

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM IMUNOLOGIA

Alessa Sin Singer Brugiolo

EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Echinodorus grandiflorus*, DE SUAS FRAÇÕES METANÓLICA E RESIDUAL E DO ÁCIDO FERÚLICO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NO MODELO DE ALERGIA PULMONAR INDUZIDA POR OVA

Juiz de Fora

2016

ALESSA SIN SINGER BRUGIOLO

EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Echinodorus grandiflorus*, DE SUAS FRAÇÕES METANÓLICA E RESIDUAL E DO ÁCIDO FERÚLICO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NO MODELO DE ALERGIA PULMONAR INDUZIDA POR OVA

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ferreira

Juiz de Fora

2016

BRUGIOLO, A. S. S. Efeito do extrato aquoso das folhas de *Echinodorus grandiflorus*, de suas frações metanólica e residual e do ácido ferúlico na modulação da resposta imune no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA, 2016. 115 f. Tese de Doutorado (Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM IMUNOLOGIA

ALESSA SIN SINGER BRUGIOLO

**EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Echinodorus grandiflorus*,
DE SUAS FRAÇÕES METANÓLICA E RESIDUAL E DO ÁCIDO FERÚLICO NA
MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NO MODELO DE ALERGIA PULMONAR
INDUZIDA POR OVA**

Data de aprovação: 11/03/2016

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Ana Paula Ferreira
Universidade Federal de Juiz de Fora

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

Profa. Dra. Luciana Moreira Chedier
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza
Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Fernanda Gambogi Braga Amarante
Colégio Militar de Juiz de Fora

*Para meus pais,
Sônia e José Geraldo.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sônia e José Geraldo, pelo exemplo de dedicação, profissionalismo e honestidade e por me estimularem na busca pelo conhecimento.

Aos meus irmãos, Inessa e Alexandre, cunhado, Eduardo, padrinhos, Sílvia e João, e primos, Andressa e Felipe, pelo incentivo constante e por dividirem comigo a minha história.

À Fanny, Nalla e Maria Clara pelo amor incondicional.

Aos meus amigos, por tornarem essa caminhada mais divertida, pelo apoio e alegria com minhas vitórias.

À Profa. Dra. Ana Paula Ferreira, por quem tenho grande admiração, pela orientação, pela confiança, pelo carinho, pelas oportunidades e por todos os ensinamentos, que vão além da Imunologia.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia do ICB-UFJF, por contribuírem com o desenvolvimento deste trabalho, especialmente à Profa. Dra. Jacy Gameiro, pelo apoio técnico e científico e pela disponibilidade em ajudar.

Ao Prof. Dr. Daniel Sales Pimenta e à Profa. Dra. Luciana Moreira Chedier, do Departamento de Botânica do ICB-UFJF, pela elaboração do extrato e das frações e pelas valiosas informações sobre a planta.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia, pelo companheirismo e pelas conversas, especialmente à Sandra Bertelli Ribeiro de Castro, pelo convívio e por me acolher sempre com carinho.

À “equipe da asma” Ana Cláudia Carvalho Gouveia, Caio César de Souza Alves, Flávia Márcia de Castro e Silva e Érick Esteves de Oliveira e aos alunos de iniciação científica Leandra Coimbra de Almeida, Wesley Gonçalves de Moraes e Marina Ayupe Caçador, pela imensa ajuda nos experimentos realizados, pela responsabilidade, pelo profissionalismo e por tornarem os momentos difíceis mais divertidos.

Aos colegas do Departamento de Fisioterapia da UFJF - Campus Avançado de Governador Valadares, pela compreensão e pelo apoio para a finalização deste Doutorado.

À Universidade Federal de Juiz de Fora 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.

À Plataforma de Metodologia Analítica de Farmanguinhos FIOCRUZ/RJ pelos cromatogramas CLAE/UV.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A asma é uma doença heterogênea, caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, definida pela história de sintomas respiratórios e associada a limitação variável do fluxo expiratório. Considerada um grave problema de saúde, estima-se que afete mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo. A resposta imunológica na asma envolve predominantemente linfócitos Th2, com elevados níveis de IgE total e alérgeno-específica e eosinofilia brônquica. O tratamento 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, sendo crucial o desenvolvimento de novos tratamentos. *Echinodorus grandiflorus* é uma espécie vegetal conhecida como chapéu-de-couro muito utilizada por suas propriedades anti-inflamatórias. Em estudo anterior, o tratamento com o extrato aquoso dessa espécie reduziu a resposta imune patogênica Th2 no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA. O ácido ferúlico é um ácido fenólico amplamente presente no reino vegetal e encontrado em *E. grandiflorus* que apresenta atividades antioxidante e anti-inflamatória. Neste trabalho, foram investigados os efeitos do extrato aquoso de *E. grandiflorus*, de suas frações metanólica e residual e do ácido ferúlico na modulação da resposta imune no modelo de alergia pulmonar. O extrato, as frações e o ácido ferúlico foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência. Para indução da alergia pulmonar camundongos fêmeas BALB/c foram sensibilizados intraperitonealmente com OVA e alumen nos dias 0 e 14. Nos dias 21, 23, 25, 27 e 29, os animais foram desafiados com OVA 1% por 20 minutos. Os tratamentos foram administrados por gavagem, entre os dias 21 e 29 do protocolo. Foram coletados soro, lavado bronco-alveolar e pulmões. Inicialmente, a análise cromatográfica revelou dois ácidos fenólicos como componentes majoritários do extrato e das frações, possivelmente relacionados às suas atividades farmacológicas, entretanto, o ácido ferúlico não foi identificado no extrato e nas frações. Todos os tratamentos foram promissores na modulação da resposta patogênica Th2, com os melhores resultados obtidos com o extrato aquoso 25 mg/kg, fração metanólica 25 mg/kg, fração residual 100 mg/kg e ácido ferúlico 25 mg/kg. Foram observadas reduções do infiltrado inflamatório pulmonar, do número de células caliciformes produtoras de muco, do número total de células e de eosinófilos, linfócitos e neutrófilos no lavado bronco-alveolar, dos níveis de TSLP, IL-25, IL-33, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , CCL5, CCL11 e CCL20 no tecido pulmonar e níveis séricos de IgE e IgG1. Juntos, esses resultados indicam que o extrato aquoso de *E. grandiflorus*, suas frações metanólica e residual e o ácido ferúlico, reduzem a inflamação pulmonar alérgica, atuando principalmente na fase inicial da resposta imune, reduzindo a liberação de citocinas e quimiocinas pelas células epiteliais das vias aéreas.

Palavras-chave: Asma. Alergia pulmonar. *Echinodorus grandiflorus*. Ácido ferúlico. Células epiteliais das vias aéreas. Linfócitos Th2.

ABSTRACT

Asthma is a heterogeneous disease characterized by chronic airway inflammation, defined by history of respiratory symptoms and associated with variable expiratory flow limitation. Regarded as a serious health problem affecting an estimated over 300 million people worldwide. 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, and it is crucial the developing new treatments. *Echinodorus grandiflorus* is a plant species known as “chapéu-de-couro” widely used for their anti-inflammatory properties. In previous work, the treatment with the aqueous extract of this specie reduced the pathogenic Th2 response in the OVA-induced pulmonary allergy. The ferulic acid is a phenolic acid widely present in the plant kingdom and found in *E. grandiflorus* which has antioxidant and anti-inflammatory activities. In this study, the effect of aqueous extract of *E. grandiflorus*, its methanol and residual fractions, and ferulic acid in modulating the immune response of pulmonary allergy model was investigated. The aqueous extract, fractions and ferulic acid were analyzed by high-performance liquid chromatography. For induction of pulmonary allergy female BALB/c mice were intraperitoneally sensitized with OVA and alum on days 0 and 14. On days 21, 23, 25, 27 and 29, animals were challenged with OVA 1% for 20 minutes. Treatments were administered by gavage, between days 21 and 29 of protocol. The serum, bronchoalveolar lavage fluid and lungs were collected. Chromatographic analysis revealed two phenolic acids as major components of extract and fractions that possibly are related to their pharmacological activities, however ferulic acid was not identified in the extract and fractions. The treatments were promising in the modulation of pathogenic Th2 response, with the best results obtained with the aqueous extract 25 mg/kg, methanolic fraction 25 mg/kg, residual fraction 100 mg/kg and ferulic acid 25 mg/kg. The treatments reduced the inflammatory infiltration in lung tissue, the number of goblet cells in lung tissue, the number of total cells, eosinophils, lymphocytes and neutrophils in bronchoalveolar lavage, the levels of TSLP, IL-25, IL-33, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , CCL5, CCL11, and CCL20 in lung tissue, and the serum levels of IgE and IgG1. Taken together, these results indicate that the aqueous extract of *E. grandiflorus*, methanolic and residual fractions, and ferulic acid reduced the allergic pulmonary inflammation, act primarily in the early phase of the immune response, reducing the release of cytokines and chemokines by airways epithelial cells.

