *ad libitum*. As gaiolas foram mantidas em estantes ventiladas (Allesco, EUA), na sala de manutenção de animais do laboratório de Imunologia da UFJF. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-reitoria de Pesquisa da UFJF, em reunião realizada em 10/02/2009, sob o número 038/2008-CEEA, que segue as regras éticas internacionais em experimentação animal.

### 4.2 Material vegetal e preparação do extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus*

As folhas de *E. grandiflorus* foram coletadas em junho de 2006, em plantio sob condições de inundação intermitente, em Juiz de Fora, MG, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Daniel Sales Pimenta, que identificou e arquivou exsicata no Herbário Leopoldo Krieger na UFJF, Juiz de Fora, Minas Gerais, sob o número 49.707. O extrato aquoso foi elaborado no laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Botânica da UFJF. Após secagem em bancada, seguida de utilização de estufa a 55°C até atingir peso constante, foi obtida a amostra de folhas secas rasuradas. Folhas secas (250g) foram submetidas à extração aquosa por infusão com 5600mL de água destilada, permanecendo por 15 horas em maceração estática, sendo depois filtrado, acondicionado em freezer a -20°C e liofilizado (Liofilizador Freeze Dryer 18, Labconco, EUA) na Empresa Brasileira de Pesquisa

Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (EMBRAPA-CNPGL), Juiz de Fora, MG. O rendimento dos resíduos liofilizados foi de 13,45%, ou seja, 13,45g de resíduo para cada 100g de folhas secas. A determinação do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a avaliação qualitativa do extrato aquoso de *E. grandiflorus* foram realizadas pelos professores Elita Scio Fontes e Rodrigo Luiz Fabri, no Departamento de Bioquímica da UFJF, e as informações referentes a estas avaliações encontram-se disponíveis no Anexo A.

### **4.3 Delineamento experimental**

#### **4.3.1 Modelo de alergia pulmonar induzida por OVA**

Todos os animais foram inicialmente submetidos a tratamento anti-helmíntico com ivermectina por 10 dias, sendo 800 $\mu$ L de Ivermectina 1% (Ivomec, Merial, Brasil) diluída em 1L de água filtrada, e posteriormente com dose única de Cestox (Praziquantel, Merck, Alemanha) por gavagem na dose de 0,75mg/animal, seguido por um período de repouso de 10 dias antes do início do protocolo do modelo de alergia pulmonar induzida por OVA (AP). Para a indução do modelo, os animais foram imunizados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) contendo 20 $\mu$ g de OVA (Grade V, Sigma-Aldrich Corp, EUA) e 2mg de hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich Corp, EUA) em volume total de 160 $\mu$ L por animal nos dias 0 e 14 do protocolo. Nos dias 28, 29 e 30, os animais foram submetidos à nebulização com OVA 1% por 20 minutos, mimetizando a via natural de exposição aos alérgenos ambientais. Os desafios foram realizados através da nebulização de OVA 5% por 20 minutos nos dias 32 e 40 do protocolo (Figura 6). Para as nebulizações, realizadas em grupos de 5 a 6 camundongos mantidos em uma gaiola comum (30cm X 19cm X 13cm), foi utilizado o nebulizador modelo Inalatec Plus (Nevoni, Brasil), como mostrado na Figura 7.

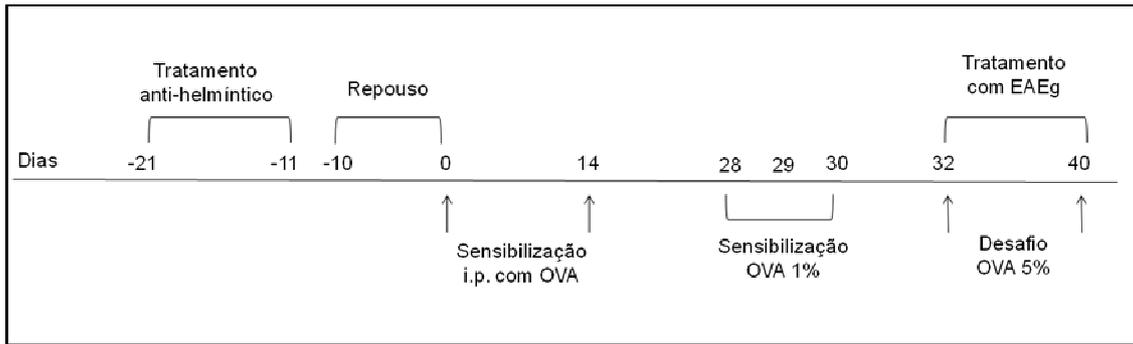


Figura 6. Desenho experimental.



Figura 7. Equipamento utilizado para nebulização. Foto: BRUGIOLO, A. S. S. (2009).

#### 4.3.2 Grupos experimentais e tratamentos

Os camundongos utilizados no presente experimento foram divididos conforme os grupos a seguir, sendo que cada grupo foi composto por 5 a 6 animais:

- Controle: camundongos tratados com veículo (água filtrada);
- EAEG: camundongos tratados com extrato aquoso de *E. grandiflorus*;
- AP: camundongos sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com veículo;
- AP + EAEG: camundongos sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com extrato aquoso de *E. grandiflorus*;
- AP + Dexa: camundongos sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com dexametasona.

Os tratamentos foram realizados por via oral (v.o.) através de gavagem, em volume de 0,1mL por animal por dia, do dia 32 ao dia 40 do protocolo, sendo que para os animais dos grupos nos quais foi induzido o modelo de alergia pulmonar, nos dias 32 e 40 do protocolo, o tratamento foi realizado imediatamente após o desafio. A dose de extrato aquoso de *E. grandiflorus* utilizada foi de 23mg/kg de peso corpóreo, sendo esta a dose recomendada para humanos, segundo Lopes e colaboradores (2000). A dose de dexametasona utilizada foi de 3mg/kg de peso corpóreo. Um resumo dos procedimentos realizados em cada um dos grupos experimentais é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos experimentais.

n= 5 a 6/grupo	Sensibilização e desafio com OVA	Veículo	<i>E. grandiflorus</i> (23mg/Kg)	Dexametasona (3mg/Kg)
Controle	-	+	-	-
EAEg	-	-	+	-
AP	+	+	-	-
AP + EAEg	+	-	+	-
AP + Dexa	+	-	-	+

#### 4.3.3 Obtenção de material biológico

Todo o material biológico foi obtido 8 horas após o último tratamento com veículo, EAEg ou dexametasona. Aproximadamente 0,5mL de sangue foram coletados pelo plexo retro-orbital, centrifugado a 14000rpm, por 2 minutos (Centrifuge 5410, Eppendorf, Alemanha) e o soro foi separado e armazenado individualmente a -20°C. Posteriormente, os animais foram eutanasiados com solução de ketamina (90mg/kg, Syntec, Brasil) e xilasina (10mg/kg, Calmiun, Agener União, Brasil) por via i.p.. A traquéia foi então canulada com uma sonda uretral número 4 (CPL Medical's, Brasil) conectada a uma seringa e os pulmões foram lavados com aproximadamente 1mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) gelado, por 2 ou 3 vezes para a coleta de aproximadamente 0,7mL de LBA, que foi

armazenado individualmente. Seguiu-se a abertura da caixa torácica para retirada dos lobos pulmonares, que também foram armazenados individualmente.

#### 4.3.4 Análise histopatológica

A avaliação histopatológica foi realizada com a colaboração da Dra. Beatriz Julião Vieira Aarestrup, do Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB)-UFJF. Para isto o lobo pulmonar superior direito de cada animal foi fixado em formol tamponado a 10%, e as amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina. O material embocado em parafina foi submetido à microtomia com 4 $\mu$ m de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE). Após coloração, os cortes foram dispostos sobre lâminas e montados em lamínulas com Entellan (1.07961, Merck, Alemanha). As amostras foram observadas em toda sua extensão em microscópio óptico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) nos aumentos de 50, 100 e 400 vezes, por dois avaliadores independentes, com formação e experiência em histopatologia, calibrados e cegados em relação aos grupos. Após observação, foram selecionados para captura fotográfica digital, em aumento de 400 vezes, de 3 a 5 campos do lobo pulmonar superior direito para análise do infiltrado inflamatório e para contagem das células com morfologia sugestiva de eosinófilos. As áreas peribronquiolares e perivasculares foram avaliadas de acordo com o grau de infiltrado celular inflamatório, ao qual foram atribuídos escores de 0 a 5 para cada campo (LEE *et al.*, 2009):

- 0, ausência de processo inflamatório;
- 1, células inflamatórias esparsas;
- 2, uma camada de células inflamatórias ao redor da estrutura avaliada;
- 3, anel de células inflamatórias contendo 2 a 4 camadas;
- 4, aglomerado focal de células inflamatórias ao redor da estrutura;
- 5, infiltrado inflamatório intenso.

Posteriormente, foi realizada a contagem das células com morfologia sugestiva de eosinófilos, sendo avaliados a afinidade tintorial do citoplasma e a morfologia do núcleo. Para a análise estatística foram utilizadas as médias

aritméticas simples de 3 a 5 campos pulmonares por lâmina, sendo 5 a 6 lâminas representativas de cada grupo experimental. Ainda nas fotomicrografias, foram analisados o tecido epitelial de revestimento bronquiolar e o epitélio alveolar, quanto à presença e a intensidade de alterações celulares metaplásicas, bem como possível produção de muco.

#### 4.3.5 Determinação da atividade da peroxidase eosinofílica no tecido pulmonar

A determinação da atividade da peroxidase eosinofílica (EPO) e dosagem de quimiocinas e citocinas no tecido pulmonar foi realizada com a colaboração da Dra. Lucila Grossi Gonçalves Pacifico, no Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, Belo Horizonte, MG. Para isto o lobo pulmonar inferior direito foi armazenado, individualmente, a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a utilização. Para a determinação da atividade da EPO no tecido pulmonar, 100mg de tecido de cada amostra foi pesado, homogeneizado em 1,9mL de PBS e centrifugado a 10000rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e as hemácias foram lisadas. As amostras foram então centrifugadas a 10000rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1,9mL de hexadeciltrimetil brometo de amônio (HTAB) 0,5% em salina PBS e homogeneizado. Seguiu-se o congelamento das amostras por três vezes em nitrogênio líquido e a centrifugação a 10000rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático. Resumidamente, 10mg de OPD (o-fenilenodiamina) foi dissolvida em 5,5mL de água destilada e, em seguida, 1,5mL de solução de OPD foi adicionado a 8,5mL de tampão Tris (pH 8,0), seguido pela adição de 7,5 $\mu\text{L}$  de água oxigenada. Usando uma placa de 96 poços, 100 $\mu\text{L}$  da solução de substrato foi adicionado em 50 $\mu\text{L}$  de cada amostra. Após 30 minutos, a reação foi interrompida com 50 $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 1M e a absorbância foi lida a 492nm em leitor de ELISA (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, EUA).

#### 4.3.6 Dosagem de quimiocinas e citocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar

Para a obtenção do homogenato, 100mg de cada tecido pulmonar foi macerado em 1mL de PBS contendo inibidores de proteases (0,1mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1mM cloreto de benzetonio, 10mM EDTA e 2 $\mu$ L de aprotinina A) e 0,05% Tween 20. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 3000 X *g* e os sobrenadantes foram imediatamente diluídos e usados para detectar os níveis de quimiocinas e citocinas por ELISA. As quimiocinas CCL2 e CCL5 foram diluídas na proporção 1:5 e a CCL11, 1:8, as citocinas IL-4, IL-13 e IL-10 foram diluídas na proporção 1:3 e a IL-17A foi utilizada sem diluição. Foram utilizados os kits de ELISA da R&D Diagnostics (EUA) para quantificar as quimiocinas CCL2, CCL5 e CCL11, os kits de ELISA BD OptEIA (BD Biosciences, EUA) para quantificar as citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 e o kit de ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience, EUA) para quantificar a citocina IL-17A, de acordo com as instruções do fabricante. Para a dosagem de citocinas, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura diluído em tampão e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas em PBS-Tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados, permanecendo incubando por 1 hora, seguida por lavagem. Para determinação das quimiocinas e citocinas, as curvas-padrão para as respectivas quimiocinas e citocinas e as amostras do sobrenadante de tecido pulmonar foram adicionadas e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Terminada a incubação, as placas foram lavadas e o segundo anticorpo foi adicionado e incubado por mais 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas e a reação foi revelada pela adição do substrato. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M e a leitura foi feita em leitor de ELISA (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, EUA) a 450nm. As concentrações de quimiocinas e citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações das quimiocinas e citocinas recombinantes.

#### 4.3.7 Detecção de anticorpo específico para OVA

Para a detecção de IgE específica para OVA placas de 96 poços foram sensibilizadas com o antígeno OVA (10 $\mu$ g/mL) e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com PBST e bloqueadas com PBST com 10% SFB (soro fetal bovino), permanecendo incubando por 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e os soros já diluídos (1:100) foram adicionados e permaneceram incubando por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas e o anticorpo anti-IgE conjugado à peroxidase foi adicionado e permaneceu incubando por mais 1 hora a temperatura ambiente. Após as lavagens a reação foi revelada pela adição do substrato contendo ácido cítrico 0,1M, citrato de sódio 0,1M, água destilada, cromógeno OPD e água oxigenada 30%. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 1M e a leitura foi realizada em leitor de ELISA a 492nm. A detecção do anticorpo específico foi quantificada como densidade ótica (DO) em leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA).

#### 4.3.8 Contagem total e específica de leucócitos no lavado bronco-alveolar

O LBA foi utilizado para realizar a contagem total do número de células. Para isto, foi utilizada uma solução contendo uma parte de corante azul de Trypan para uma parte do LBA, individualmente. Para cada amostra, 20 $\mu$ L dessa solução foram colocadas na lâmina da câmara de Neubauer e as células foram contadas. O resultado foi expresso como número de células x10<sup>4</sup>/mL de LBA. Posteriormente o LBA foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 1200rpm (Jouan CR 312, Thermo Electron Corporation, EUA), o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 50 $\mu$ L de PBS e utilizado para contagem específica de leucócitos no LBA através do citospyn. Resumidamente, foi realizada uma diluição para que todos os grupos ficassem com aproximadamente o mesmo número de células. As amostras foram citocentrifugadas (Centrífuga Citológica, Fanem, Brasil) a 2800rpm por 5 minutos. As lâminas foram coradas com Panótico Rápido (Laborclin Ltda,

Brasil) e foi realizada a contagem de 300 células por lâmina, com o auxílio de microscópio óptico (BX41PF, Olympus Optical, Japão) nos aumentos de 400 e 1000 vezes. As células foram caracterizadas de acordo com critérios morfológicos padrão e os resultados foram expressos como número específico de células  $\times 10^4/\text{mL}$  de LBA.

#### 4.3.9 Expressão de marcadores celulares nas células do lavado bronco-alveolar

Para a análise da expressão de marcadores celulares nas células do LBA foi utilizado o sedimento ressuspendido em  $50\mu\text{L}$  de PBS. Inicialmente as células foram incubadas com os anticorpos anti-CD3-PerCP, anti-CD25-PE, anti-CD28-PE e anti-CD152-PE, por 45 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente as células foram fixadas. Foram adicionados  $70\mu\text{L}$  de SFB seguido de centrifugação a  $4^\circ\text{C}$  por 5 minutos a 1200rpm. O sobrenadante foi desprezado e seguiram-se 3 lavagens com 1mL de PBS com 5% SFB. As células foram então ressuspendidas em  $200\mu\text{L}$  de paraformaldeído (1% em PBS) e armazenadas no escuro, a  $4^\circ\text{C}$  até a aquisição que foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson, EUA). As análises foram feitas utilizando 10000 eventos para cada amostra. As células marcadas foram selecionadas, através de tamanho e granulosidade, e analisadas através do software CellQuest<sup>®</sup> (Becton Dickinson, EUA). Os resultados foram expressos como percentual de células, número total de células e expressão dos marcadores celulares, sendo esta última caracterizada pela média de intensidade de fluorescência (MIF).