Keywords: Asthma. Pulmonary allergy. *Echinodorus grandiflorus*. Ferulic acid. Epithelial cells of the airways. Th2 lymphocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Prevalência mundial de asma	22
Figura 2.	Resposta imune na asma	28
Figura 3.	<i>Echinodorus grandiflorus</i> : aspecto das folhas e da inflorescência com flores em antese	40
Figura 4.	Estrutura química do ácido ferúlico	44
Figura 5.	Principal via metabólica de formação do ácido ferúlico em vegetais	45
Figura 6.	Delineamento experimental	55
Figura 7.	Análises por CLAE a 335 nm do (A) extrato aquoso de <i>E. grandiflorus</i> (EAEg), (B) fração metanólica (FM), (C) fração residual (FR) e (D) ácido ferúlico (AF)	63
Figura 8.	Escore do grau de inflamação pulmonar após tratamento com o extrato e frações	65
Figura 9.	Perfil inflamatório no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com o extrato e frações, coloração com HE, aumento original 200X	66
Figura 10.	Perfil inflamatório no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com o extrato e frações, coloração com HE, aumento original 400X	67
Figura 11.	Número de células calciformes/100 μm^2 após tratamento com o extrato e frações	68
Figura 12.	Produção de muco no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com o extrato e frações, coloração com PAS, aumento original 200X	69
Figura 13.	Produção de muco no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com o extrato e frações, coloração com PAS, aumento original 400X	70
Figura 14.	Perfil celular no LBA após tratamento com o extrato e frações. (A) Número total de células, (B) eosinófilos, (C) linfócitos, (D)	

	neutrófilos e (E) macrófagos no LBA (x10 ⁴ /mL)	72
Figura 15.	Atividade da EPO no homogenato de tecido pulmonar após tratamento com o extrato e frações (DO 490 nm)	73
Figura 16.	Níveis de quimiocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar após tratamento com o extrato e frações. (A) Níveis de CCL20, (B) CCL11 e (C) CCL5 no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar (pg/mL)	74
Figura 17.	Níveis de citocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar após tratamento com o extrato e frações. (A) Níveis de TSLP (pg/mL), (B) IL-25 (pg/mL), (C) IL-33 (pg/mL), (D) IL-4 (pg/mL), (E) IL-5 (pg/mL), (F) IL-13 (pg/mL), (G) IFN- γ (pg/mL), (H) TGF- β (ng/mL) e (I) IL-10 (pg/mL) no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar	76
Figura 18.	Níveis séricos de (A) IgE (1:20), (B) IgG1 (1:3000) e (C) IgG2a (1:100) específicas anti-OVA após tratamento com o extrato e frações	77
Figura 19.	Escore do grau de inflamação pulmonar após tratamento com ácido ferúlico	78
Figura 20.	Perfil inflamatório no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com ácido ferúlico, coloração com HE, aumento original 200X	79
Figura 21.	Perfil inflamatório no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com ácido ferúlico, coloração com HE, aumento original 400X	80
Figura 22.	Número de células caliciformes/100 μm^2 após tratamento com ácido ferúlico	81
Figura 23.	Produção de muco no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com ácido ferúlico, coloração com PAS, aumento original 200X	82
Figura 24.	Produção de muco no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com ácido ferúlico, coloração com PAS, aumento original 400X	83
Figura 25.	Perfil celular no LBA após tratamento com ácido ferúlico. (A)	

	Número total de células, (B) eosinófilos, (C) linfócitos, (D) neutrófilos e (E) macrófagos no LBA ($\times 10^4/\text{mL}$)	85
Figura 26.	Atividade da EPO no homogenato de tecido pulmonar após tratamento com ácido ferúlico (DO 490 nm)	86
Figura 27.	Níveis de quimiocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar após tratamento com ácido ferúlico. (A) Níveis de CCL20, (B) CCL11 e (C) CCL5 no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar (pg/mL)	87
Figura 28.	Níveis de citocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar após tratamento com ácido ferúlico. (A) Níveis de TSLP (pg/mL), (B) IL-25 (pg/mL), (C) IL-33 (pg/mL), (D) IL-4 (pg/mL), (E) IL-5 (pg/mL), (F) IL-13 (pg/mL), (G) IFN- γ (pg/mL), (H) TGF- β (ng/mL) e (I) IL-10 (pg/mL) no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar	88
Figura 29.	Níveis séricos de (A) IgE (1:20), (B) IgG1 (1:3000) e (C) IgG2a (1:100) específicas anti-OVA após tratamento com ácido ferúlico.	89
Figura 30.	(A) Escore do grau de inflamação pulmonar e (B) número de células caliciformes/ $100 \mu\text{m}^2$ após tratamento com fração metanólica e ácido ferúlico	90
Figura 31.	Perfil celular no LBA após tratamento com fração metanólica e ácido ferúlico. (A) Número total de células, (B) eosinófilos, (C) linfócitos, (D) neutrófilos e (E) macrófagos no LBA ($\times 10^4/\text{mL}$)	91
Figura 32.	Provável mecanismo de imunossupressão dos tratamentos avaliados	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Fenótipos da asma em relação às características	26
Tabela 2.	Constituintes químicos isolados de <i>Echinodorus grandiflorus</i> ...	41
Tabela 3.	Grupos experimentais	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácido Ferúlico
AIDS	“Acquired Immunodeficiency Syndrome”, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AP	Alergia Pulmonar
CCL	“Chemokine (C-C motif) Ligand”, ligante de quimiocina CC
CCR	“Chemokine (C-C motif) Receptor”, receptor de quimiocina CC
CD	“Cluster of differentiation”, grupo de diferenciação
CE	Célula epitelial
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN	Controle Negativo
CXCL	“Chemokine (C-X-C motif) Ligand”, ligante de quimiocina CXC
DCs	“Dendritic cells”, células dendríticas
Dexa	Dexametasona
DL50	Dose letal 50%
DNA	“Deoxyribonucleic Acid”, Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
DPPH	“2,2-diphenyl 1-picrylhydrazyl”, 2,2-difenil 1-picrilhidrazila
EAEg	Extrato aquoso das folhas 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 Immunosorbent Assay”; ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
EPO	“Eosinophil peroxidase”, peroxidase eosinofílica
FcεRI	Receptor de alta afinidade para a porção Fc de IgE
FcγRIII	Receptor de baixa afinidade para a porção Fc de IgG
FM	Fração metanólica do extrato aquoso de <i>Echinodorus grandiflorus</i>
Foxp3	“Forkhead Box P3”

FR	Fração residual insolúvel em metanol do extrato aquoso de <i>Echinodorus grandiflorus</i>
GATA-3	“GATA binding protein 3”, proteína ligante GATA 3
GM-CSF	“Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator”, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HE	Hematoxilina e Eosina
HTAB	Hexadeciltrimetil brometo de amônio
i.p.	Intraperitoneal
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ILC2	Células linfóides inatas 2
iNOS	“Inducible nitric oxide synthase”, óxido nítrico sintase indutível
LBA	Lavado bronco-alveolar
MBP	“Major basic protein”, proteína básica principal
mDC	Célula dendrítica mielóide
MHCII	“Major Histocompatibility Complex II”, Complexo de Histocompatibilidade Principal II
MMPs	Metaloproteinases de matriz
mRNA	“Messenger Ribonucleic Acid”, Ácido ribonucleico mensageiro
NO	“Nitric oxide”, óxido nítrico
OPD	“o-phenylenediamine”, o-fenilenodiamina
OVA	Ovalbumina
PAS	“Periodic acid-Schiff”, Ácido Periódico de Schiff
PBS	“Phosphate buffered saline”, solução de tampão fosfato
PBST	PBS-Tween 20
PDE4	Enzima fosfodiesterase 4
PPY-345	4-acetil-3-metil-6-(3,4,5-trimetoxifenil) pirano[3,4-c]pyran-1,8-diono
PRRs	“Pattern recognition receptor”, Receptores de reconhecimento de padrão
RNS	“Reactive nitrogen species”, espécies reativas de nitrogênio
ROR γ t	“Transcription factor retinoic acid-related orphan receptor-gamma t”, fator de transcrição relacionado ao receptor órfão do ácido retinóico gama t

ROS	“Reactive oxygen species”, espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
STAT 6	“Signal Transducer and Activator of Transcription 6”, sinal transdutor e ativador de transcrição 6
TCR	“T cell receptor”, receptor de células T
TGF- β	“Transforming growth factor beta”, fator de crescimento transformador beta
Th	Linfócito T “helper”
TN	Linfócito T naive
TNF- α	“Tumor necrosis factor alfa”, fator de necrose tumoral alfa
Tregs	Linfócitos T reguladores
TSLP	“Thymic stromal lymphopoietin”, linfopoetina estromal tímica
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UV	Ultravioleta
VEF ₁	Volume expiratório forçado no primeiro segundo

SUMÁRIO

1 JUSTIFICATIVA	19
2 INTRODUÇÃO	21
2.1 Asma	21
2.1.1 Considerações gerais	21
2.1.2 Resposta imune na asma alérgica	27
2.1.3 Tratamento para a asma	33
2.1.4 Modelo murino de alergia pulmonar	36
2.2 <i>Echinodorus grandiflorus</i> (Chamisso & Schlechtendal) Micheli	39
2.3 Ácido ferúlico	44
3 OBJETIVOS	51
3.1 Objetivo geral	51
3.2 Objetivos específicos	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Material vegetal, preparação e fracionamento do extrato e aquisição do ácido ferúlico	52
4.2 Perfil químico do extrato aquoso de <i>E. grandiflorus</i>, das frações metanólica e residual e do ácido ferúlico	53
4.3 Animais	54
4.4 Delineamento experimental	54
4.5 Obtenção de material biológico e análises realizadas	56
4.5.1 Contagem total e específica de leucócitos no lavado bronco-alveolar	57
4.5.2 Análise histopatológica	57
4.5.3 Determinação da atividade da EPO no tecido pulmonar	58
4.5.4 Dosagem de quimiocinas e citocinas no sobrenadante de homogenato de tecido pulmonar	59
4.5.5 Dosagem sérica de anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a anti-OVA	60
4.6 Análise estatística	61
5 RESULTADOS	62
5.1 Perfil cromatográfico por CLAE do extrato aquoso de <i>E. grandiflorus</i>, de suas frações metanólica e residual e do ácido ferúlico	62

5.2 Efeito da administração oral do EAEG e das FM e FR sobre a alergia pulmonar induzida por OVA	64
5.2.1 Efeito da administração oral do EAEG e das FM e FR sobre a inflamação pulmonar e a produção de muco	64
5.2.2 Efeito da administração oral do EAEG e das FM e FR sobre a inflamação das vias aéreas	71
5.2.3 Efeito da administração oral do EAEG e das FM e FR sobre a atividade da EPO no homogenato de tecido pulmonar	73
5.2.4 Efeito da administração oral do EAEG e das FM e FR sobre os níveis de quimiocinas no homogenato de tecido pulmonar	74
5.2.5 Efeito da administração oral do EAEG e das FM e FR sobre os níveis de citocinas no homogenato de tecido pulmonar	75
5.2.6 Efeito da administração oral do EAEG e das FM e FR sobre os níveis séricos de anticorpos específicos anti-OVA	77
5.3 Efeito da administração oral do ácido ferúlico sobre a alergia pulmonar induzida por OVA	78
5.3.1 Efeito da administração oral do ácido ferúlico sobre a inflamação pulmonar e a produção de muco	78
5.3.2 Efeito da administração oral do ácido ferúlico sobre a inflamação das vias aéreas	84
5.3.3 Efeito da administração oral do ácido ferúlico sobre a atividade da EPO no homogenato de tecido pulmonar	86
5.3.4 Efeito da administração oral do ácido ferúlico sobre os níveis de quimiocinas no homogenato de tecido pulmonar	87
5.3.5 Efeito da administração oral do ácido ferúlico sobre os níveis de citocinas no homogenato de tecido pulmonar	87
5.3.6 Efeito da administração oral do ácido ferúlico sobre os níveis séricos de anticorpos específicos anti-OVA	89
5.4 Comparação entre os efeitos da administração oral da fração metanólica do extrato aquoso de <i>E. grandiflorus</i> e do ácido ferúlico sobre a alergia pulmonar induzida por OVA	90
6 DISCUSSÃO	92
7 CONCLUSÕES	102

REFERÊNCIAS	103
ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	114
ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO NA INTERNATIONAL ARCHIVES OF ASTHMA AND IMMUNOLOGY	115

1 JUSTIFICATIVA

A asma é uma doença heterogênea, caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas inferiores e definida pela história de sintomas respiratórios, associada a limitação variável do fluxo expiratório, reversível espontaneamente ou com tratamento. Considerada um grave problema de saúde, estima-se que a asma afete em todo o mundo mais de 300 milhões de pessoas, sendo que sua prevalência está aumentando em muitos países. Os principais objetivos do tratamento da doença são o controle dos sintomas e a prevenção das exacerbações, sendo a combinação de anti-inflamatórios e broncodilatadores a terapia mais eficaz disponível atualmente, embora sejam observados efeitos colaterais quando essas drogas são utilizadas em altas doses e por tempo prolongado. Nesse sentido, a busca de agentes terapêuticos eficazes, de fácil acesso, menor custo e efeitos adversos reduzidos para o tratamento da asma tem sido constante, destacando-se a pesquisa de fármacos derivados de plantas, o uso da própria planta ou de suas partes, dietas suplementares e alimentos funcionais.

Quanto à *Echinodorus grandiflorus*, pertence à família Alismataceae e é uma planta herbácea, perene, semi-aquática e com folhas emergentes, conhecida popularmente como chapéu-de-couro e muito utilizada pela população para tratamento de diversas enfermidades. Trabalhos utilizando diferentes extratos de folhas ou rizomas dessa planta evidenciaram eficácia em vários modelos *in vitro* e *in vivo*, principalmente por sua atividade anti-inflamatória. No modelo de alergia pulmonar induzido por ovalbumina (OVA), foi demonstrado que o extrato aquoso das folhas, administrado por via oral na dose de 23 mg/kg de peso corporal por 9 dias consecutivos, reduziu a resposta imune patogênica T *helper* 2 (Th2).

Já o ácido ferúlico é um ácido fenólico amplamente presente no reino vegetal, sendo abundante em alimentos e em ervas medicinais, incluindo *E. grandiflorus*. Diferentes trabalhos demonstraram uma grande variedade de efeitos terapêuticos em modelos *in vitro* e *in vivo* enfatizando as atividades antioxidante e anti-inflamatória do ácido ferúlico, inclusive com efeitos supressores sobre as reações alérgicas.