#### 4.3.10 Extração de RNA e síntese de cDNA

Todas as etapas para a realização do RT-PCR em tempo real foram realizadas com a colaboração do Dr. Marco Antonio Machado na EMBRAPA-CNPGL, Juiz de Fora, MG. O lobo pulmonar esquerdo de cada animal foi

armazenado em RNA later a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior realização de RT-PCR em tempo real. As amostras de tecido pulmonar foram removidas do RNA later e o excesso de líquido foi drenado usando uma pinça. A seguir, foi pesada a quantidade de tecido a ser utilizada, aproximadamente 5mg, e o tecido foi rompido e homogeneizado utilizando o aparelho TissueRuptor (Qiagen, Alemanha) na presença de tampão de lise durante 45 a 90 segundos. O RNA total foi extraído das amostras de tecido pulmonar de cada camundongo, individualmente, conforme as instruções do fabricante (RNeasy Mini Kit 74104, Qiagen, Alemanha), quantificado por nanoespectrofotometria através do NanoDrop ND1000 (NanoDrop, EUA) e qualificado através do 2100 Bioanalyzer (Agilent, EUA) para verificar a integridade do RNA. Para avaliar a ausência de contaminação, principalmente por proteínas, observou-se a relação 260/280, que deve estar próxima de 2,0. Seguiu-se a síntese de cDNA (DNA complementar) primeira fita conforme as instruções do kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, EUA). O cDNA produzido foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real. Os *primers* utilizados neste estudo e as avaliações relativas ao funcionamento dos *primers* e à temperatura de anelamento são mostrados no Anexo B. Os genes HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase) e  $\beta$ -actina foram testados a fim de avaliar o melhor controle endógeno, sendo que este deve ser expresso em todos os tecidos e apresentar níveis de expressão inalterados com o tratamento.

#### 4.3.11 RT-PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o kit iTaq SYBR Green Supermix with ROX (Bio-Rad, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Cada gene alvo foi amplificado em poços diferentes e as condições de amplificação para todos os sistemas foram:  $50^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos para ativação da iTaq DNA polimerase,  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos para desnaturação inicial, 40 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos para desnaturação e  $60^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto para pareamento e extensão. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, a fim de validar a ausência de produtos não

específicos e dímeros de *primers* (Anexo B). A expressão gênica foi calculada através dos valores de Ct (cycle threshold) que correspondem ao ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção, sendo um ponto de referência, servindo como base para comparação entre as amostras, pela fórmula:

$$\text{Expressão gênica} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Onde:  $\Delta Ct = Ct$  do gene alvo –  $Ct$  do gene controle endógeno,

E:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  da amostra –  $\Delta Ct$  do controle.

#### 4.4 Análise estatística

Os dados numéricos foram analisados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, foram utilizados o teste t não pareado para os dados paramétricos e o teste de Mann Whitney para os dados não paramétricos. O nível de significância admitido para os testes foi de  $p < 0,05$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise histopatológica

A partir da observação microscópica, foi realizada a análise histopatológica descritiva geral dos grupos. Foi observado aumento significativo na quantidade de células infiltradas no tecido pulmonar dos animais do grupo AP quando comparados com os animais do grupo controle. Os animais do grupo AP exibiram intenso infiltrado inflamatório perivascular, peribronquiolar e nos espaços interalveolares, composto predominantemente por células com morfologia sugestiva de eosinófilos em todo o estroma, sendo atribuído escore 5 para este grupo. Já os animais do grupo controle apresentaram características histológicas compatíveis com a normalidade, sendo atribuído escore 0 para este grupo (Figuras 8A, 8C, 9A e 9C).

Nos animais com alergia pulmonar, o tratamento com EAEG não reduziu o infiltrado celular inflamatório em relação ao grupo AP, sendo atribuído escore 5 para este grupo, caracterizado por infiltrado inflamatório perivascular e peribronquiolar composto por células com morfologia sugestiva de eosinófilos (Figuras 8C, 8D, 9C e 9D).

Já o tratamento com dexametasona reduziu o infiltrado inflamatório em relação ao grupo AP, sendo observados neste grupo discreto infiltrado inflamatório predominantemente perivascular com áreas restritas de edema e composto por células mononucleares em menor quantidade e células com morfologia sugestiva de eosinófilos, sendo 2 o escore atribuído para este grupo (Figura 8C, 8E, 9C e 9E).

Além disso, não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e EAEG, sendo atribuído escore 0 para ambos, embora os animais do grupo EAEG tenham apresentado discreto infiltrado inflamatório associado a edema perivascular e peribronquiolar composto por células mononucleares (Figura 8A, 8B, 9A e 9B).

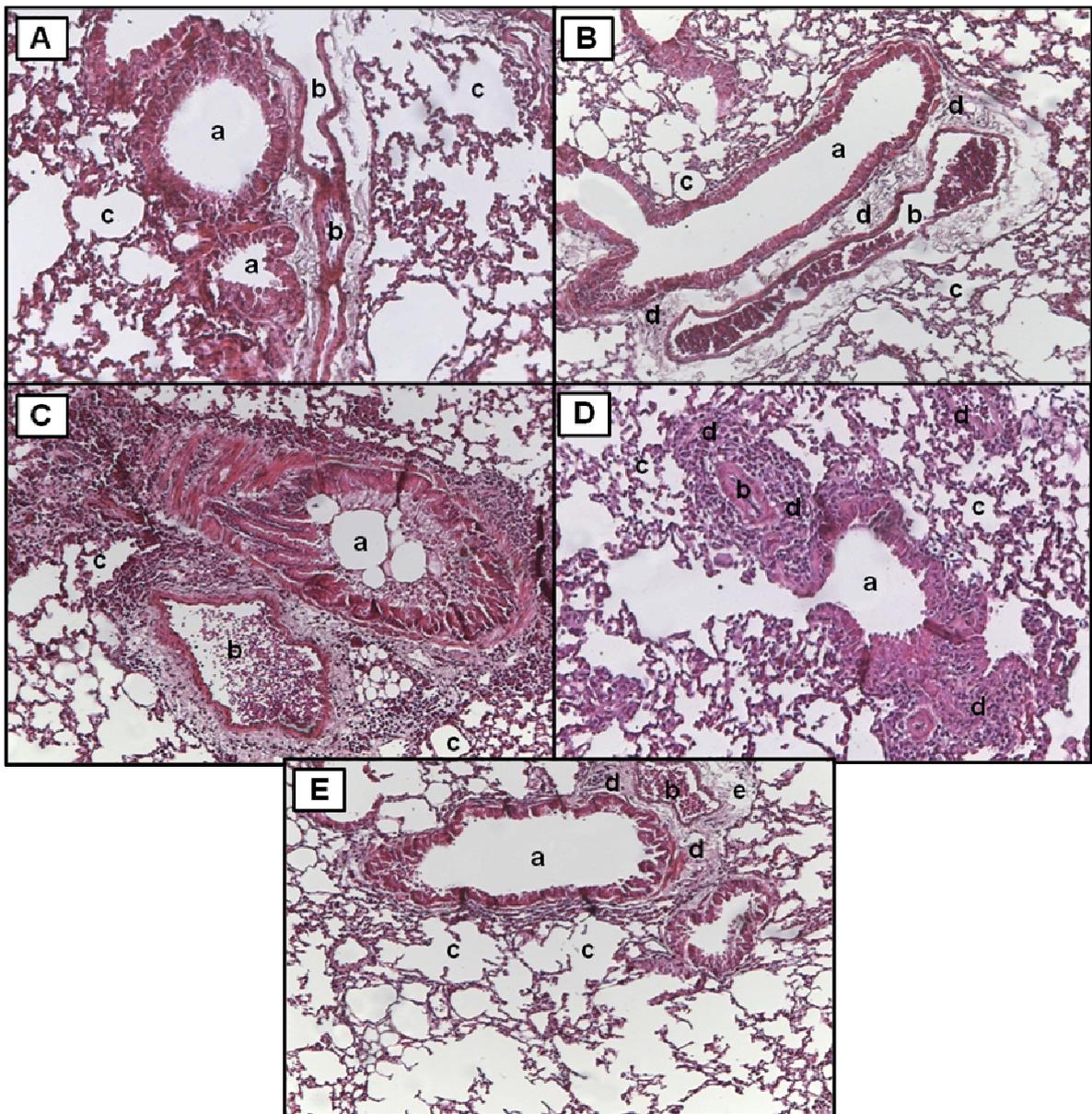


Figura 8. Amostras de parênquima pulmonar de camundongos BALB/c. (A) Controle, (B) EAEg, (C) AP, (D) AP + EAEg e (E) AP + Dexa. (a) luz bronquiolar, (b) luz vascular, (c) luz alveolar, (d) infiltrado inflamatório, (e) edema. Coloração HE. Aumento original 250X.

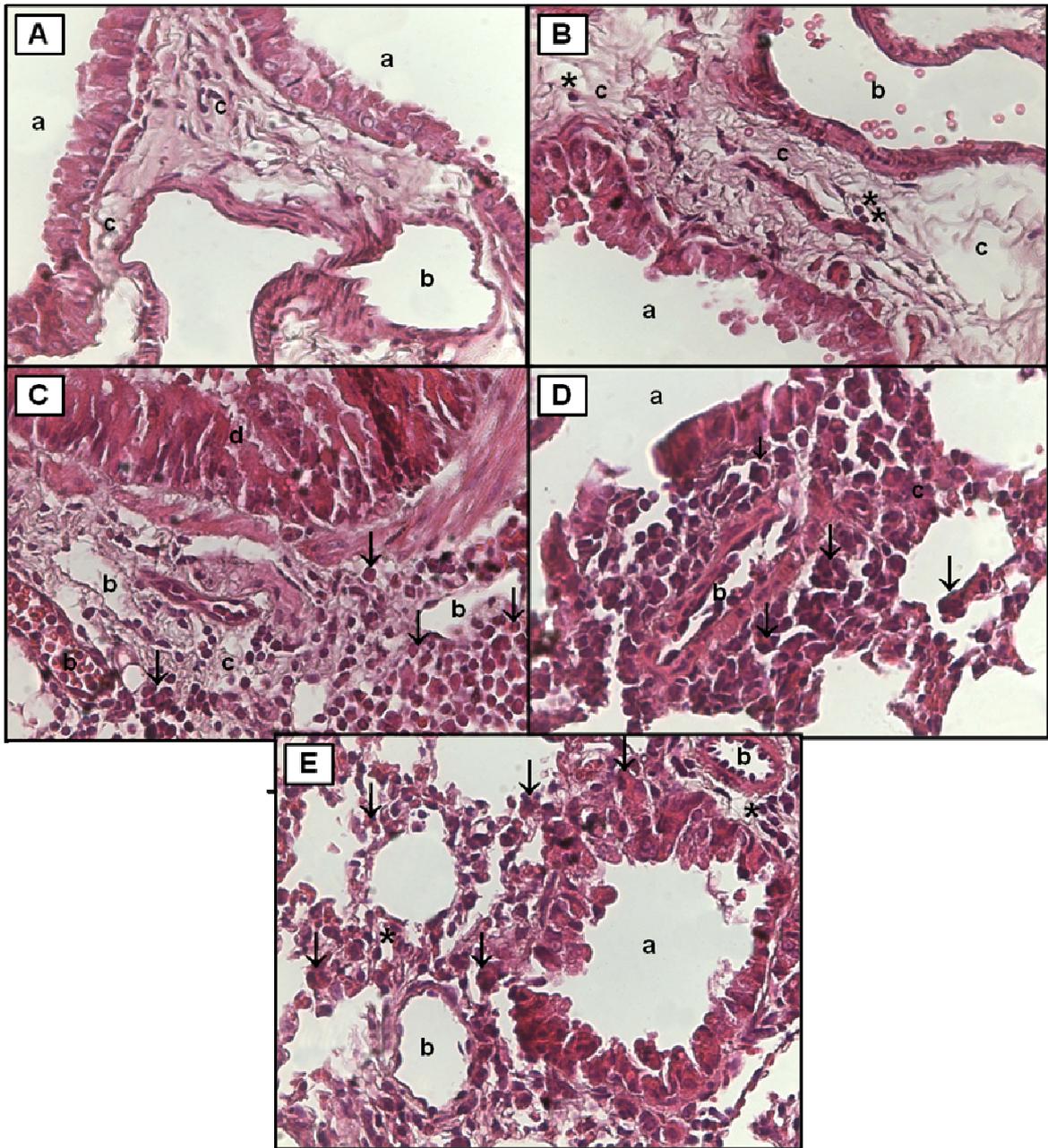


Figura 9. Amostras de parênquima pulmonar de camundongos BALB/c. (A) Controle, (B) EAEg, (C) AP, (D) AP + EAEg e (E) AP + Dexa. (a) luz bronquiolar, (b) luz vascular, (c) estroma, (d) epitélio bronquiolar, (\*) células mononucleares, (↓) células com morfologia sugestiva de eosinófilos. Coloração HE. Aumento original 400X.

A avaliação quantitativa de eosinófilos no tecido pulmonar revelou aumento significativo nas amostras provenientes do grupo AP quando comparado às amostras do grupo controle. Nos animais com alergia pulmonar, os tratamentos com EAEG ou com dexametasona não alteraram a quantidade de eosinófilos infiltrados no tecido pulmonar quando comparados às amostras do grupo AP. Foi observado aumento significativo na quantidade de eosinófilos no grupo EAEG quando comparado ao grupo controle (Figura 10).

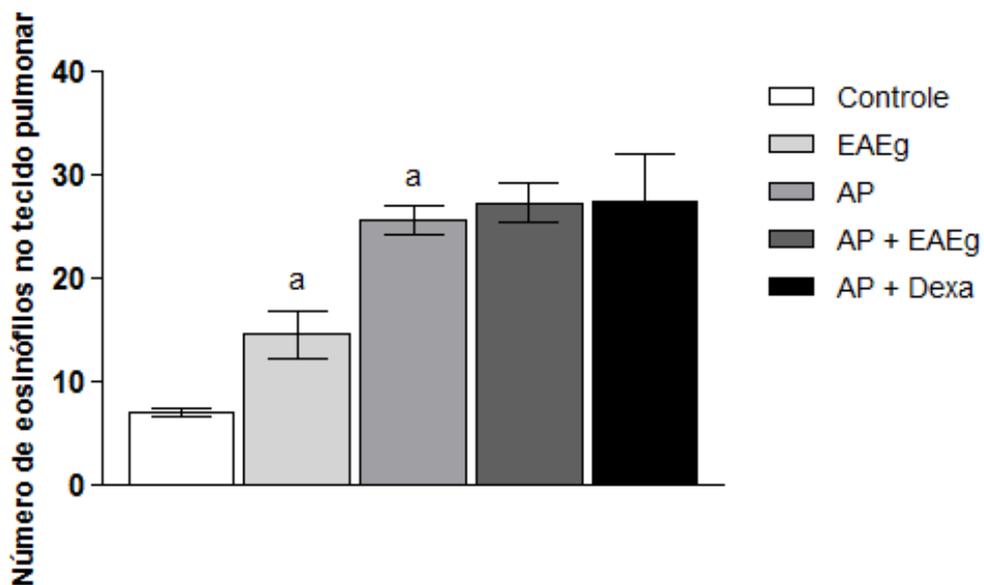


Figura 10. Número de eosinófilos no tecido pulmonar. Barras representam a média  $\pm$  erro padrão. Foram contadas células em 3 a 5 campos pulmonares representativos por lâmina, sendo 5 a 6 lâminas por grupo. a  $p < 0,05$  versus Controle; b  $p < 0,05$  versus AP; c  $p < 0,05$  versus AP + EAEG.

## 5.2 Atividade da peroxidase eosinofílica no tecido pulmonar

A avaliação da atividade da EPO no homogenato de tecido pulmonar revelou que a indução do modelo de alergia pulmonar aumentou significativamente a atividade da EPO, comparado com o grupo controle (Figura 11).

Nos animais com alergia pulmonar, os tratamentos com EAEG ou com dexametasona reduziram significativamente a atividade da EPO, quando

comparados com o grupo AP. Também foi observada redução significativa na atividade da EPO no grupo AP + Dexa, quando comparado ao grupo AP + EAEG (Figura 11).

Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e EAEG em relação à atividade da EPO (Figura 11).

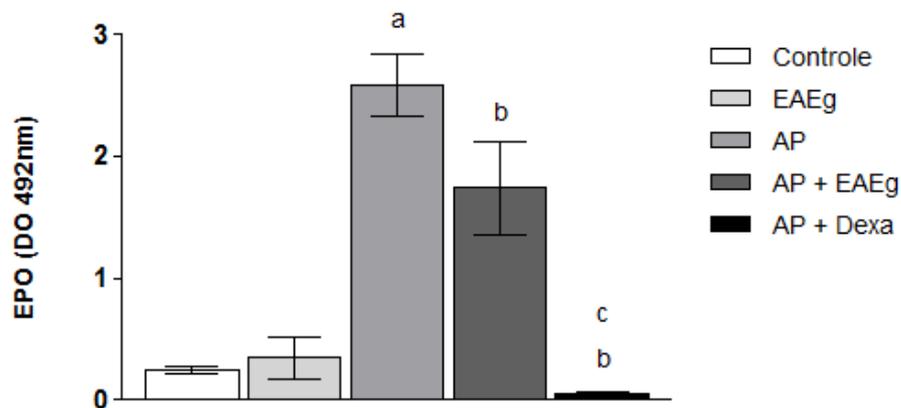


Figura 11. Atividade da EPO no homogenato de tecido pulmonar (DO 492nm). Barras representam a média  $\pm$  erro padrão. a  $p < 0,05$  versus Controle; b  $p < 0,05$  versus AP; c  $p < 0,05$  versus AP + EAEG. EPO, peroxidase eosinofílica e DO, densidade óptica.

### 5.3 Níveis de quimiocinas no homogenato de tecido pulmonar

Em relação aos níveis de quimiocinas no homogenato de tecido pulmonar houve aumento significativo na produção de CCL2, CCL5 e CCL11 com a indução do modelo de alergia pulmonar, quando comparado com o grupo controle (Figura 12).

Nos animais com alergia pulmonar, o tratamento com EAEG reduziu significativamente apenas a produção de CCL11, comparada com a produção dessa quimiocina pelo grupo AP (Figura 12C).

Já o tratamento com dexametasona reduziu significativamente os níveis de produção de CCL2, CCL5 e CCL11, comparado com os níveis de produção dessas quimiocinas pelo grupo AP. Também foram observadas reduções significativas nos níveis das quimiocinas avaliadas no grupo AP + Dexa, quando comparado ao grupo AP + EAEG (Figura 12).

Não houve diferença significativa entre os grupos controle e EAEG em relação a produção das quimiocinas avaliadas (Figura 12).

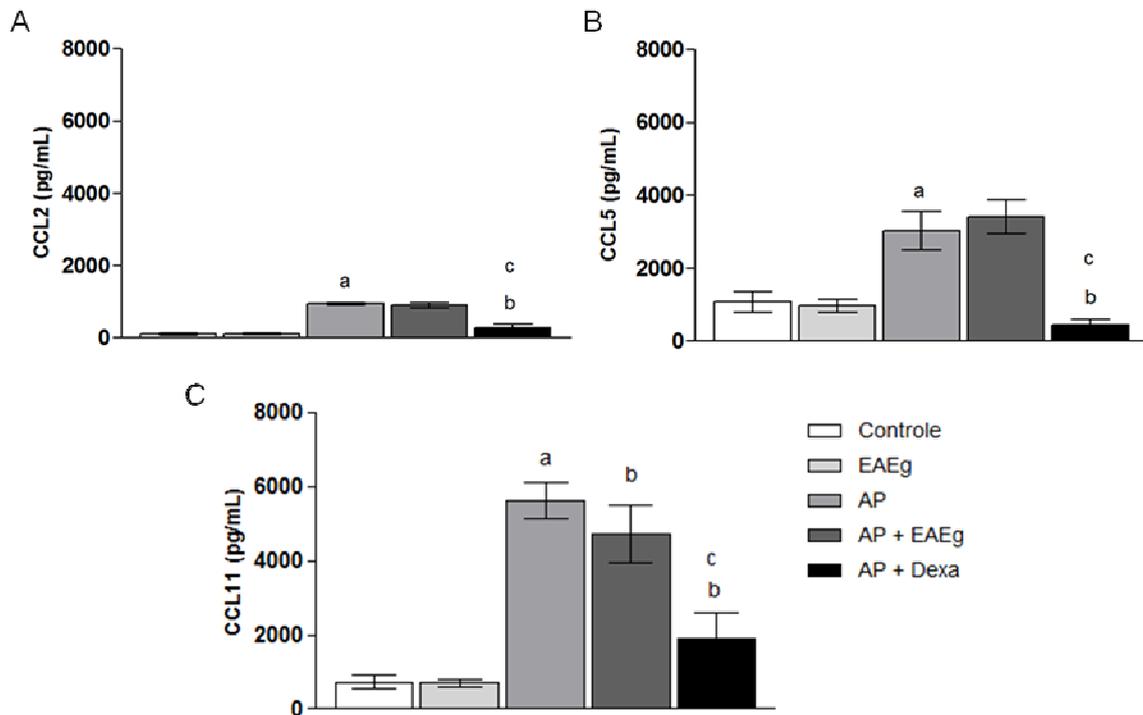


Figura 12. Níveis de quimiocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar. (A) Níveis de CCL2, (B) CCL5 e (C) CCL11 no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar (pg/mL). Barras representam a média  $\pm$  erro padrão. a  $p < 0,05$  versus Controle; b  $p < 0,05$  versus AP; c  $p < 0,05$  versus AP + EAEG.

#### 5.4 Detecção de anticorpo específico para OVA

A avaliação da produção de IgE específica para OVA no soro demonstrou que a indução do modelo de alergia pulmonar aumentou significativamente esses níveis, quando comparado com o grupo controle (Figura 13).

Nos animais com alergia pulmonar, os tratamentos com EAEG e com dexametasona reduziram significativamente os níveis de IgE específica para OVA no soro, quando comparados com o grupo AP (Figura 13).

Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e EAEG em relação aos níveis de IgE específica para OVA (Figura 13).

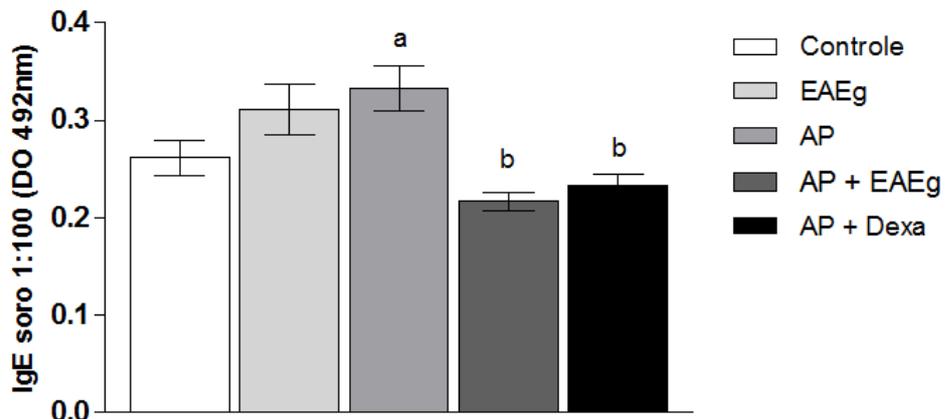


Figura 13. Níveis de IgE específica para OVA no soro (1:100). Barras representam a média  $\pm$  erro padrão. a  $p < 0,05$  versus Controle; b  $p < 0,05$  versus AP; c  $p < 0,05$  versus AP + EAEG. DO, densidade óptica.

### 5.5 Contagem total e específica de leucócitos no lavado bronco-alveolar

A contagem de células no LBA demonstrou que a indução do modelo de alergia pulmonar aumentou significativamente o número total de células no LBA, quando comparado ao grupo controle (Figura 14A).

Nos animais com alergia pulmonar, os tratamentos com EAEG ou com dexametasona, reduziram significativamente o número total de células no LBA, quando comparado com o grupo AP (Figura 14A).

Adicionalmente, o tratamento com dexametasona reduziu significativamente o número total de células no LBA quando comparado com o grupo AP + EAEG (Figura 14A).

Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e EAEG em relação ao número total de células no LBA (Figura 14A).

Em relação às subpopulações celulares, a indução do modelo de alergia pulmonar resultou no aumento significativo no número de neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilos, quando comparado ao grupo controle (Figuras 14B, 14C, 14D e 14E).

Nos animais com alergia pulmonar, os tratamentos com EAEG e com dexametasona reduziram significativamente o número de células em todas as subpopulações avaliadas (Figuras 14B, 14C, 14D e 14E).

Além disso, o tratamento com dexametasona reduziu significativamente o número de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos, quando comparado com o grupo AP + EAEG (Figuras 14B, 14C e 14E).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e EAEG quanto ao número de neutrófilos e eosinófilos (Figuras 14B e 14E). Entretanto, foram observadas a redução significativa no número de linfócitos e o aumento significativo no número de macrófagos comparando os grupos controle e EAEG (Figuras 14C e 14D).

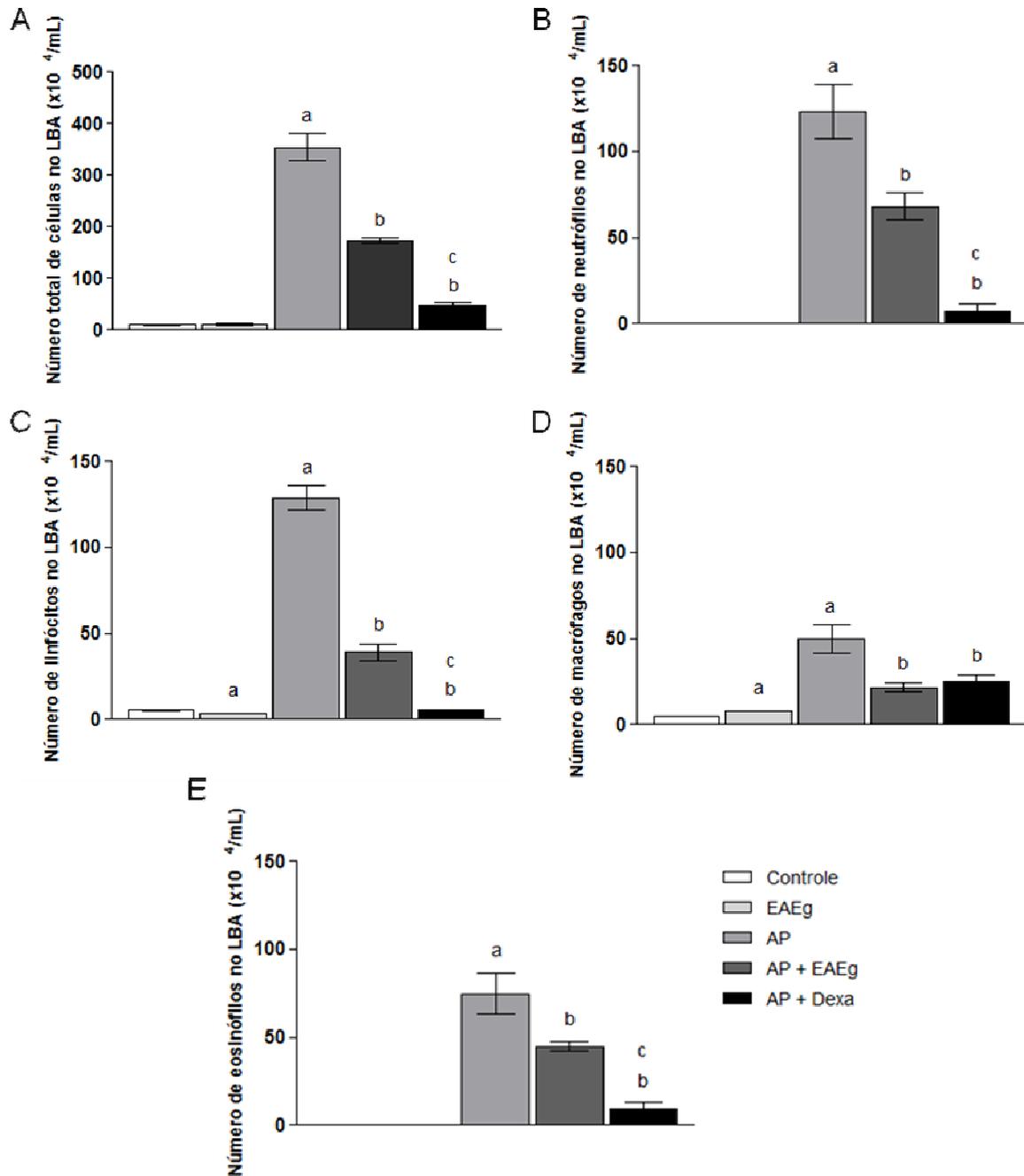


Figura 14. Contagem total e específica de células no LBA. (A) Número total de células, (B) número de neutrófilos, (C) número de linfócitos, (D) número de macrófagos e (E) número de eosinófilos no LBA (x10<sup>4</sup>/mL). Barras representam a média ± erro padrão. a p<0,05 versus Controle; b p<0,05 versus AP; c p<0,05 versus AP + EAEG.

## 5.6 Expressão de marcadores celulares nas células do lavado bronco-alveolar

A avaliação da expressão dos marcadores celulares nas células do LBA demonstrou que a indução do modelo de alergia pulmonar aumentou significativamente o percentual e o número total de células CD25<sup>+</sup> e a expressão de CD25, quando comparado com o grupo controle (Figura 15).

Nos animais com alergia pulmonar, o tratamento com EAEG aumentou significativamente o percentual de células CD25<sup>+</sup>, entretanto reduziu significativamente o número total de células CD25<sup>+</sup> e a expressão de CD25, quando comparado com o grupo AP (Figura 15).

Já o tratamento com dexametasona, nos animais com alergia pulmonar, não alterou o percentual de células CD25<sup>+</sup>, entretanto reduziu o número total de células CD25<sup>+</sup> e a expressão de CD25, quando comparado com o grupo AP. Também foram observadas reduções significativas no número total de células CD25<sup>+</sup> e na expressão de CD25 no grupo AP + Dexa quando comparado com o grupo AP + EAEG (Figura 15).

Adicionalmente, houve aumento significativo no percentual e no número total de células CD25<sup>+</sup> no grupo EAEG quando comparado com o grupo controle. Entretanto, não houve diferença na expressão de CD25 entre esses grupos (Figura 15).