Considerando-se o grande potencial antioxidante e anti-inflamatório atribuído tanto à *E. grandiflorus* quanto ao ácido ferúlico nele presente, pretendeu-se neste trabalho verificar os efeitos e os prováveis mecanismos de ação do extrato aquoso das folhas de *E. grandiflorus*, de suas frações metanólica e residual e do ácido ferúlico na modulação da resposta imune em um modelo de alergia pulmonar induzida por OVA.

2 INTRODUÇÃO

2.1 Asma

2.1.1 Considerações gerais

A asma é uma doença heterogênea, caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas inferiores e definida pela história de sintomas respiratórios, tais como sibilância, dispneia, aperto torácico e tosse que varia ao longo do tempo e em intensidade, associada a limitação variável do fluxo expiratório, reversível espontaneamente ou com tratamento (GINA, 2015). A obstrução das vias aéreas ocorre em parte devido à hiper-responsividade brônquica em resposta a diversos estímulos e é agravada pela inflamação crônica, hipersecreção de muco e remodelamento das vias aéreas (revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA PARA O MANEJO DA ASMA, 2012).

Considerada um grave problema de saúde, é uma das doenças crônicas mais comuns em todo o mundo e acomete indivíduos de ambos os sexos e de todas as idades, grupos étnicos, culturas e níveis sócio-econômicos. Estima-se que a asma afete aproximadamente 7 a 10% da população mundial, o que corresponde a aproximadamente 300 milhões de pessoas, acarretando cerca de 250 mil mortes anualmente (Figura 1) (revisado por MASOLI et al., 2004; GINA, 2015). A prevalência da asma está aumentando em muitos países, especialmente entre as crianças, estima-se que até 2025 o número de asmáticos em todo o mundo alcance 400 milhões de indivíduos (revisado por MASOLI et al., 2004; GINA, 2015). Esse fato tem sido associado ao aumento tanto da sensibilização atópica quanto da prevalência de outras doenças alérgicas como eczema e rinite, além da urbanização

das cidades e do maior número de pessoas adotando o estilo de vida ocidental (revisado por MASOLI et al., 2004).

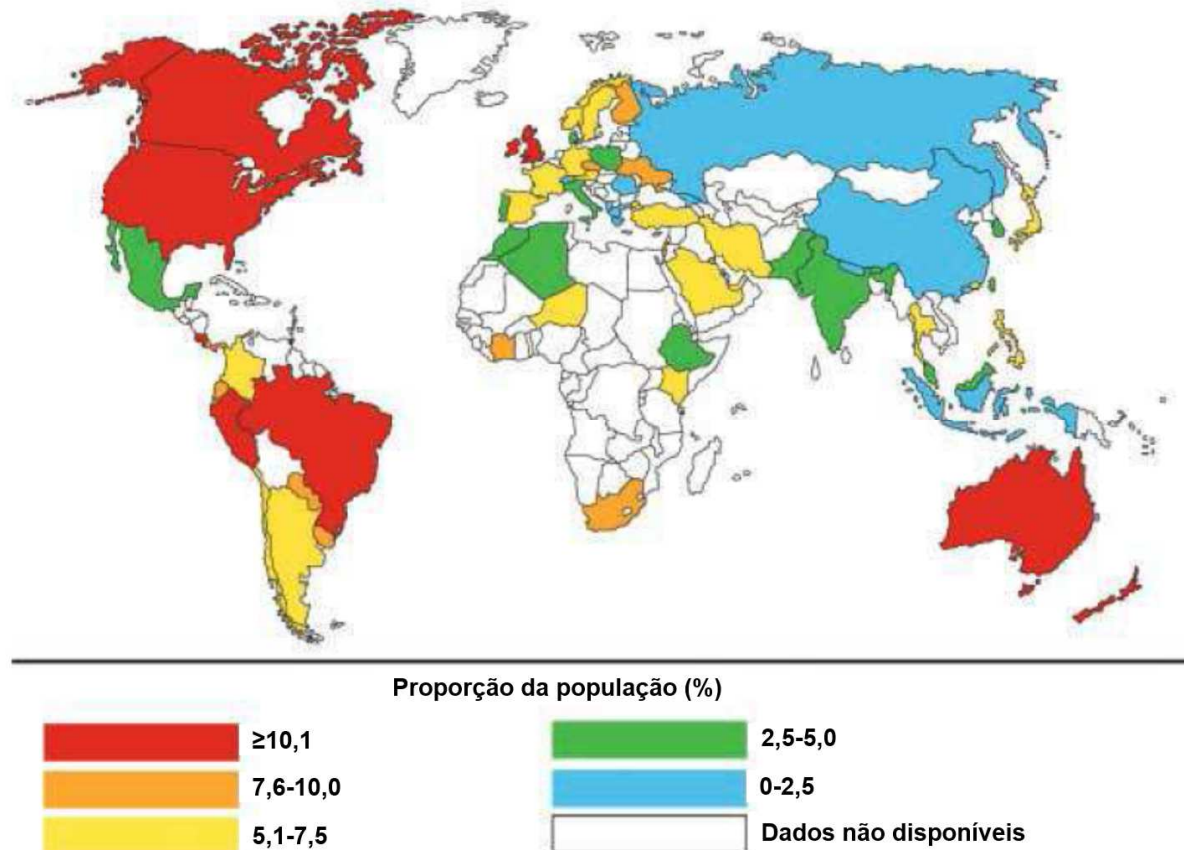


Figura 1. Prevalência mundial de asma (adaptado de MASOLI et al., 2004).

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 outros países em desenvolvimento (revisado por PONTE, RIZZO e CRUZ, 2007). No Brasil, estima-se que existam aproximadamente 20 milhões de asmáticos, considerando uma prevalência global de 10%. Foram registradas em todas as idades 160 mil hospitalizações, sendo a asma a quarta causa de internações no país no ano de 2011. A taxa média de mortalidade por asma no Brasil, entre 1998 e 2007, foi de 1,52 indivíduos por 100.000 habitantes

(DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA PARA O MANEJO DA ASMA, 2012). Apesar disso, como em outros países, também no Brasil, observa-se um declínio nas internações e mortes por asma. No entanto, a doença ainda impõe uma carga inaceitável para os sistemas de saúde e para a sociedade, incluindo tanto custos diretos, como hospitalizações e serviços médicos, quanto custos indiretos, como perda de dias de escola e trabalho, acarretando perda de produtividade, alterações nas relações familiares e restrições das atividades, reduzindo a qualidade de vida (revisado por BUKSTEIN et al., 2006; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA PARA O MANEJO DA ASMA, 2012; GINA, 2015). O custo da asma aumenta proporcionalmente com a gravidade e a falta de controle da doença, sendo este último o maior componente relacionado à utilização dos serviços de saúde (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA PARA O MANEJO DA ASMA, 2012).

Embora a causa precisa para o desenvolvimento da asma permaneça desconhecida, sabe-se que a doença resulta de uma interação entre fatores genéticos e exposição ambiental a estímulos irritantes, tais como endotoxinas bacterianas, alérgenos, mudanças de temperatura, baixa umidade e poluentes ambientais. Adicionalmente, o estilo de vida do indivíduo, que está relacionado à dieta, hábitos sociais e ambiente de trabalho, influencia o desenvolvimento da doença e o aparecimento dos sintomas (revisado por BUKSTEIN et al., 2006; revisado por CORRÊA, MELO e COSTA, 2008; NAGEL et al., 2010; GINA, 2015).

Com relação aos fatores genéticos, evidências sugerem que os diversos fenótipos da doença são secundários à interferência de vários genes que podem ser divididos em quatro grupos principais. O primeiro grupo inclui genes associados com a resposta imune e a diferenciação de linfócitos T *helper* CD4⁺ e que codificam receptores de reconhecimento de padrão (*CD14*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR6*, *TLR10*, *NOD1* e *NOD2*), citocinas imunorregulatórias (*IL10* e *TGFB1*), o fator de transcrição *STAT3*, moléculas envolvidas na apresentação antigênica (alelos *HLA-DR*, *HLA-DQ* e *HLA-DP*) e o receptor de prostaglandina *PTGER2*. O segundo grupo inclui genes associados com a diferenciação de linfócitos Th2 e suas funções efetoras (*GATA3*, *TBX21*, *IL4*, *IL13*, *IL4RA*, *FCER1B*, *IL5*, *IL5RA*, *STAT6* e *IL12B*). O terceiro grupo é expresso pelas células epiteliais e inclui genes de quimiocinas (*CCL5*, *CCL11*, *CCL24* e *CCL26*), peptídeos antimicrobianos (*DEFB1*) e fatores envolvidos na

manutenção da integridade da barreira epitelial celular (*SPINK5* e *FLG*). Finalmente, o quarto grupo inclui genes associados com a função pulmonar, remodelamento das vias aéreas e gravidade da doença como *ADRB2*, *TNF*, *TGFB1*, *LTC4S*, *GSTP1*, *GSTM1*, *TBXA2R*, *ALOX5*, *LTA*, *TNC* e *NOS1* (revisado por VERCELLI, 2008). Dados publicados pelo “*The International Study of Asthma and Allergies in Childhood*” demonstraram haver correlação positiva entre as variantes de alguns genes e presença de sibilância e níveis de imunoglobulina (Ig)E específica para o antígeno, entretanto, os autores ressaltam que nenhum dos genes e suas variantes avaliados foram fortes determinantes dos sintomas de asma na população geral, sendo que estas relações precisam ser melhor compreendidas (GENUNEIT et al., 2009).

Nas últimas décadas ocorreram avanços no entendimento das bases patológicas da asma nos níveis genético e molecular, entretanto, o conhecimento atual sobre as causas da asma não explica completamente a variabilidade da prevalência da doença no mundo. Os fatores genéticos são importantes, mas o acentuado crescimento da prevalência da asma verificado em vários países está provavelmente relacionado a mudanças ambientais (revisado por MASOLI et al., 2004). De acordo com a “Hipótese da Higiene”, originalmente proposta por Strachan (1989), a redução do tamanho das famílias e as melhorias sanitárias, associadas à menor incidência de infecções virais e infestações parasitárias, além da incorporação de novas vacinas, foram acompanhadas por um aumento na incidência de doenças atópicas, sugerindo que determinadas infecções no início da vida são necessárias para o desenvolvimento normal do sistema imune. De acordo com os defensores dessa hipótese, a exposição reduzida a microrganismos acarreta uma maior predisposição para desenvolver doenças alérgicas.

Historicamente, a descrição da dicotomia de respostas de linfócitos Th1 e Th2, reforçou essa teoria, já que as respostas para infecções bacterianas e virais induziriam um forte padrão de citocinas Th1, suprimindo o padrão de resposta Th2 e, conseqüentemente, as doenças alérgicas (revisado por BENDIKS e KOPP, 2013). Os resultados de diversas pesquisas confirmam esta hipótese, entretanto, os mecanismos imunológicos envolvidos neste processo são complexos e ainda não foram totalmente esclarecidos (revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005; revisado por PONTE, RIZZO e CRUZ, 2007). Pode-se citar, por exemplo, o efeito protetor de determinados helmintos sobre o desenvolvimento de doenças alérgicas,

apesar de ambas as patologias desencadearem resposta imune de perfil Th2 (PACIFICO et al., 2009). Sendo assim, a dicotomia Th1/Th2 seria insuficiente para explicar a hipótese da higiene proposta originalmente, simplificando muito o papel de patógenos no desenvolvimento e na modulação das doenças alérgicas. Esse fato, levou ao desenvolvimento da “Hipótese da Higiene Modificada”, na qual o aumento na frequência da asma se explica pela 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).

Em paralelo, tem se desenvolvido a visão de que o sistema imune orchestra as interações entre microrganismos patogênicos, inofensivos e até mesmo benéficos com o hospedeiro. Sendo assim, o conceito inicial da “Hipótese da Higiene” foi modernizado, e, atualmente, acredita-se que o estilo de vida ocidental excessivamente higiênico reduz a exposição do indivíduo a microrganismos e altera a colonização inicial do intestino infantil, perturbando o desenvolvimento normal da tolerância do sistema imune. Portanto, o melhor entendimento da interação entre a microbiota humana e o seu impacto sobre a saúde do hospedeiro poderá contribuir para estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes para as doenças alérgicas (revisado por BENDIKS e KOPP, 2013).

Classicamente, a asma é diferenciada em asma alérgica ou não alérgica, de acordo com os fatores etiológicos envolvidos no seu desenvolvimento. Sendo assim, quando a asma é causada por um alérgeno é referida como alérgica, atópica ou asma extrínseca e é caracterizada por aumento de IgE 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 neutrófilos e mastócitos, sem elevação dos níveis de IgE no soro (revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005; revisado por IWAKURA et al., 2008). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado a heterogeneidade da asma, caracterizada pela existência de diversos fenótipos, com ampla variação individual na história natural da doença, nos sintomas produzidos e na resposta à terapia. Além disso, as medidas fisiológicas objetivas da doença muitas vezes não se correlacionam com os sintomas, resultando em vários desfechos clínicos. Embora a asma alérgica continue sendo o tipo mais prevalente, os diversos fenótipos dificultam o diagnóstico e a avaliação dos pacientes asmáticos

e o seu melhor entendimento poderá favorecer a abordagem terapêutica mais específica e personalizada para o tratamento dessa doença (revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005; BUKNSTEIN et al., 2006; SIMPSON et al., 2010; WENZEL, 2012). Na Tabela 1 são apresentadas as características de cada um dos fenótipos da asma.

Tabela 1. Fenótipos da asma em relação às características.*

	História natural	Características clínicas e fisiológicas	Biomarcadores e patobiologia	Resposta à terapia
Alérgica de início precoce	Início precoce Moderada a grave	Sintomas alérgicos e outras doenças	IgE específica Citocinas Th2 Membrana basal subepitelial espessa	Responsivo à corticoesteroides e medicamentos direcionados a Th2
Eosinofílica de início tardio	Início na vida adulta Frequentemente grave	Sinusite Menos alérgica	IL-5** Eosinofilia refratária a corticoesteróide	Responsivo a anticorpo para IL-5 e modificadores de leucotrienos cisteínicos, refratária a corticoesteróide
Induzida pelo exercício		Moderada Intermitente com exercício	Ativação de mastócitos Citocinas Th2 Leucotrienos cisteínicos	Responsivo a modificadores de leucotrienos cisteínicos, beta-agonistas e anticorpo para IL-9
Relacionada à obesidade	Início na vida adulta	Principalmente mulheres afetadas Muito sintomático Hiper-responsividade das vias aéreas menos clara	Deficiência de biomarcadores Th2 Estresse oxidativo	Responsivo à perda de peso, antioxidantes e possivelmente a terapia hormonal
Neutrófilica		Baixo VEF ₁ *** Maior aprisionamento aéreo	Secreção neutrófilica Resposta Th17 IL-8	Possivelmente responsivo a antibióticos macrolídeos

* Modificado de Wenzel, 2012.