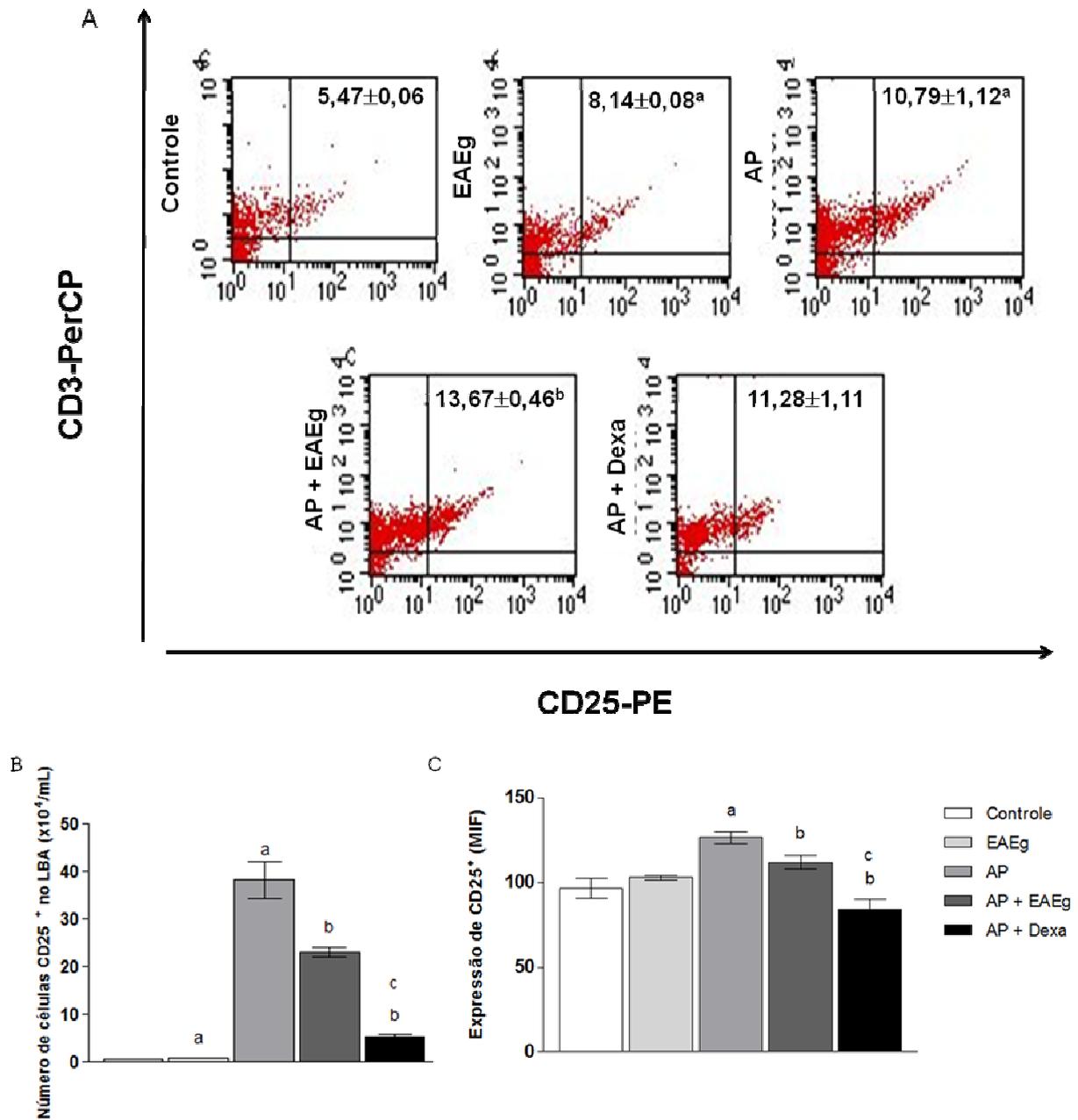


Figura 15. Expressão de CD25 nas células do LBA. (A) Percentual de células CD25<sup>+</sup>. (B) Número absoluto de células CD25<sup>+</sup> (X 10<sup>4</sup>/mL). (C) Expressão de CD25. Barras representam a média ± erro padrão. a p<0,05 versus Controle; b p<0,05 versus AP; c p<0,05 versus AP + EAEG. Cada dot plot é representativo do respectivo grupo experimental. MIF, média de intensidade de fluorescência.

Em relação à expressão do marcador CD28<sup>+</sup> nas células do LBA, a indução do modelo de alergia pulmonar induziu ao aumento significativo no percentual e no número total de células CD28<sup>+</sup> e na expressão de CD28, quando comparado com o grupo controle (Figura 16).

Nos animais com alergia pulmonar, o tratamento com EAEG aumentou significativamente o percentual de células CD28<sup>+</sup> e não alterou o número total células CD28<sup>+</sup> e a expressão de CD28, quando comparado com o grupo AP (Figura 16).

Já o tratamento com dexametasona, nos animais com alergia pulmonar, não alterou o percentual de células CD28<sup>+</sup> e a expressão de CD28, mas reduziu significativamente o número total de células CD28<sup>+</sup>, quando comparado com o grupo AP. Também foram observadas reduções significativas no percentual e no número total de células CD28<sup>+</sup> e na expressão de CD28 no grupo AP + Dexa, quando comparado com o grupo AP + EAEG (Figura 16).

Não houve diferença no percentual de células CD28<sup>+</sup> e na expressão de CD28, comparando os grupos controle e EAEG. Entretanto, houve aumento significativo no número total de células CD28<sup>+</sup> no grupo EAEG quando comparado com o grupo controle (Figura 16).

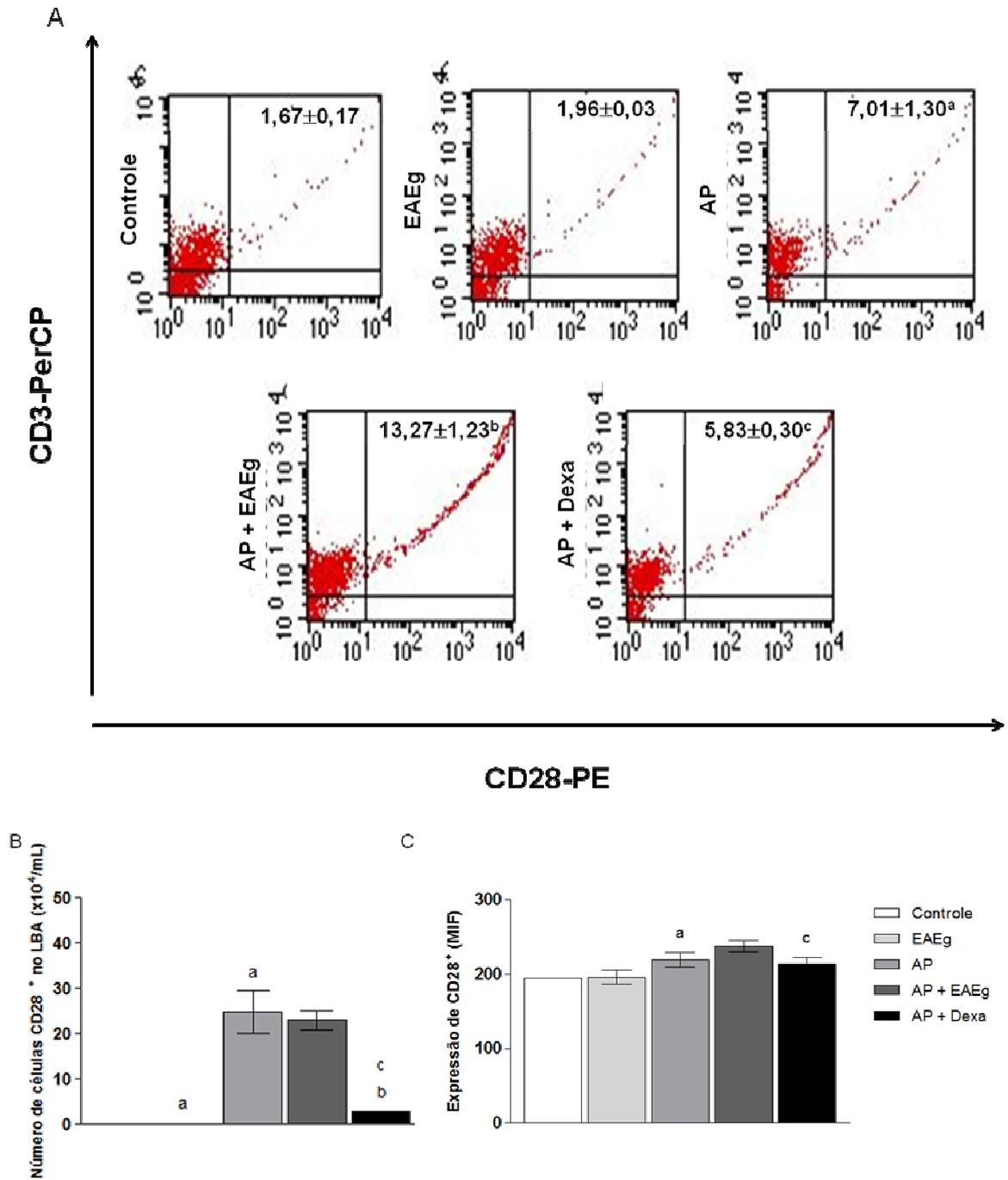


Figura 16. Expressão de CD28 nas células do LBA. (A) Percentual de células CD28<sup>+</sup>. (B) Número absoluto de células CD28<sup>+</sup> (X 10<sup>4</sup>/mL). (C) Expressão de CD28. Barras representam a média ± erro padrão. a  $p < 0,05$  versus Controle; b  $p < 0,05$  versus AP; c  $p < 0,05$  versus AP + EAEG. Cada dot plot é representativo do respectivo grupo experimental. MIF, média de intensidade de fluorescência.

Quanto à expressão do marcador CD152<sup>+</sup> nas células do LBA a indução do modelo de alergia pulmonar aumentou significativamente o percentual e o número total de células CD152<sup>+</sup>, quando comparado com o grupo controle. Entretanto, não foram observadas diferenças na expressão de CD152 entre os grupos controle e AP (Figura 17).

Nos animais com alergia pulmonar, o tratamento com EAEG aumentou significativamente o percentual de células CD152<sup>+</sup> e não alterou o número total de células CD152<sup>+</sup> e a expressão de CD152, quando comparado com o grupo AP (Figura 17).

Já o tratamento com dexametasona, nos animais com alergia pulmonar, não alterou o percentual de células CD152<sup>+</sup>, mas reduziu significativamente o número total de células CD152<sup>+</sup> e aumentou significativamente a expressão de CD152, quando comparado com o grupo AP. Também foram observadas a redução significativa no número total de células CD152<sup>+</sup> e o aumento significativo na expressão de CD152 no grupo AP + Dexa, quando comparado com o grupo AP + EAEG (Figura 17).

Não foram observadas diferenças no percentual e no número total de células CD152<sup>+</sup>, comparando os grupos controle e EAEG. Entretanto, houve redução significativa na expressão de CD152 no grupo EAEG quando comparado com o grupo controle (Figura 17).

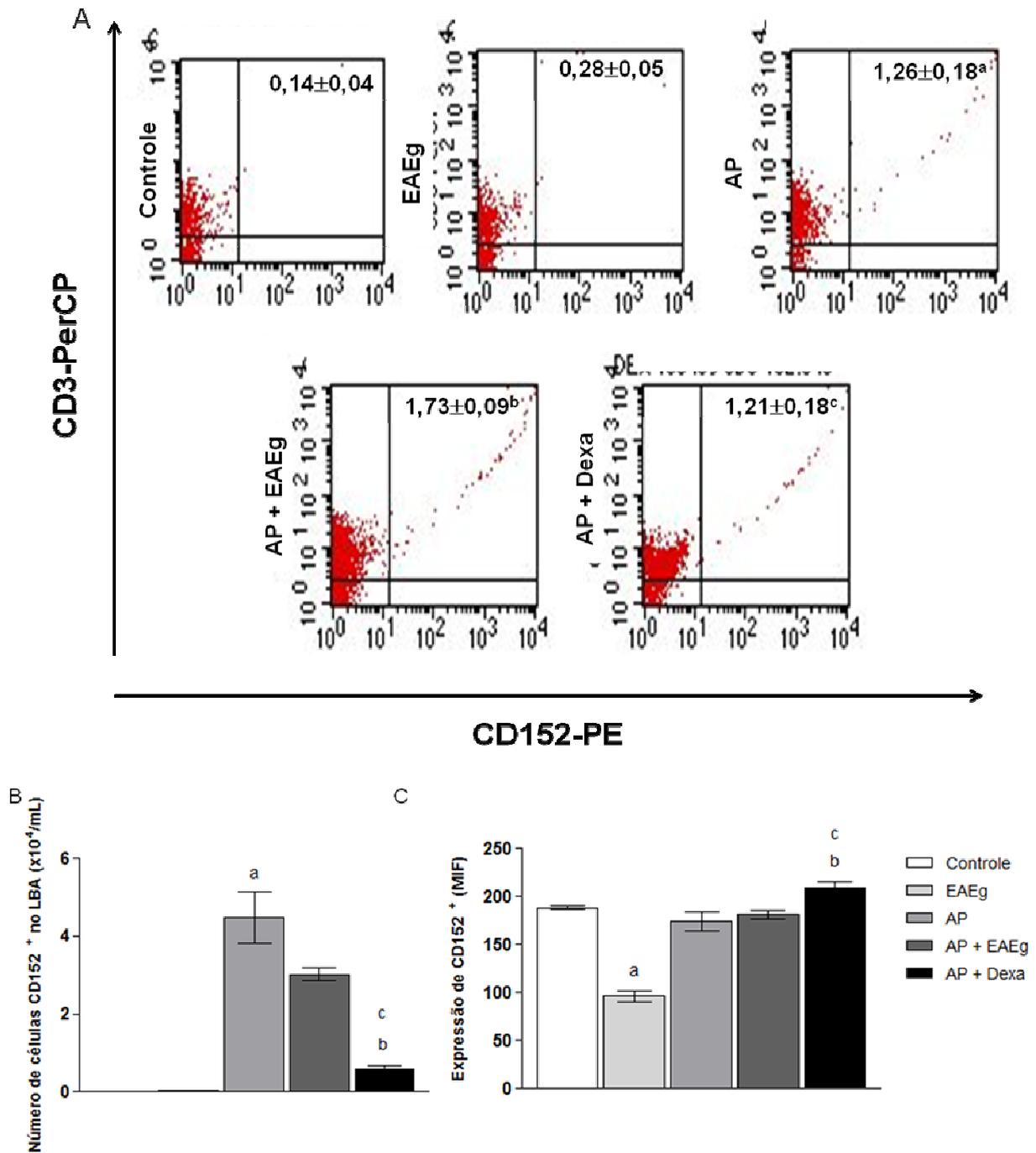


Figura 17. Expressão de CD152 nas células do LBA. (A) Percentual de células CD152<sup>+</sup>. (B) Número absoluto de células CD152<sup>+</sup> (X 10<sup>4</sup>/mL). (C) Expressão de CD152. Barras representam a média ± erro padrão. a p<0,05 versus Controle; b p<0,05 versus AP; c p<0,05 versus AP + EAEG. Cada dot plot é representativo do respectivo grupo experimental. MIF, média de intensidade de fluorescência.

## 5.7 Níveis de citocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar

Quanto aos níveis de citocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar, foi observado aumento significativo na produção de IL-4, IL-13 e IL-10 com a indução do modelo de alergia pulmonar, quando comparado ao grupo controle (Figuras 18A, 18B e 18C). Os níveis de produção de IL-17A no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar não foram alterados no grupo AP, quando comparado ao grupo controle (Figura 18D).

Nos animais com alergia pulmonar, o tratamento com EAEG não alterou os níveis de produção de nenhuma das citocinas avaliadas, enquanto o tratamento com dexametasona reduziu significativamente os níveis de produção de todas as citocinas avaliadas quando comparadas ao grupo AP e os níveis de IL-4, IL-13 e IL-10 quando comparado ao grupo AP + EAEG (Figura 18).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e EAEG quanto à produção de nenhuma das citocinas avaliadas (Figura 18).