** IL, interleucina

*** VEF₁: Volume expiratório forçado no primeiro segundo.

2.1.2 Resposta imune na asma alérgica

Uma das funções do sistema imune é responder 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). O termo alergia foi criado por Clemens von Pirquet em 1906 para identificar a propensão incomum de alguns indivíduos de desenvolver sinais e sintomas de reatividade quando expostos a certas substâncias (GALLI, TSAI e PILIPONSKY, 2008). Na asma alérgica, ocorre uma resposta imune anormal direcionada contra substâncias ambientais não-infecciosas, os alérgenos, antígenos de natureza protéica, relativamente pequenos e muito solúveis. Essa resposta é chamada de hipersensibilidade imediata e é caracterizada por linfócitos Th2, com elevados níveis de IgE total e alérgeno-específica, eosinofilia brônquica e produção de citocinas de perfil Th2 (revisado por AVERBECK et al., 2007; VIEIRA et al., 2007; GALLI, TSAI e PILIPONSKY, 2008). Um esquema com as principais células e moléculas envolvidas na resposta imune na asma alérgica pode ser observado na Figura 2.

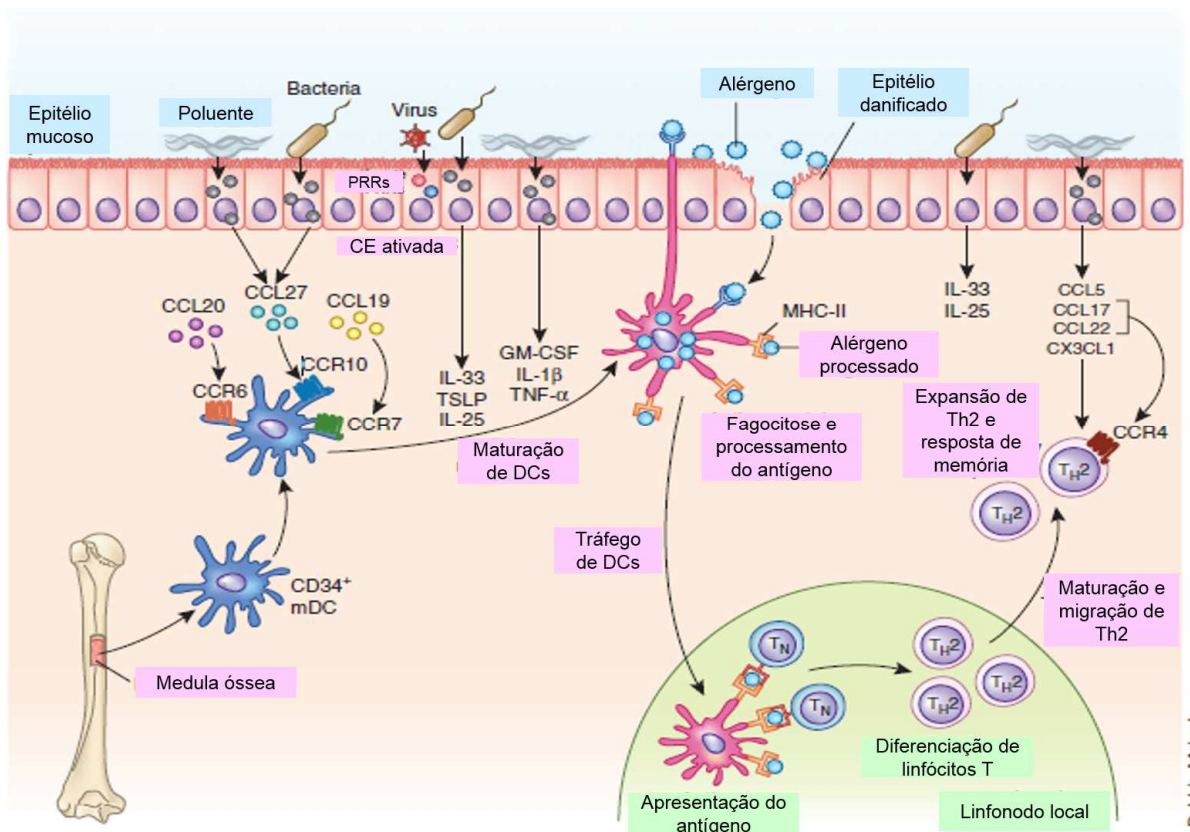


Figura 2. Resposta imune na asma (adaptado de HOLGATE, 2012). CE, célula epitelial. DCs, células dendríticas. mDC, célula dendrítica mielóide. PRRs, receptores de reconhecimento de padrão. TN, linfócito T *naive*.

A sequência típica de eventos é iniciada com a exposição a um alérgeno por via inalatória, com ativação dos PRRs (receptores de reconhecimento de padrão) expressos pelas células epiteliais pulmonares. Em seguida, essas células liberam as citocinas GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos), interleucina (IL)-25, IL-33 e TSLP (linfopoitina do estroma tímico) que ativam as células dendríticas (DCs) a fagocitar os alérgenos presentes no lúmen das vias aéreas ou no tecido submucoso por onde penetram através do epitélio danificado. As DCs migram para os linfonodos onde apresentam peptídeos derivados do alérgeno através das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal II (MHC II) para o receptor de células T (TCR) nos linfócitos T CD4 *naive*, em paralelo à ligação de moléculas co-estimulatórias como CD80 ou CD86 nas células dendríticas com CD28 nos linfócitos T ou OX40L (CD252) nas células dendríticas com OX40 (CD134) nos linfócitos T. Essas interações entre as células dendríticas e os linfócitos T *naive*, na presença de níveis reduzidos de IL-12 e níveis elevados de

IL-4, ativam os fatores de transcrição STAT6 (sinal transdutor e ativador de transcrição 6) e GATA3 (proteína ligante GATA 3), induzindo a diferenciação em linfócitos Th2 (revisado por BARNES, 2008; GALLI, TSAI e PILIPONSKY, 2008; revisado por HOLGATE, 2012; revisado por DECKERS, MADEIRA e HAMMAD, 2013).

As citocinas liberadas por essas células orquestram a cascata inflamatória que ocorre na asma, incluindo a sobrevivência dos linfócitos Th2 regulada pela citocina IL-4; a diferenciação e ativação de mastócitos reguladas pelas citocinas IL-3, IL-9 e IL-13; a maturação e sobrevivência de eosinófilos reguladas pelas citocinas IL-3, IL-5 e GM-CSF; o recrutamento de basófilos regulado pelas citocinas IL-3 e GM-CSF; o desenvolvimento de hiper-responsividade das vias aéreas regulado pela citocina IL-13 e a troca de isotipo para IgE pelos linfócitos B regulada pelas citocinas IL-4 e IL-13 (revisado por RENAULD, 2001; revisado por BARNES, 2008; GALLI, TSAI e PILIPONSKY, 2008; revisado por HOLGATE, 2012; revisado por DECKERS, MADEIRA e HAMMAD, 2013). Os linfócitos B produzem então IgE alérgeno-específica em grandes quantidades, que se difundem sistemicamente e se ligam a receptores de alta afinidade para a porção Fc de IgE (Fc ϵ RI), presentes em mastócitos e basófilos dos tecidos. Esta é a chamada fase de sensibilização da hipersensibilidade imediata (revisado por BARNES, 2008; GALLI, TSAI e PILIPONSKY, 2008).

A fase efetora da hipersensibilidade imediata pode ser dividida em reação imediata, que ocorre em segundos ou minutos, e tardia, que ocorre depois de 8 a 12 horas após a re-exposição ao alérgeno. Quando o indivíduo entra em contato novamente com o antígeno e este se liga à IgE, os mastócitos e basófilos são ativados e liberam mediadores inflamatórios, incluindo histamina, mediadores lipídicos, como os leucotrienos C4, D4 e E4 e a prostaglandina D2, causando vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, edema, broncoconstrição e secreção de muco nas vias aéreas, caracterizando a reação imediata (revisado por AVERBECK et al., 2007; revisado por BARNES, 2008; GALLI, TSAI e PILIPONSKY, 2008). Já a reação tardia, compartilha características com a reação imediata, tais como obstrução das vias aéreas e hipersecreção de muco, refletindo principalmente as ações das células recrutadas da circulação, como os monócitos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e basófilos, bem como as ações dos mediadores

inflamatórios secretados pelas células teciduais (GALLI, TSAI e PILIPONSKY, 2008).

Na última década os resultados de diversas pesquisas favoreceram o entendimento do papel das células epiteliais das vias aéreas na fase inicial da resposta imune alérgica. Essas células funcionam como a principal barreira entre o ambiente e os pulmões, sendo que o dano ou a ativação das mesmas por microorganismos e irritantes é o principal estímulo que leva à liberação de diversas quimiocinas, incluindo a CCL20 (ligante de quimiocina CC 20), que se liga ao seu receptor CCR6 (receptor de quimiocina CC 6), direcionando a migração das células dendríticas da medula óssea para o epitélio e tecido submucoso (revisado por HOLGATE, 2012). Paralelamente, ocorre a expansão e a ativação das células linfóides inatas 2 (ILC2) (GALLI, TSAI e PILIPONSKY, 2008; revisado por DECKERS, MADEIRA e HAMMAD, 2013), que são uma população de células com morfologia e tamanho similar aos linfócitos, mas que não expressam marcadores típicos de linfócitos T, linfócitos B ou marcadores de outras linhagens celulares e respondem a IL-25 e IL-33, produzindo níveis elevados de citocinas IL-5 e IL-13 (revisado por HOLTZMAN et al., 2014).

Durante a re-exposição ao alérgeno, as células dendríticas pulmonares reativam os linfócitos Th2 localmente para produzir as citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Ao mesmo tempo, as células epiteliais produzem IL-25 e IL-33, as quais ativam e expandem a subpopulação de células ILC2s, levando à eosinofilia, ao aumento no número de mastócitos nos pulmões e à hipersecreção de muco. As citocinas IL-33 e GM-CSF também contribuem para a ativação e sobrevivência de eosinófilos, mastócitos e basófilos. Adicionalmente às ações já descritas, as citocinas TSLP e IL-33, produzidas após a exposição ao alérgeno, são capazes de ativar os mastócitos diretamente, independentemente da presença de IgE e alérgenos específicos (revisado por DECKERS, MADEIRA e HAMMAD, 2013). E, atuando juntas, as citocinas epiteliais, IL-33, IL-25 e TSLP, interagem com as células efetoras nas respostas alérgicas, aumentando suas funções inflamatórias, ligando a imunidade inata e adaptativa para sustentar uma resposta Th2 de maneira mais crônica (revisado por HOLGATE, 2012).

As células epiteliais das vias aéreas liberam ainda a quimiocina CCL11 (eotaxina), envolvida no recrutamento de eosinófilos via CCR3 (revisado por ROLLINS, 1997; revisado por LLOYD e RANKIN, 2003). 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 observados no tecido na inflamação alérgica (revisado por EGESTEN et al., 2001; revisado por NEVES e WELLER, 2009).

Além da CCL11, outras quimiocinas estão envolvidas na resposta alérgica. Nos modelos de inflamação pulmonar ocorre, logo após o desafio com OVA em animais previamente sensibilizados, migração de macrófagos para o tecido pulmonar em associação com a expressão de CCL2. Em seguida, ocorre acúmulo de linfócitos e eosinófilos em associação com a expressão de CCL5 e CCL11 (revisado por ROLLINS, 1997). Na asma, fatores quimiotáticos são secretados principalmente pelas células epiteliais das vias aéreas (revisado por BARNES, 2008).

A persistência de uma resposta Th2 induzida pela exposição prolongada ou repetida ao alérgeno, com lesão repetida das vias aéreas e seguida por processo de reparo excessivo, leva à presença de células inflamatórias em grandes quantidades no local afetado, a mudanças na matriz extracelular e a alterações no número, fenótipo e função das células estruturais. Essas alterações caracterizam o remodelamento das vias aéreas, com deposição de colágeno e fibras elásticas, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, hipertrofia das glândulas produtoras de muco e aumento da vascularização (VIEIRA et al., 2007; revisado por BARNES; 2008; GALLI, TSAI e PILIPONSKY, 2008; revisado por HOGAN et al., 2008).

Embora seja evidente o envolvimento dos linfócitos Th2 na asma, atualmente sabe-se que o desequilíbrio do sistema imunológico não pode ser explicado somente pela predominância de uma resposta Th2 em detrimento de uma resposta Th1, havendo participação tanto da subpopulação de linfócitos Th17 quanto de linfócitos T reguladores (Tregs) na resposta alérgica (revisado por BARNES, 2008). A

subpopulação de linfócitos Th17 não compartilha vias de desenvolvimento com as células Th1 ou Th2, sendo uma linhagem distinta, que se diferencia em resposta a uma combinação de IL-6 e TGF- β (fator de crescimento transformador beta), levando à expressão do fator de transcrição ROR γ T (receptor órfão do ácido retinóico gama t). Essas células são caracterizadas pela produção de IL-17A, IL-17F e IL-22. As citocinas IL-17A e IL-17F induzem a produção de IL-6, GM-CSF, CXCL10 (ligante de quimiocina CXCL 10) e CXCL8 pelas células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, neutrófilos e eosinófilos. A indução de CXCL8, quimioatraente de neutrófilos, foi diretamente relacionada às células Th17 na inflamação neutrofílica das vias aéreas (revisado por HOLGATE, 2012). Os neutrófilos ativados liberam elastases que promovem ativação das metaloproteinases de matriz (MMPs) e degradação do colágeno tipo III, levando à lesão tecidual (GALLI, TSAI e PILIPONSKY, 2008). Adicionalmente, as células Th17 parecem estar envolvidas na asma e na resistência aos corticoides (revisado por HOLGATE, 2012). A citocina IL-17F é considerada essencial durante a sensibilização com o antígeno para estabelecer respostas alérgicas das vias aéreas, entretanto, em camundongos já sensibilizados, a IL-17F atenua a resposta alérgica pela inibição de células dendríticas e síntese das quimiocinas CCL11 e CCL17 (SCHNYDER-CANDRIAN et al., 2006). O papel da citocina IL-17A é mais complexo na asma e parece estar relacionado à hiper-responsividade das vias aéreas. Foi demonstrado em camundongos uma correlação inversa entre IL-25 (também conhecida como IL-17E) e IL-17A na regulação das respostas alérgicas pulmonares. No modelo de inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA, a neutralização de IL-25 se correlacionou com a redução nas concentrações de IL-13 e com aumento na produção de IL-17A e prevenção da hiper-responsividade das vias aéreas. Em contraste, o bloqueio da IL-17A reverteu o efeito protetor dos anticorpos anti-IL-25, incluindo a re-expressão de IL-13, produção de CCL11, eosinofilia e hiper-responsividade das vias aéreas (BARLOW et al., 2011).

Quanto aos linfócitos Tregs, os mesmos podem ser identificados pela co-expressão de CD4, CD25 e FoxP3 ("Forkhead Box P3") e podem ser divididos em duas categorias principais. Os primeiros são linfócitos Tregs que ocorrem naturalmente, derivam do timo e tem função dependente de contato celular. A outra subpopulação de linfócitos Tregs é antígeno-específica e pode ser induzida sob condições particulares de estimulação antigênica e secretam citocinas anti-

inflamatórias como IL-10 e/ou TGF- β (revisado por HAWRYLOWICZ e O'GARRA, 2005; revisado por HOLGATE, 2012). Os linfócitos Tregs são componentes importantes da homeostase do sistema imune e tanto a redução da responsividade imunológica, quanto a indução de tolerância aos alérgenos têm sido atribuídas à participação dessas células na resposta imune. A ação supressora dos linfócitos Tregs está relacionada à diversos mecanismos, como supressão de células dendríticas envolvidas na ativação de linfócitos T efetores; inibição direta das subpopulações de células Th1, Th2 e Th17; supressão da produção de IgE e indução da produção de IgG4; inibição de mastócitos, basófilos e eosinófilos; bem como da migração das células T efectoras para os tecidos alvo (revisado por HOLGATE, 2012). Sendo assim, a deficiência na atividade dessas células está associada ao desenvolvimento de doenças alérgicas (revisado por SHI e QIN, 2005).