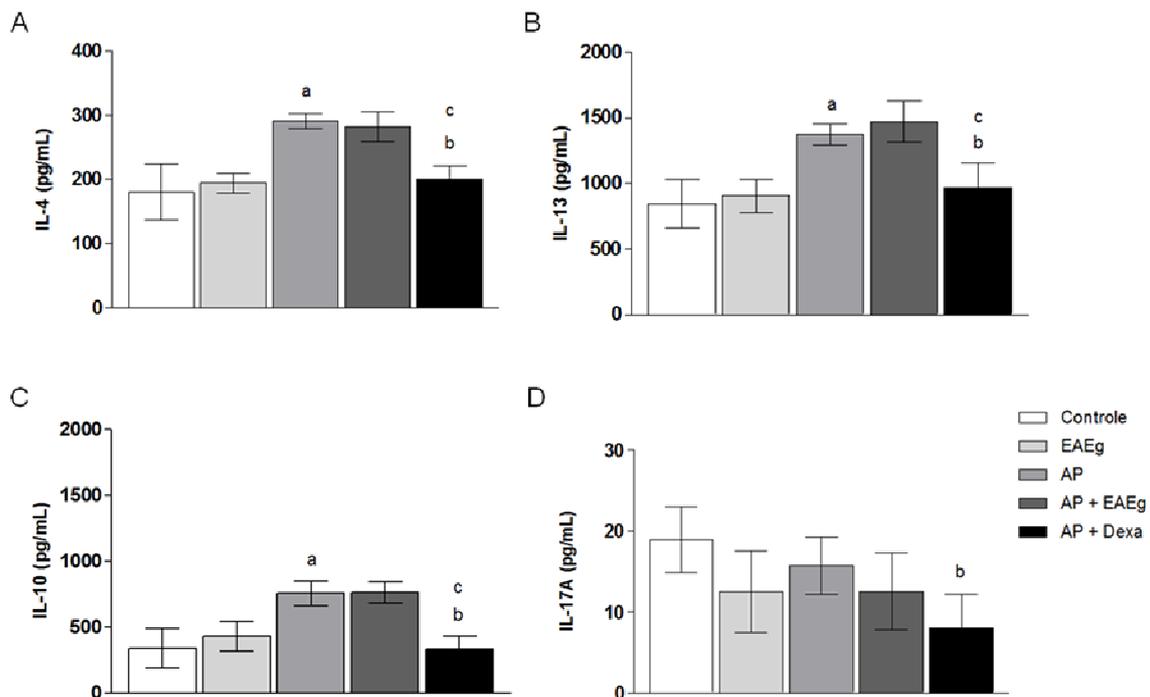


Figura 18. Níveis das citocinas (A) IL-4, (B) IL-13, (C) IL-10 e (D) IL-17A no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar (pg/mL). Barras representam a média  $\pm$  erro padrão. a  $p < 0,05$  versus Controle; b  $p < 0,05$  versus AP; c  $p < 0,05$  versus AP + EAEG.

## 5.8 Expressão gênica de IL-4 e IL-13

Analisando a expressão gênica, podemos observar que a indução do modelo de alergia pulmonar aumentou a expressão gênica de IL-4 em aproximadamente 134 vezes e de IL-13 em aproximadamente 116 vezes, quando comparado com o grupo controle (Figura 19).

Nos animais com alergia pulmonar, os tratamentos com EAEG e com dexametasona reduziram a expressão gênica para as duas citocinas avaliadas. Para a IL-4 a redução foi de aproximadamente 1,6 vezes com o tratamento com EAEG e de aproximadamente 16 vezes com o tratamento com dexametasona, quando comparados ao grupo AP. Para a IL-13 a redução foi de aproximadamente 1,6 vezes com o tratamento com EAEG e de aproximadamente 20 vezes para o tratamento com dexametasona, quando comparados ao grupo AP (Figura 19).

Também foram observadas reduções significativas na expressão gênica de IL-4 e IL-13 no grupo AP + Dexa, quando comparado ao grupo AP + EAEG (Figura 19).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e EAEG em relação à expressão gênica de IL-4 e IL-13 (Figura 19).

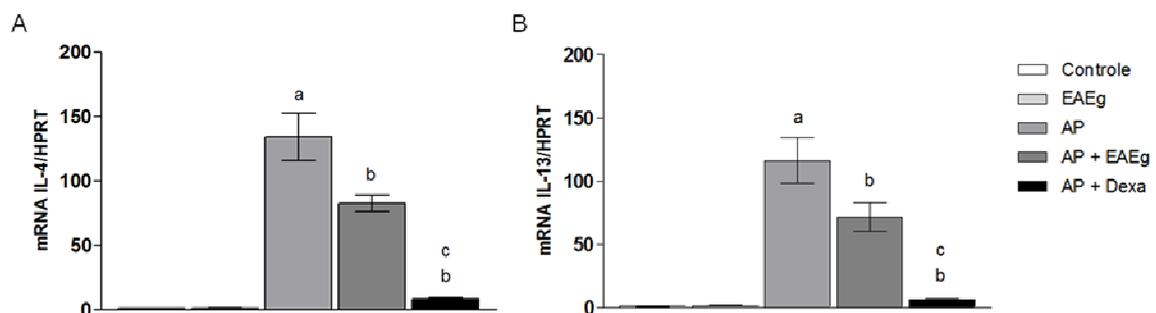


Figura 19. Expressão gênica de (A) IL-4 e (B) IL-13 nas amostras de tecido pulmonar, em relação à expressão do grupo controle, normalizadas pelo controle endógeno (HPRT). Barras representam a média  $\pm$  erro padrão. a  $p < 0,05$  versus Controle; b  $p < 0,05$  versus AP; c  $p < 0,05$  versus AP + EAEG.

### 5.9 Expressão gênica de Foxp3

A avaliação da expressão gênica de Foxp3, demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle, EAEG, AP e AP + EAEG. Nos animais com alergia pulmonar, o tratamento com dexametasona reduziu significativamente os níveis de expressão gênica para este fator de transcrição, quando comparado aos grupos AP e AP + EAEG, sendo esta redução de aproximadamente 8 vezes quando comparado ao grupo AP (Figura 20).

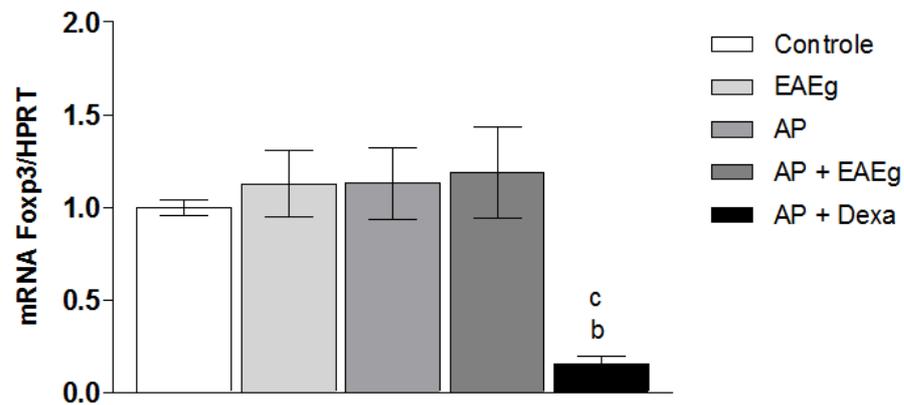


Figura 20. Expressão gênica de Foxp3 nas amostras de tecido pulmonar, em relação à expressão do grupo controle, normalizada pelo controle endógeno (HPRT). Barras representam a média ± erro padrão. a  $p < 0,05$  versus Controle; b  $p < 0,05$  versus AP; c  $p < 0,05$  versus AP + EAEG.

## 6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, a indução do modelo de alergia pulmonar por OVA foi capaz de mimetizar as principais características da asma alérgica humana. Embora não se tenha avaliado a hiperresponsividade brônquica, outros parâmetros como infiltrado inflamatório intenso no tecido pulmonar, aumento no número de eosinófilos e na atividade da EPO no tecido pulmonar, aumento do número total de células e no número de neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilos no LBA, além de aumento dos níveis de IgE específica para OVA foram observados. A caracterização histopatológica das vias aéreas e do parênquima pulmonar é um dos fatores determinantes no estabelecimento de um paralelo entre a asma em pacientes e em modelos murinos (revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005).

Em maior ou menor grau estes modelos são associados com a presença de eosinófilos, variando entre 30 a 80% do total de células, dependendo do modelo (revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005). Neste trabalho, o percentual de eosinófilos no LBA foi de aproximadamente 20% do total de células. Embora a maioria dos trabalhos utilizando modelos murinos realize a eutanásia dentro de 24 horas após o último desafio (PACÍFICO *et al.*, 2009; VASCONCELOS *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2008), optou-se por realizar a eutanásia dentro de 8 horas após o último desafio, pois este foi o melhor momento para avaliar a produção de citocinas conforme experimento prévio realizado em nosso laboratório. Esse fato talvez possa explicar o percentual de eosinófilos encontrado no LBA neste trabalho.

A presença de eosinófilos no LBA e nos cortes histológicos de pulmão corados com HE nos animais sensibilizados e desafiados com OVA parece estar correlacionada com a elevada atividade da EPO encontrada neste trabalho. Assim, sabendo-se que os eosinófilos são células centrais no desenvolvimento de inflamação das vias aéreas e que a EPO é a proteína catiônica mais característica dessas células, com capacidade de induzir lesão tecidual e disfunção torna-se importante reproduzir essas características em modelos murinos de alergia pulmonar (revisado por NEVES e WELLER, 2009; revisado por HOGAN *et al.*, 2008; revisado por EGESTEN *et al.*, 2001). O aumento da atividade da EPO nos animais com inflamação pulmonar induzida por OVA tem sido descrito por outros autores e foi observada neste trabalho (PACÍFICO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2008).

O aumento no número de células no LBA e o infiltrado celular intenso observado nos cortes histológicos de tecido pulmonar corados com HE, encontrados no modelo de alergia pulmonar neste trabalho, podem estar relacionados ao aumento das quimiocinas CCL2, CCL5 e CCL11. Essas quimiocinas foram avaliadas e encontraram-se elevadas nos animais sensibilizados e desafiados com OVA. A quimiocina CCL2 (MCP-1) se liga aos receptores CCR2 e CCR4 e tem uma potente ação quimioatraente para monócitos, linfócitos T de memória, basófilos e células NK (natural killer). Além disso, é capaz de induzir a expressão de integrinas requeridas para quimiotaxia de monócitos e é um potente fator de liberação de histamina dos basófilos. A quimiocina CCL5 (RANTES) se liga aos receptores CCR1, CCR2, CCR3, CCR4 e CCR5 e tem uma potente ação quimioatraente para linfócitos T de memória, eosinófilos, basófilos, células NK, células dendríticas e monócitos. Esta quimiocina é capaz de ativar as células NK, sendo um importante fator de liberação de histamina dos basófilos. A quimiocina CCL11 (eotaxina) se liga ao receptor CCR3 e tem habilidade para atrair especificamente os eosinófilos, trabalhando em conjunto com a citocina IL-5 (revisado por ROLLINS, 1997). Trabalhos recentes demonstraram o aumento da produção dessas quimiocinas no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA e este resultado foi reproduzido neste trabalho (PACÍFICO *et al.*, 2009; CHOI *et al.*, 2009; MIN *et al.*, 2009).

Além da presença de infiltrado celular no tecido pulmonar, de aumento do número de células no LBA e de quimiocinas no tecido pulmonar, outra observação que comprova a indução do modelo de alergia pulmonar são os altos níveis de IgE específica para OVA encontrados no soro dos animais sensibilizados e desafiados com OVA neste trabalho, reforçando o fato do modelo induzido ser de asma atópica (revisado por IWAKURA *et al.*, 2008).

No intuito de caracterizar as populações celulares presentes no modelo utilizado foram realizadas as marcações CD25, CD28 e CD152 através da técnica de citometria de fluxo. Foram observados aumentos no percentual e no número total de células CD25<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD152<sup>+</sup> e na expressão de CD25 e CD28, nos animais sensibilizados e desafiados com OVA. O CD25 é a cadeia  $\alpha$  do receptor para IL-2 e encontra-se na superfície de linfócitos T e B ativados, enquanto os receptores CD28 e CD152 são expressos predominantemente na superfície das células T (revisado por O'SHEA, MA e LIPSKY, 2002; revisado por SANSOM e WALKER, 2008). O aumento no percentual e no número total dessas células pode estar associado ao

aumento no número de linfócitos T e B no modelo de alergia pulmonar, no caso dos linfócitos T, provavelmente células Th2.

Quanto ao CD28, já foi demonstrado anteriormente que sua expressão encontra-se aumentada em pacientes asmáticos, estando o CD28 associado ao desenvolvimento das respostas alérgicas (WONG *et al.*, 2005). Em trabalho onde foram utilizados camundongos deficientes em CD28 não foi observado desenvolvimento de inflamação em resposta a sensibilização e desafio com OVA e os autores sugeriram que o CD28 é necessário para a diferenciação e função normal das células Th2 em resposta a OVA (BURR *et al.*, 2001). Portanto, o aumento no percentual e no número total de células CD28<sup>+</sup> e na expressão de CD28 neste modelo parece estar associado ao desenvolvimento de uma resposta alérgica, predominantemente de linfócitos Th2.

Em relação à expressão de CD152, não foi observado aumento com a indução de alergia pulmonar. Em trabalho publicado por Burr e colaboradores (2001), o tratamento de camundongos deficientes em CD28 com anti-CD152 restaurou o recrutamento de células inflamatórias para o pulmão e os autores sugerem que a ligação entre CD152 e seu ligante B7 previne a inflamação na ausência de CD28, sendo o CD152 capaz de inibir a ativação dos linfócitos T e também sua habilidade para ser recrutado para o local do desafio com o antígeno. A ausência de alteração na expressão de CD152 nos animais sensibilizados e desafiados com OVA neste trabalho pode indicar, possivelmente, maior ativação dos linfócitos Th2 associada à permanência dessas células no tecido pulmonar.

Foram observados neste trabalho a elevação tanto dos níveis de expressão gênica quanto protéica das citocinas IL-4 e IL-13 produzidas no tecido pulmonar. É bem documentado que a resposta imune na alergia pulmonar é caracterizada por uma resposta predominantemente de células Th2, com altos níveis de produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (VIEIRA *et al.*, 2007). A citocina IL-4 está relacionada com a troca de isotipo para a classe IgE pelos linfócitos B enquanto a IL-13 tem sido associada ao desenvolvimento de hiperresponsividade das vias aéreas (revisado por RENAULD, 2001). Outros autores já demonstraram a elevação dessas citocinas em modelos de alergia pulmonar induzida por OVA e esses resultados foram reproduzidos neste trabalho (PACÍFICO *et al.*, 2009; CHOI *et al.*, 2009; VASCONCELOS *et al.*, 2008).

Neste trabalho os animais foram eutanasiados 8 horas após o último desafio e os níveis de produção da citocina reguladora IL-10 encontraram-se elevados no tecido pulmonar dos animais sensibilizados e desafiados com OVA. Em trabalhos publicados recentemente, a eutanásia dos animais foi realizada 4 horas ou 24 horas depois do último desafio e foi observado aumento da expressão gênica para a citocina IL-10 nas vias aéreas e no tecido pulmonar de animais expostos à OVA (KIM *et al.*, 2008; HERBERT *et al.*, 2008). Outros trabalhos, nos quais os animais foram eutanasiados 24 horas depois do último desafio, não revelaram diferenças nos níveis de IL-10 entre estes grupos (PACÍFICO *et al.*, 2009; ROGERIO *et al.*, 2007a). As diferentes respostas obtidas nestes trabalhos podem ser devido aos diferentes protocolos de indução de alergia pulmonar com exposição aguda ou crônica à OVA e também devido ao tempo que precedeu a eutanásia após o último desafio.

Sabe-se que as citocinas tem ações complexas, são pleiotrópicas, redundantes em alguns graus e influenciam a produção de outras citocinas, podendo atuar de forma imunoestimuladora ou imunossupressora (revisado por O'SHEA, MA e LIPSKY, 2002). Sendo assim, a elevação inicial na produção da IL-10 poderia indicar uma resposta imune reguladora para os linfócitos Th1, com redução na produção de IFN- $\gamma$  associado ao desenvolvimento e proliferação dos linfócitos Th2. Na sequência, poderia ocorrer queda na produção da IL-10, atingindo valores semelhantes aos do controle em torno de 24 horas após o último desafio. Neste momento, a expressão gênica da IL-10 pode se elevar, o que pode sugerir o início de uma resposta imune supressora para os linfócitos Th2, na tentativa de controlar a resposta inflamatória pulmonar alérgica.

Quanto à produção da citocina IL-17A, os resultados não mostraram diferenças entre os animais sensibilizados e desafiados com OVA e os animais controle. Já havia sido demonstrado anteriormente aumento da expressão gênica para esta citocina nas vias aéreas de animais expostos de forma crônica à OVA e os autores sugerem que existe uma possível contribuição das células Th17 e da citocina IL-17A na patogênese da asma crônica e nas mudanças observadas no remodelamento das vias aéreas (HERBERT *et al.*, 2008). Diferentes trabalhos reportaram que a IL-17A tem pouca ou nenhuma contribuição ou papel regulador no modelo de eosinofilia pulmonar predominantemente Th2, sendo de maior importância no modelo de alergia pulmonar neutrofilica não Th2. Adicionalmente, foi demonstrado que a sensibilização intraperitoneal com alumen induz a uma fraca

resposta de células Th17 e recrutamento de neutrófilos (revisado por IWAKURA *et al.*, 2008). A sensibilização no modelo de alergia pulmonar induzido neste trabalho foi realizada com OVA adsorvida em alumen por via intraperitoneal e o período de exposição dos animais ao alérgeno foi curto, caracterizando o modelo como agudo. Esses fatores podem estar relacionados à ausência de alteração nos níveis de IL-17A relatados aqui.

Neste trabalho, assim como reportado por Kim e colaboradores (2008), a inflamação pulmonar induzida por OVA não alterou os níveis de expressão gênica de Foxp3. Já é bem descrito que o Foxp3 é um fator de transcrição expresso em altos níveis pelas células T reguladoras naturais CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e é essencial para o seu desenvolvimento e função (revisado por HAWRYLOWICZ, 2005). O fato de não ter sido demonstrada alteração na expressão gênica de Foxp3 neste trabalho pode se correlacionar com a redução de linfócitos T reguladores e consequentemente desenvolvimento da inflamação pulmonar alérgica.

A partir da indução e caracterização do modelo de alergia pulmonar, foi iniciada a avaliação referente à administração oral do extrato aquoso de *E. grandiflorus*, que demonstrou resultado promissor em relação ao tratamento da inflamação alérgica induzida por OVA.

O efeito anti-inflamatório do extrato aquoso de *E. grandiflorus* já havia sido demonstrado em modelos de edema plantar induzido pelo composto 48/80 e por histamina (PIMENTA, 2002) e no modelo de contorções abdominais induzidas por injeção intraperitoneal de ácido acético (CARDOSO *et al.*, 2003).

A avaliação qualitativa das substâncias presentes no extrato aquoso utilizado neste trabalho mostrou a presença de compostos fenólicos, flavonóides, saponinas, triterpenos e taninos. Vários trabalhos já haviam demonstrado a presença dessas classes de substâncias em diferentes extratos de *E. grandiflorus* (MANNIS e HARTMANN, 1993; TANAKA *et al.*, 1997; COSTA *et al.*, 1999; TANAKA, 2000; DUARTE *et al.*, 2002; PIMENTA, 2002; PIMENTA, 2006; LIMA, 2006; SCHNITZLER, PETEREIT e NAHRSTEDT, 2007).

Muitos destes constituintes químicos já tiveram seu potencial terapêutico avaliado no modelo de alergia pulmonar induzido por OVA. Os compostos fenólicos estão presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de plantas e animais e são comumente consumidos na dieta alimentar. Os taninos são componentes polifenólicos distribuídos nas plantas, alimentos e bebidas. Estas

substâncias apresentam atividades biológicas variadas, dentre elas a atividade antioxidante, benéfica para a saúde humana (revisado por CORRÊA, MELO e COSTA, 2008). No modelo de alergia pulmonar foi testado recentemente o extrato etanólico das cascas dos caules de *Lafoensia pacari* e o composto fenólico ácido elágico, capazes de diminuir o número de células no LBA e o infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar (ROGERIO *et al.*, 2008).

Os flavonóides compreendem um grupo de compostos amplamente distribuídos no reino vegetal, que estão intimamente ligadas com processos fisiológicos das plantas. No organismo de mamíferos, são capazes de atuar como imunomoduladores, anti-inflamatórios, antivirais, bactericidas, hepatoprotetores, gastroprotetores e antioxidantes (revisado por CORRÊA, MELO e COSTA, 2008). Resultados promissores relativos à redução do processo inflamatório no modelo de alergia pulmonar foram obtidos com o tratamento com os flavonóides quercetina e isoquercitrina (ROGERIO *et al.*, 2007b) e com o flavonóide glicosídeo kaempferol (MEDEIROS *et al.*, 2009).

As saponinas são um vasto grupo de glicosídeos amplamente distribuídos nas plantas, essas substâncias se dissolvem em água formando soluções coloidais que fazem espuma sob agitação e possuem propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas, entre outras. Os triterpenóis consistem de um esqueleto C30, compreendendo uma estrutura pentacíclica (revisado por SPARG, LIGHT e van STADE, 2004). O lupeol, um triterpeno isolado das cascas do tronco de *Diploptropis ferruginea*, atenuou as alterações características da inflamação alérgica das vias aéreas em um modelo de alergia pulmonar induzida por OVA (VASCONCELOS *et al.*, 2008).

Pimenta (2002) avaliou diversas atividades farmacológicas para os extratos de *E. grandiflorus* e observou que a planta possui substâncias ativas em mais de um tipo de extrato. O mesmo autor afirmou que não foi possível determinar qual fração exerce a atividade anti-inflamatória visto que amostras quimicamente diferentes e sem substâncias em comum apresentaram efetividade significativa. Nesse sentido é possível imaginar que a atividade biológica do extrato aquoso de *E. grandiflorus* utilizado neste trabalho resulta de vários compostos diferentes.

O tratamento com extrato aquoso de *E. grandiflorus* não reduziu o infiltrado celular inflamatório e o número de eosinófilos no tecido pulmonar. Entretanto, foram observadas redução na atividade da EPO no tecido pulmonar e redução nos

números total e das subpopulações celulares de neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilos no LBA neste trabalho.

O fato de não serem observadas reduções do infiltrado celular inflamatório e do número de eosinófilos no tecido pulmonar pode estar relacionado à dose de extrato aquoso de *E. grandiflorus* utilizada e ao tempo de tratamento. A dose de escolha, 23mg/kg de peso corporal, é a dose recomendada para humanos (LOPES *et al.*, 2000) e o tempo de tratamento de 9 dias se baseou no tempo entre os desafios no modelo de indução de alergia pulmonar utilizada neste trabalho. Novos experimentos empregando doses mais elevadas e tempos de tratamento mais longos, incluindo protocolos com o tratamento com o extrato aquoso de *E. grandiflorus* antes do período de sensibilização, deverão ser realizados para observar os efeitos preventivos e curativos sobre o processo inflamatório no tecido pulmonar. Alguns autores avaliaram os efeitos preventivos e curativos dos tratamentos com *L. pacari* e ácido elágico e com o flavonóide glicosídeo kaempferol no modelo murino de asma e observaram resultados promissores no controle da inflamação pulmonar (ROGERIO *et al.*, 2008 e MEDEIROS *et al.*, 2009).

Embora o tratamento oral com o extrato aquoso de *E. grandiflorus* não tenha reduzido o infiltrado inflamatório e o número de eosinófilos no tecido pulmonar, houve redução da atividade da EPO nesse tecido, resultado encontrado também com o tratamento com dexametasona. Pode-se sugerir que esta redução da EPO está relacionada com a redução da atividade celular, já que a EPO é liberada após a ativação dessas células e tem capacidade de induzir lesão tecidual e disfunção (revisado por NEVES e WELLER, 2009).

Adicionalmente, foi observada redução nos níveis de produção da quimiocina CCL11 no tecido pulmonar. Esta quimiocina se liga ao receptor CCR3 e tem habilidade para atrair especificamente os eosinófilos, trabalhando em conjunto com a citocina IL-5 (revisado por ROLLINS, 1997). Além disso, o fato dos animais terem sido eutanasiados 8 horas após o último tratamento pode ter influenciado esses resultados, não havendo tempo suficiente para que ocorresse inibição da migração celular relacionada à queda da produção de CCL11. Nesse sentido, avaliar os animais em diferentes pontos de tempo, por exemplo, 8, 12 e 24 horas após o último tratamento, e dosar os níveis de produção da IL-5, envolvida no recrutamento e na ativação de eosinófilos (revisado por ROLLINS, 1997), pode ser útil para esclarecer

os mecanismos de atuação do extrato aquoso de *E. grandiflorus* no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA.

O tratamento com extrato aquoso de *E. grandiflorus* não teve efeito sobre os níveis de produção de CCL2 e CCL5, muito embora tenham sido observadas reduções no número de macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos no LBA. A quimiocina CCL2 está relacionada à migração de monócitos e macrófagos, e a CCL5 está relacionadas à migração de eosinófilos e linfócitos para o tecido pulmonar (revisado por ROLLINS, 1997). Este resultado, aparentemente contraditório, pode ser explicado por duas hipóteses. Em primeiro lugar o tratamento oral com o extrato aquoso de *E. grandiflorus* pode ter reduzido a expressão dos receptores para essas quimiocinas, reduzindo a migração das células inflamatórias para o local da resposta. Em segundo lugar, os resultados encontrados podem ser devido à cinética da resposta com o tratamento com o extrato, ocorrendo inicialmente queda dos níveis de CCL2 e CCL5, levando à redução na migração de macrófagos, linfócitos e eosinófilos e, posteriormente, aumento dos níveis dessas quimiocinas, atingindo valores semelhantes aos dos animais sensibilizados e desafiados com OVA dentro de 8 horas após o último desafio.

Outro resultado relevante, foi a redução dos níveis de IgE específica para OVA no soro com o tratamento com extrato aquoso de *E. grandiflorus*, resultado similar ao encontrado no tratamento com dexametasona. A IgE tem um papel fundamental na sensibilização e degranulação dos mastócitos e consequente liberação de mediadores inflamatórios associados ao broncoespasmo (revisado por AVERBECK *et al.*, 2007). Já foi demonstrado que o bloqueio da ação da IgE com o anticorpo monoclonal omalizumab reduz a resposta a alérgenos, a inflamação alérgica das vias aéreas e as exacerbações da asma (revisado por BARNES, 2008).

Embora não tenham sido encontrados na literatura trabalhos do efeito do extrato aquoso de *E. grandiflorus* sobre a resposta imune, em artigo publicado por Pinto e colaboradores (2007) evidências de atividade imunossupressora para o extrato aquoso de *E. macrophyllus*, que se assemelha morfológicamente e quanto aos constituintes químicos a *E. grandiflorus* e é também conhecida popularmente por chapéu de couro foram demonstradas. Esses autores observaram que o extrato aquoso de *E. macrophyllus* foi capaz de reduzir a produção de anticorpos aglutinantes, inibiu a produção de NO (óxido nítrico) *in vitro* e reduziu o infiltrado de leucócitos no tecido subcutâneo no modelo de hipersensibilidade do tipo tardia. Uma

sugestão futura seria avaliar especificamente a população de linfócitos B, através de marcações de moléculas expressas na superfície dessas células, como B220, o que poderá contribuir para elucidar se a queda na produção de IgE está relacionada com a redução do número de linfócitos B ou com a inibição da sua função.

Em relação aos marcadores celulares foram observados aumentos no percentual de células CD25<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> e CD152<sup>+</sup> com o tratamento com extrato aquoso de *E. grandiflorus*. Entretanto, houve redução no número total de células CD25<sup>+</sup> e na expressão de CD25, sugerindo diminuição da população celular e menor ativação de linfócitos T e B. Isto pode se correlacionar com a redução dos níveis de expressão gênica de IL-4 e IL-13 pelos linfócitos Th2, levando a redução dos níveis de IgE específica para OVA produzidas pelos linfócitos B ativados.

Já o número total de células CD28<sup>+</sup> e CD152<sup>+</sup> e a expressão de CD28 e CD152 não foram alteradas pelo tratamento com extrato aquoso de *E. grandiflorus*, o que pode significar que o extrato não modula a inflamação alérgica pulmonar através da regulação dessas moléculas. Outra hipótese é que pode estar ocorrendo uma redução no número de linfócitos Th2, com consequente redução da resposta imune alérgica, associada ao aumento do número de linfócitos Th1, sem alteração no número total e na expressão de CD28 e CD152, já que estes são expressos por essas duas subpopulações de linfócitos T. Investigar a expressão de CD80 e CD86 expressos na superfície celular das APCs e os níveis dos receptores solúveis CD28, CD152, CD80 e CD86, além de avaliar a cinética da resposta imune com o tratamento com o extrato aquoso de *E. grandiflorus* poderá contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de ação do extrato neste modelo.

Em relação às citocinas IL-4 e IL-13, a expressão protéica avaliada no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar não se encontrou alterada com o tratamento com o extrato aquoso de *E. grandiflorus*, entretanto, a expressão gênica para essas citocinas foi reduzida no tecido pulmonar. Pode-se sugerir que eutanasiar os animais 8 horas após o último tratamento, influenciou o resultado obtido e não possibilitou a observação da queda dessas citocinas no tecido pulmonar. Avaliar a cinética da resposta com o tratamento com o extrato no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA pode ser interessante para elucidar os mecanismos envolvidos.

O tratamento com EAEG não alterou os níveis de produção das citocinas IL-10 e IL-17A, assim como não alterou os níveis de expressão gênica de Foxp3. Neste

sentido, é possível supor que os mecanismos envolvidos na redução da inflamação no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA provavelmente não estão relacionados ao desenvolvimento de células T reguladoras ou Th17. Outra possibilidade é supor que a eutanásia dos animais 8 horas após o último tratamento, não permitiu que as alterações nos níveis de produção dessas citocinas e do fator de transcrição Foxp3 fossem observadas. Avaliar através da citometria de fluxo a marcação simultânea de moléculas características das células T reguladoras, como CD25, CD152 e Foxp3, além de citocinas intracelulares, como IL-10 e TGF- $\beta$ , poderá contribuir para esclarecer se realmente o extrato não induz o desenvolvimento de células T reguladoras.

Os resultados referentes ao tratamento com dexametasona na dose de 3mg/kg de peso corporal são descritos em seguida. Neste trabalho o tratamento com dexametasona reduziu visivelmente o infiltrado inflamatório nos cortes de tecido pulmonar corados com HE. Embora o número de eosinófilos no tecido pulmonar não tenha sido reduzido, houve redução da atividade da EPO neste tecido. O total de células e os números de neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilos no LBA foram reduzidos, o que se correlacionou com a queda nos níveis de produção das quimiocinas CCL2, CCL5 e CCL11 no tecido pulmonar.

A redução dos níveis de IgE no soro e dos números absolutos de células CD25, CD28 e CD152 também foram observadas com o tratamento com dexametasona. Além disso, houve queda dos níveis de expressão gênica e protéica de IL-4 e IL-13. Finalmente, foram demonstradas redução dos níveis das citocinas IL-10 e IL-17A e queda da expressão gênica do fator de transcrição Foxp3 no tecido pulmonar.

A dexametasona é um glicocorticóide sintético muito utilizado no tratamento da asma e também como controle positivo em modelos murinos de inflamação pulmonar. Os resultados de inibição encontrados neste trabalho são semelhantes aos resultados encontrados por diversos autores que utilizaram esta droga como controle positivo no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA. O tratamento com dexametasona inalada em modelo murino de asma alérgica preveniu efetivamente a hiperresponsividade das vias aéreas, a hipersecreção de muco, levou à queda nos níveis de imunoglobulinas e à redução da inflamação das vias aéreas (JUNGSUWADEE *et al.*, 2004).

Em trabalho publicado por Herbert e colaboradores (2008) a dexametasona suprimiu a expressão gênica para as citocinas avaliadas nas vias aéreas de animais expostos de maneira crônica à OVA, incluindo IL-5, IL-13, IL-10 e IL-17A, suprimiu a expressão gênica para os fatores de crescimento avaliados e suprimiu a fibrose subepitelial e a hipertrofia epitelial das vias aéreas.

O tratamento com dexametasona reduziu os leucócitos no LBA, o infiltrado inflamatório no tecido pulmonar, a hiperresponsividade das vias aéreas e os níveis de produção de IL-4, IL-5 e IL-13 e leucotrienos (ROGERIO *et al.*, 2008).

Vasconcelos e colaboradores (2008) observaram redução no infiltrado inflamatório, na produção de muco, no número de eosinófilos no LBA, nos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 no LBA e nos níveis de IgE específica para OVA no soro.

Foi observado decréscimo da inflamação eosinofílica, redução de linfócitos CD4 e B220, redução da expressão de CD40, CD80 e MHCII nas células CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>, redução da produção de citocinas IL-5 e IL-13 no LBA, redução da hipersecreção de muco e melhora da hiperresponsividade das vias aéreas (MEDEIROS *et al.*, 2009). Tomados em conjunto, esses resultados nos permitem concluir que a dexametasona atua em diversos processos relacionados à inflamação alérgica das vias aéreas de maneira relativamente inespecífica.

No presente trabalho, o modelo de alergia pulmonar induzido por OVA mimetizou as principais características da asma alérgica humana que foram inibidas pela utilização da dexametasona. Sendo assim, este modelo pode ser útil na avaliação dos mecanismos imunopatológicos envolvidos no desenvolvimento da asma e a dexametasona continua sendo um bom controle positivo para se avaliar a eficácia de novos tratamentos neste modelo. Além disso, a administração oral do extrato aquoso de *E. grandiflorus* se mostrou promissora na modulação da resposta imune na alergia pulmonar induzida por OVA, com resultados semelhantes aos obtidos com o tratamento com dexametasona para alguns parâmetros avaliados. Pesquisas futuras são necessárias para se determinar mais especificamente os mecanismos de ação de *E. grandiflorus* e o uso seguro deste fitoterápico, principalmente em nível clínico, muito embora o mesmo já venha sendo utilizado pela população brasileira.

## 7 CONCLUSÕES

Inicialmente podemos concluir que a indução do modelo de alergia pulmonar por OVA foi capaz de mimetizar as principais características da asma alérgica humana, sendo um bom modelo para investigar os mecanismos imunopatológicos que levam ao desenvolvimento da asma e avaliar a eficácia de novos tratamentos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram-se promissores em relação ao controle da alergia pulmonar induzida por OVA através do tratamento com o extrato aquoso de *E. grandiflorus*. Os mecanismos de ação desse extrato parecem estar relacionados com a inibição da migração e função de eosinófilos, com redução da atividade da EPO, função de linfócitos B, com redução dos níveis de produção de IgE específica para OVA, além de migração e função de linfócitos Th2, levando a redução na produção de citocinas IL-4 e IL-13.

Quanto aos mecanismos envolvidos na redução da inflamação pulmonar com o tratamento com o extrato aquoso de *E. grandiflorus* provavelmente estes não estão relacionados ao desenvolvimento de células T reguladoras ou Th17.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Avaliar a cinética da resposta imune no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA, por exemplo, 8, 12 e 24 horas após o último desafio, através da análise histopatológica e das populações de leucócitos no LBA, da caracterização das populações celulares através da citometria de fluxo e da determinação dos níveis de expressão gênica e protéica das principais citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta imune na alergia pulmonar.

Realizar experimentos empregando diferentes doses do extrato aquoso de *E. grandiflorus* e tempos de tratamento mais longos, incluindo protocolos com o tratamento com o extrato antes do período de sensibilização.

Avaliar a cinética da resposta imune com o tratamento com o extrato aquoso de *E. grandiflorus* no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA, por exemplo, 8, 12 e 24 horas após o último desafio, através da análise histopatológica e das populações de leucócitos no LBA, da caracterização das populações celulares através da citometria de fluxo e da determinação dos níveis de expressão gênica e protéica das principais citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta.

## REFERÊNCIAS

ADCOCK, I. M.; CARAMORI, G.; CHUNG, K. F. 2008. New targets for drug development in asthma. **Lancet**, **372 (9643)**: 1073- 1087.

AVERBECK, M.; GEBHARDT, C.; EMMRICH, F.; TREUDLER, R.; SIMON, J. C. 2007. Immunologic Principles of Allergic Disease. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, **5**: 1015-1027.

BARNES, P. J. 2008. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Immunology**, **8 (3)**: 183-192.

BEVILAQUA, G. A. P.; NEDEL, J. L.; ZUANAZZI, J. A.; CORREA, C. T. 2001. Distribuição geográfica e composição química de chapéu de couro (*Echinodorus* spp.) no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural, Santa Maria**, **31 (2)**: 213-218.

BRAUN, A.; TSCHERING, T.; GRONEBERG, D. A. 2008. Editorial: Experimental models of asthma. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, **3 (Suppl 1)**: S1.

BUKSTEIN, D.; KRAFT, M.; LIU, A. H.; PETERS, S. P. 2006. Asthma end points and outcomes: What have we learned? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, **118 (4)**: S1-S15.

BURGLER, S.; OUAKED, N.; BASSIN, C.; ING D.; BASINSKI, T. M.; MANTEL, P.; SIEGMUND, K.; MEYER, N.; AKDIS, C. A.; SCHMIDT-WEBER, C. B. 2009. Differentiation and functional analysis of human TH17 cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, **123 (3)**: 588-595e7.

BURR, J. S.; KIMZEY, S. L.; RANDOLPH, D. R.; GREEN, J. M. 2001. CD28 and CTLA4 coordinately regulate airway inflammatory cell recruitment and T-helper cell differentiation after inhaled allergen. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, **24 (5)**: 563-568.

CARDOSO, G. L. C.; PEREIRA, N. A.; LAINETTI, R. 2003. Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e diurética de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*, [Cham. e Schl.] Mitch., Alismataceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **84 (1)**: 5-7.

CARDOSO, G. L. C.; PEREIRA, N. A.; LAINETTI, R. 2005. Avaliação da atividade do chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*) (Cham. & Schl.) Mitch. (Alismataceae) sobre os níveis plasmáticos de colesterol em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **86 (3)**: 95-96.

CHOI, J. H.; HWANG, Y. P.; LEE, H. S.; JEONG, H. G. 2009. Inhibitory effect of Platycodi Radix on ovalbumin-induced airway inflammation in a murine model of asthma. **Food and Chemical Toxicology**, **47 (6)**: 1272-1279.

CORRÊA, M. F. P.; de MELO, G. O.; COSTA, S. S. 2008. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **18 (Supl.)**: 785-797.

COSTA, M.; TANAKA, C. M. A.; IMAMURA, P. M.; MARSAIOLI, A. J. 1999. Isolation and synthesis of a new clerodane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry**, **50**: 117-122.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. 2002. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Editora UNESP, 2ª edição.

DUARTE, M. G. R.; SOARES, I. A. A.; BRANDÃO, M.; JÁCOME, R. L. R. P.; FERREIRA, M. D.; SILVA, C. R. F.; OLIVEIRA, A. B. 2002. Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana *in vitro* de plantas invasoras. **Revista Lecta**, **20 (2)**: 177-182.

DUTRA, R. C.; TAVARES, C. Z.; FERRAZ, S. O.; SOUZA, O. V.; PIMENTA, D. S. 2006. Investigação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, **16 (4)**: 469-474.

EGESTEN, A.; CALAFAT, J.; JANSSEN, H.; KNOL, E. F.; MALM, J.; PERSSON, T. 2001. Granules of human eosinophilic leucocytes and their mobilization. **Clinical and Experimental Allergy**, **31 (8)**: 1173-1188.

FERNANDEZ-RODRIGUEZ, S.; FORD, W. R.; BROADLEY, K. J.; KIDD, E. J. 2008. Establishing the phenotype in novel acute and chronic murine models of allergic asthma. **International Immunopharmacology**, **8 (5)**: 756-763.

GINA - Global Initiative for Asthma [on line]. Ed. 2007. Reino Unido. [acessado em 01 de Dezembro de 2008]. Disponível em: <http://www.ginasthma.org>.

HAWRYLOWICZ, C. M.; O'GARRA, A. 2005. Potential role of interleukin-10 secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, **5 (4)**: 271-283.

HERBERT, C.; HETTIARATCHI, A.; WEBB, D. C.; THOMAS, P. S.; FOSTER, P. S.; KUMAR, R. K. 2008. Suppression of cytokine expression by roflumilast and dexamethasone in a model of chronic asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, **38 (5)**: 847-856.

HOGAN, S. P.; ROSENBERG, H. F.; MOQBEL, R.; PHIPPS, S. FOSTER, P.S.; LACY, P.; KAY, A. B.; ROTHENBERG, M. E. 2008. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clinical and Experimental Allergy**, **38 (5)**: 709-750.

HUNG, L.; VELICHKO, S.; HUANG, F.; THAI, P.; WU, R. 2008. Regulation of airway innate and adaptive immune responses: The IL-17 paradigm. **Critical Reviews in Immunology**, **28 (4)**:269-279.

HUNTLEY, A.; ERNEST, E. 2000. Herbal medicines for asthma: a systematic review. **Thorax**, **55 (11)**: 925-929.

IV Diretrizes Brasileiras no Manejo da Asma. 2006. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, **32 (Supl 7)**: S447-S474.

IWAKURA, Y.; NAKAE, S.; SAIJO, S.; ISHIGAME, H. 2008. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. **Immunological Reviews**, **226 (1)**: 57-79.

JOHNSON, J. R.; WILEY, R. E.; FATTOUH, R.; SWIRSKI, F. K.; GAJEWSKA, B. U.; COYLE, A. J.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C.; ELLIS, R.; INMAN, M. D.; JORDANA, M. 2004. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, **169 (3)**: 378-385.

JUNGSUWADEE, P.; DEKAN, G.; STINGL, G.; EPSTEIN, M. M. 2004. Inhaled dexamethasone differentially attenuates disease relapse and established allergic asthma in mice. **Clinical Immunology** **110 (1)**: 13- 21.

KIM, D.; KIM, S. H.; PARK, E.-J.; KANG, C.-Y.; CHO, S.-H.; KIM, S. 2008. Anti-allergic effects of PG102, a water-soluble extract prepared from *Actinidia arguta*, in a murine ovalbumin-induced asthma model. **Clinical and Experimental Allergy**, **39 (2)**: 280-289.

LEE, C.; CHANG, J.; MOON, D.; CHOI, Y. H.; CHOI, IL-W.; PARK, Y.; KIM, G. 2008. Lycopene suppresses ovalbumin-induced airway inflammation in a murine model of asthma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **374 (2)**: 248-252.

LEE, M.; KIM, S.; KWON, O.; OH, S.; LEE, H.; AHN, K. 2009. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma. **International Immunopharmacology**, **9 (4)**: 418–424.

LEHTONEN, S. 2008. An integrative approach to species delimitation in *Echinodorus* (Alismataceae) and the description of two new species. **Kew Bulletin**, **63**: 525-563.

LEITE, J. P. V.; PIMENTA, D. S.; GOMES, R. S. D. L.; DANTAS-BARROS, A. M. 2007. Contribuição ao estudo farmacobotânico da *Echinodorus macrophyllus* (Kunth)

Micheli (chapéu-de-couro) - Alismataceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **17 (2)**: 242-248.

LESSA, M. A.; ARAÚJO, C. V.; KAPLAN, M. A.; PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; TIBIRIÇÁ, E. 2008. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, **22 (2)**: 161-168.

LIMA, E. C. 2006. **Análise química e genotóxica de *Echinodorus grandiflorus*: suporte biotecnológico para preparação farmacêutica de extratos vegetais seguros para uso medicinal**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 103p.

LLOYD, C. M.; RANKIN, S. M. 2003. Chemokines in allergic airway disease. **Current Opinion in Pharmacology**, **3 (4)**: 443-448.

LOPES, L. C.; ALBANO, F.; LARANJA, G. A. T.; ALVES, L. M.; SILVA, L. F. M.; SOUZA, G. P.; ARAÚJO, I. M.; NOGUEIRA-NETO, J. F.; FELZENSZWALB, I.; KOVARY, K. 2000. Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. **Toxicology Letters**, **116 (3)**: 189-198.

MACEDO, A. F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C.F. 2007. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, **28 (1)**: 123-128.

MANS, D.; HARTMANN, R. 1993. Echinodol: a new cembrene derivate from *Echinodorus grandiflorus*. **Planta Medica**, **59**: 465-466.

MATOS, F. J. A. 1997. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza. Edições UFC, 2ª edição.

MEDEIROS, K. C. P.; FAUSTINO, L.; BORDUCHI, E.; NASCIMENTO, R. J. B.; SILVA, T. M. S.; GOMES, E.; PIUVEZAM, M. R.; RUSSO, M. 2009. Preventive and

curative glycoside kaempferol treatments attenuate the TH2-driven allergic airway disease. **International Immunopharmacology**, **9 (13-14)**: 1540-1548.

MIN, H. J.; WON, H. Y.; KIM, Y. C.; SUNG, S. H.; BYUN, M. R.; HWANG, J-H.; HONG, J-H.; HWANG, E. S. 2009. Suppression of Th2-driven, allergen-induced airway inflammation by sauchinone. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **385 (2)**: 204-209.

NEVES, J. S.; WELLER, P. F. 2009. Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology. **Current Opinion in Immunology**, **21 (6)**: 694-699.

O'SHEA, J. J.; MA, A.; LIPSKY, P. 2002. Cytokines and autoimmunity. **Nature Reviews Immunology**, **2 (1)**: 37-45.

PACÍFICO, L. G. G.; MARINHO, F. A. V.; FONSECA, C. T.; BARSANTE, M. M.; PINHO, V.; SALES-JÚNIOR, P. A.; CARDOSO, L. S.; ARAÚJO, M. I.; CARVALHO, E. M.; CASSALI, G. D.; TEIXEIRA, M. M.; OLIVEIRA, S. C. 2009. *Schistosoma mansoni* Antigens Modulate Experimental Allergic Asthma in a Murine Model: a Major Role for CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T Cells Independent of Interleukin-10. **Infection and Immunity**, **77 (1)**: 98-107.

PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAM, M. A. C. 2006. Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl) Micheli (Chapéu de couro). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **78 (4)**: 623-628.

PIMENTA, D.S. 2002. **Contribuição ao cultivo, ecologia e validação do uso de *Echinodorus grandiflorus* (Chamisso & Schlechtendal) Micheli (Chapéu-de-couro)**. Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. 170p.

PINTO, A. C.; REGO, G. C. G.; SIQUEIRA, A. M.; CARDOSO, C. C.; REIS, P. A.; MARQUES, E. A.; COELHO, M. G. P.; SABINO, K. C. C. 2007. Immunosuppressive effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology** **111 (2)**: 435-439.

POLACCHINE, B. S. 2005. **Avaliação do efeito anti-hipertensivo de *Echinodorus grandiflorus* em hipertensão experimental renovascular 1rim-1clipe e 2rins-1clipe**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Estadual de Londrina, Brasil. 58p.

PONTE, E. V.; RIZZO J. A.; CRUZ, A. A. 2007. Inter-relação entre asma, atopia e infecções helmínticas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, **33(3)**: 335-342.

RENAULD, J-C. 2001. New insights into the role of cytokines in asthma. **Journal of Clinical Pathology**, **54 (8)**: 577-589.

RIBEIRO, R. A.; MELO, M. M. R. F.; BARROS, F.; GOMES, C.; TROLIN, G. 1986. Acute antihypertensive effects in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo. **Journal of Ethnopharmacology**, **15 (3)**: 261-269.

ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L. 2007. O uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus globulus* Labill – Myrtaceae. **Saúde & Ambiente em Revista**, **2 (2)**: 23-34.

ROGERIO, A. P.; CARDOSO, C. R.; FONTANARI, C.; SOUZA, M. A.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; SILVA, E. V. G.; KOYAMA, N. S.; BASEI, F. L.; SOARES, E. G.; CALIXTO, J. B.; STOWELL, S. R.; DIAS-BARUFFI, M.; FACCIOLI, L. H. 2007a. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology**, **17 (8)**: 795-804.

ROGERIO, A. P.; FONTANARI, C.; BORDUCCHI, E.; KELLER, A.C.; RUSSO, M.; SOARES, E. G.; ALBUQUERQUE, D. A.; FACCIOLI, L. H. 2008. Anti-inflammatory effects of *Lafoensia pacari* and ellagic acid in a murine model of asthma. **European Journal of Pharmacology**, **580 (1-2)**: 262-270.

ROGERIO, A. P.; KANASHIRO, A.; FONTANARI, C.; da SILVA, E. V. G.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; SOARES, E. G.; FACCIOLI, L. H. 2007b. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. **Inflammation Research** **56 (10)**: 402–408.

ROLLINS, B. J. 1997. Chemokines. **Blood**, **90 (3)**: 909-928.

SANSOM, D. M.; WALKER, L. S. K. 2006. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. **Immunological Reviews**, **212 (1)**: 131-148.

SCHNITZLER, M.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. 2007. *Trans*-Aconitic acid, glucosylflavones and hydroxycinnamoyltartaric acids from the leaves of *Echinodorus grandiflorus* ssp. *aureus*, a Brazilian medicinal plant. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **17 (2)**: 149-154.

SCHNYDER-CANDRIAN, S.; TOGBE, D.; COUILLIN, I.; MERCIER, I.; BROMBACHER, F.; QUESNIAUX, V.; FOSSIEZ, F.; RYFFEL, B.; SCHNYDER, B. 2006. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. **Journal of Experimental Medicine**, **203 (12)**: 2715-2725.

SCHRÖDER, N. W. J.; MAURER, M. 2007. The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. **Allergy**, **62 (6)**: 579-590.

SHI, H.; QIN, X. 2005. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes in allergy and asthma. **Allergy**, **60 (8)**: 986-995.

SOUZA, G. C.; HAAS, A. P. S.; von POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, **90 (1)**: 135-143.

SPARG, S. G.; LIGHT M. E.; van STADEN. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, **94 (2-3)**: 219-243.

TANAKA, C. M. A. 2000. **Constituintes químicos de cinco espécies de *Echinodorus* e avaliação do β-pineno como substrato para obtenção de quírons mais elaborados**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil. 298p.

TANAKA, C. M. A.; SARRAGIOTTO, M. H.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; MARSAIOLI, A. J. 1997. A Cembrane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry**, **44 (8)**: 1547-1549.

TIBIRIÇÁ, E.; ALMEIDA, A.; CAILLEAUX, S.; PIMENTA, D.; KAPLAN, M. A.; LESSA, M. A.; FIGUEIREDO, M. R. 2007. Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. **Journal of Ethnopharmacology**, **111 (1)**: 50-55.

TORRES, R.; PICADO, C.; MORA, F. 2005. Use of the Mouse to Unravel Allergic Asthma: a Review of the Pathogenesis of Allergic Asthma in Mouse Models and Its Similarity to the Condition in Humans. **Archivos de Bronconeumologia**, **41(3)**: 141-52.

VASCONCELOS, J. F.; TEIXEIRA, M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LÚCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. S.; de QUEIROZ, L. P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. P. 2008. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. **International Immunopharmacology**, **8 (9)**: 1216-1221.

VIEIRA, F. V.; LIMA, N. A. S. 1997. Pollination of *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae). **Aquatic Botany**, **58**: 89-98.

VIEIRA, R. P.; CLAUDINO, R. C.; DUARTE, A. C. S.; SANTOS, A. B. G.; PERINI, A.; FARIA-NETO, H. C. C.; MAUAD, T.; MARTINS, M. A.; DOLHNIKOFF, M.; CARVALHO, C. R. F. 2007. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, **176 (9)**: 871-877.

WEGMANN, M. 2008. Animal models of chronic experimental asthma - strategies for the identification of new therapeutic targets. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, **3 (Suppl 1)**: S4.

WONG, C. K.; LUN, S. W. M.; KO, F. W. S.; IP, W. K.; HUI, D. S. C.; LAM, C. W. K. 2005. Increased expression of plasma and cell surface co-stimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD86 in adult patients with allergic asthma. **Clinical and Experimental Immunology**, **141 (1)**: 122-129.

## ANEXO A – DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE E AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO EXTRATO AQUOSO DE *Echinodorus grandiflorus*

A determinação do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a avaliação qualitativa do extrato aquoso de *E. grandiflorus* foram realizadas pelos professores Elita Scio Fontes e Rodrigo Luiz Fabri, no Departamento de Bioquímica da UFJF.

Para determinar o perfil cromatográfico do extrato foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos e injetor automático (Agilent Technologies 1200 Series, EUA). Para separação das substâncias empregou-se coluna de fase reversa (Zorbax SB-18; 4,6 x 150mm; 5 $\mu$ m) e um gradiente linear dos solventes A (água Miliq pH 4,0) e B (acetonitrila pH 4,0) variando de 10 a 70% de B em 60 minutos. A injeção foi de 20 $\mu$ L de amostra, na concentração de 30mg/mL, e o fluxo de corrida foi de 1mL/min mantido à temperatura ambiente. A detecção foi feita nos comprimentos de onda de 225, 230, 254, 335nm e evidenciou a ocorrência dos flavonóides isoorientina, swertisina e isovitexina e dos aril propanóides ácido caféico, ferúlico e iso-ferúlico.

Prosseguindo-se com a caracterização química foram realizados testes para avaliação qualitativa de alcalóides, triterpenos, esteróides, saponinas, cumarinas, compostos fenólicos, taninos, antraquinonas e flavonóides, conforme a metodologia constante em Matos, 1997. Estes testes determinam a presença de compostos por meio de reações com o aparecimento de cor e/ou precipitado. Este segundo procedimento foi realizado porque alguns constituintes não foram identificados por CLAE, pois não havia padrões, o equipamento não possuía o software de dados de padrões de produtos naturais e nem orientações quanto ao uso de padrões internos. A avaliação qualitativa do extrato revelou a presença de saponinas, triterpenos e taninos e confirmou a ocorrência de compostos fenólicos como flavonóides e ácidos fenólicos. Outras substâncias como alcalóides, esteróides, antraquinonas e cumarinas não foram detectadas.

## ANEXO B – QUANTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DO RNA, FUNCIONAMENTO DOS *PRIMERS* E TEMPERATURA DE ANELAMENTO

O RNA total extraído de amostras de tecido pulmonar para o estudo apresentou concentração média de 195ng/ $\mu$ L e a relação 260/280 variou entre 2,06 e 2,26. O RNA total após extração manteve-se íntegro uma vez que foi possível observar as bandas referentes ao RNA 18S e 28S e o valor de RIN (RNA integrity number) variou de 6,60 a 9,20. Para a realização de PCR real time, espera-se um valor de RIN acima de 5,0. Um exemplo de gráfico obtido através do 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA) está na representado na Figura A1.

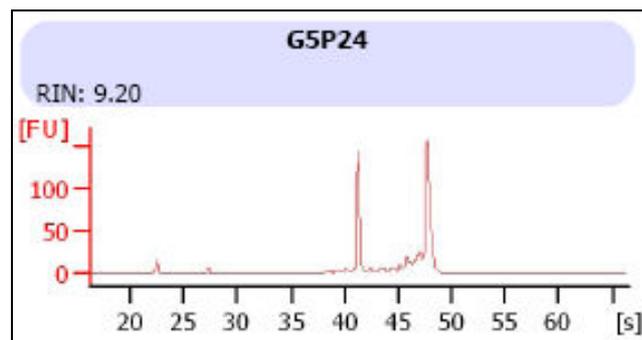


Figura A1. Gráfico obtido no 2100 Bioanalyzer demonstrando a integridade do RNA (RIN = 9,20).

Antes da quantificação em tempo real, foi realizado PCR convencional seguido por gel de poliacrilamida 8% para verificar o funcionamento dos *primers* e a temperatura de anelamento. Os *primers* utilizados neste estudo foram sintetizados pela Prodimol (Brasil) e são mostrados na Tabela A1.

Tabela A1. Nome e sequência dos oligonucleotídeos usados como *primers* e tamanho do produto final amplificado (*amplicon*).

Nome	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do <i>amplicon</i>
IL-4 Forward	5' - TCG AAT GTA CCA GGA GCC ATA TCC - 3'	149pb
IL-4 Reverse	5' - CTC TGT GGT GTT CTT CGT TGC TGT - 3'	
IL-13 Forward	5' - CAC ACA AGA CCA GAC TCC CCT GT - 3'	155pb
IL-13 Reverse	5' - GGT TAC AGA GGC CAT GCA ATA TCC - 3'	
Foxp3 Forward	5' - CCC ACC TAC AGG CCC TTC TC - 3'	71pb
Foxp3 Reverse	5' - GGC ATG GGC ATC CAC AGT - 3'	
HPRT Forward	5' - CAA AGC CTA AGA TGA GCG CAA - 3'	100pb
HPRT Reverse	5' - AGG CAG ATG GCC ACA GGA C - 3'	
$\beta$ -actina Forward	5' - CGT TGA CAT CCG TAA AGA CCT C - 3'	173pb
$\beta$ -actina Reverse	5' - AGC CAC CGA TCC ACA CAG A - 3'	

As condições de amplificação para todos os sistemas foram: 95°C durante 5 minutos, para desnaturação inicial, 40 ciclos (desnaturação a 95°C durante 1 minuto, pareamento dos *primers* a 60°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto) e 7 minutos a 72°C para extensão final. Foram realizadas diluições seriadas de cDNA (20, 40 e 80ng) e duas diluições de *primer* (150 e 300nM) para todos os genes, para o cálculo da eficiência da PCR, já que na quantificação relativa é necessário que as eficiências de amplificação do alvo e do controle endógeno sejam aproximadamente iguais. Cada amostra foi feita em duplicata em placas ópticas de reação de 96 poços (Applied Biosystems, EUA), seladas com filme adesivo óptico (Optical Adhesive Covers, Applied Biosystems, EUA) e amplificadas no ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, EUA). A eficiência da PCR foi calculada para cada gene no programa Relative Expression Software Tool (REST, 2008). Em seguida, foi realizado gel de poliacrilamida 8% para analisar a especificidade da reação.

A quantidade de cDNA otimizada para amplificação, a concentração ideal de *primer* e temperatura de dissociação (TD) para cada gene estão descritas na Tabela A2.

Tabela A2. Quantidade de cDNA, concentração de *primer* e temperatura de dissociação (TD) de cada gene analisado.

<b>Gene</b>	<b>cDNA</b>	<b>Primer (nM)</b>	<b>TD (°C)</b>
IL-4	20	150	81,2
IL-13	40	300	83,3
Foxp3	20	300	80,2
HPRT	80	300	78,7
$\beta$ -actina	20	300	82,2

A eficiência da PCR de cada gene é mostrada na Tabela A3. Entre os genes HPRT e  $\beta$ -actina, o gene escolhido como controle endógeno foi o gene HPRT, pois este apresentou eficiência mais próxima das eficiências dos genes de interesse.

Tabela A3. Eficiência das reações de PCR.

<b>Gene</b>	<b>Eficiência</b>
IL-4	0,698
IL-13	0,709
Foxp3	0,718
HPRT	0,647
$\beta$ -actina	1,657

As análises das curvas de dissociação dos genes alvo e do controle endógeno mostraram não haver picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos. A ausência destes constitui-se condição para estudos de expressão quando se utiliza o corante SYBR Green, pois este se liga a qualquer dupla fita de DNA podendo ocasionar valores superestimados de expressão. Exemplos destas curvas de dissociação podem ser vistos nas Figuras A2 e A3.

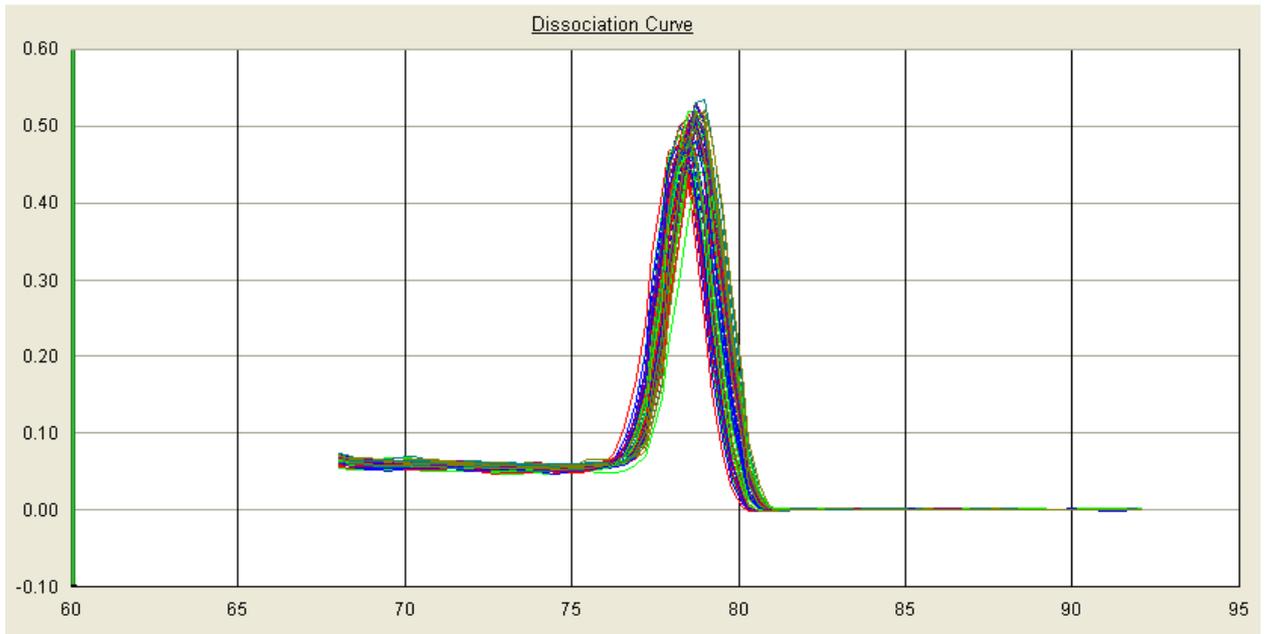


Figura A2. Curva de dissociação do gene HPRT.

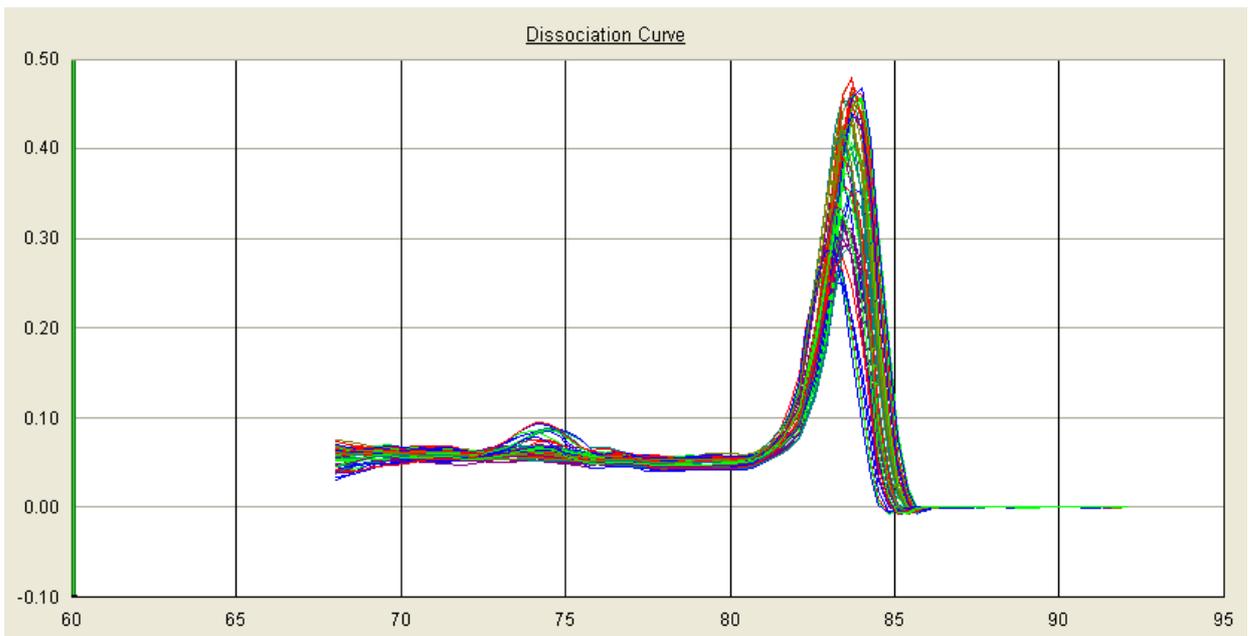


Figura A3. Curva de dissociação do gene IL-13.