É importante destacar que a vasta área de superfície de epitélio das vias aéreas é diretamente exposta às espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) tanto exógenas, provenientes de poluentes ambientais e fumaça de cigarro, quanto endógenas, produzidas pelas reações metabólicas como respiração celular e fagocitose, e o pulmão possui diversos sistemas antioxidantes, presentes na superfície e dentro das células epiteliais das vias aéreas. Esses sistemas antioxidantes são classificados em enzimáticos, tais como superóxido dismutase (SOD) e catalase, e em não enzimáticos, tais como vitamina E lipossolúvel e vitamina C. Apesar disso, níveis elevados de ROS e RNS sobrecarregam as defesas antioxidantes, resultando em lesão ou morte celular. Evidências demonstram que esse estresse oxidativo participa da patogênese da asma, sendo determinante na gravidade da doença (revisado por COMHAIR e ERZURUM, 2010).

2.1.3 Tratamento para a asma

Considerando que a asma tem um impacto significativo tanto na vida dos pacientes e familiares quanto no sistema de saúde e, ainda, que não há cura para a

doença até o momento, os principais objetivos do tratamento são o controle dos sintomas, a manutenção das atividades da vida diária normais, a manutenção da função pulmonar normal ou o mais próximo possível do normal, a prevenção das exacerbações, a minimização dos efeitos colaterais das medicações e a prevenção da mortalidade (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA PARA O MANEJO DA ASMA, 2012). Para isto, é fundamental a associação do tratamento farmacológico com a educação do paciente e de seus familiares no manejo da asma, visando identificar e reduzir a exposição a alérgenos e irritantes, reduzindo os sintomas e as exacerbações e melhorando a qualidade de vida do paciente (GINA, 2015).

Em relação ao tratamento farmacológico, a combinação de corticoides inalatórios e beta-agonistas de ação prolongada continua sendo a terapia mais eficaz disponível atualmente para a asma, 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 doses elevadas e por tempo prolongado. Nas exacerbações da 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 corticosteroides sistêmicos (revisado por ADCOCK, CARAMORI e CHUNG, 2008; revisado por CORRÊA, MELO e COSTA, 2008; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA PARA O MANEJO DA ASMA, 2012; GINA, 2015). A maioria dos asmáticos responde bem aos tratamentos disponíveis, mas cerca de 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 são variáveis e devem ser avaliados individualmente (revisado por HOLMES, SOLARI e HOLGATE, 2011).

A identificação de citocinas e seus receptores que direcionam a polarização de respostas para Th2, de vias de recrutamento de leucócitos, de vias de sinalização envolvendo ativação de células e secreção de mediadores inflamatórios, possibilitou novos alvos para o desenvolvimento de medicamentos para a asma. Como resultado, um grande número de drogas encontra-se em diferentes estágios de testes, incluindo inibidores da enzima fosfodiesterase 4 (PDE4), inibidores de

leucotrienos, inibidores de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), inibidores de prostaglandinas, moduladores de citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição, proteínas recombinantes e anticorpos monoclonais, entre outros (revisado por ADCOCK, CARAMORI e CHUNG, 2008; revisado por CORRÊA, MELO e COSTA, 2008; revisado por HOLMES, SOLARI e HOLGATE, 2011). Adicionalmente, tem-se investigado o uso da imunoterapia alérgeno-específica para induzir tolerância imune aos alérgenos (revisado por AKDIS, 2012). Apesar do grande número de drogas sendo testadas, desde a introdução dos beta-agonistas (1969) e corticoesteroides (1974) para o tratamento da asma, apenas as terapias direcionadas a dois alvos terapêuticos se traduziram em uso clínico. São eles os modificadores de leucotrienos, como montelucaste, zafirlucaste e pranlucaste, e o anticorpo monoclonal direcionado para IgE, omalizumab (revisado por HOLMES, SOLARI e HOLGATE, 2011).

Juntamente com o tratamento convencional, uma grande parcela da população asmática usa espécies vegetais como tratamento complementar ou alternativo. Assim, diversos fármacos com ação comprovada contra a asma já foram isolados de vegetais com uso em problemas respiratórios, incluindo alcaloides e cromonas (revisado por CORRÊA, MELO e COSTA, 2008). No Brasil, pode-se citar o uso da canela, eucalipto, gengibre, entre outros (MACEDO, OSHIIWA e GUARIDO, 2007; revisado por ROCHA e SANTOS, 2007), apesar de não terem sido encontrados na literatura trabalhos que comprovem a ação desses fitoterápicos. Em revisão realizada por Huntley e Ernst (2000), os autores citam que várias espécies foram testadas, como *Ginkgo biloba*, *Lingusticum wallichii*, *Picrorrhiza kurroa*, *Solanum xanthocarpum*, *Solanum trilobatum* e *Cannabis sativa* não evidenciando eficácia devido, principalmente, à heterogeneidade dos trabalhos e número reduzido de pacientes. Nesse contexto, 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 pesquisa básica e estudos clínicos em pacientes asmáticos são fundamentais para a compreensão da patogênese da doença, possibilitando o conhecimento sobre as alterações imunológicas e bioquímicas específicas que a causam. Entretanto, existem obstáculos científicos e éticos para a realização de estudos em humanos que impedem o esclarecimento de certos aspectos relacionados à asma, como, por exemplo, a dificuldade de coletar amostras de tecido pulmonar e realizar múltiplas análises no mesmo paciente, o que contribui para a falta de um tratamento farmacológico mais eficaz. A utilização de modelos animais permite a investigação neste campo, sendo essencial para o entendimento dos mecanismos imunopatológicos que levam ao desenvolvimento dessa doença (revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005; BRAUN, TSCHERING, GRONEBERG, 2008; FERNANDEZ-RODRIGUEZ et al., 2008). Nesse sentido, várias espécies e desenhos experimentais de estudo são utilizados para tentar mimetizar a asma humana, e embora não haja um modelo universalmente aceito, e apesar das limitações encontradas quando estes modelos são utilizados, os mesmos permitem também testes iniciais para o desenvolvimento de novas e efetivas drogas para o tratamento da asma (revisado por HOLMES, SOLARI e HOLGATE, 2011).

Corroborando com o fato dessa doença ser complexa e heterogênea, inúmeros modelos animais são descritos na literatura e resultam em fenótipos diversos, dependendo da linhagem de camundongo, do protocolo experimental, do antígeno, da rota e da dose de sensibilização utilizados. Sendo assim, os fenótipos resultantes também são complexos, com infiltrado celular misto nas vias aéreas, resposta imune mista Th2/Th17 e sensibilidade variável ao tratamento com glicocorticoides. Neste contexto, destacam-se os modelos de asma alérgica com resposta imune de linfócitos Th2 e eosinófilos, induzidos por OVA e alumem. Os modelos murinos de asma intrínseca, caracterizados por aumento da reatividade brônquica que pode ocorrer sem inflamação significativa das vias aéreas e que utilizam a linhagem de camundongos A/J, que desenvolve espontaneamente hiper-reatividade à metacolina. Os modelos que cursam com extenso remodelamento das

vias aéreas e que requerem exposição prolongada ao antígeno sem promover o desenvolvimento de tolerância ou exposição a agentes profibróticos. E, finalmente, os modelos de doença alérgica que cursam com resposta imune de linfócitos Th17 e produção de IL-17, que são associados a inflamação neutrofílica, susceptibilidade à exacerbação, asma grave, resistência a esteroides e remodelamento (MARTIN et al., 2014).

Em relação aos modelos de asma alérgica, a espécie animal universalmente utilizada é o camundongo, por razões científicas e econômicas e pela maior facilidade na procriação, manutenção e manuseio. Esses animais têm ainda a vantagem de serem manipulados tanto geneticamente quanto imunologicamente, possibilitando a produção de animais transgênicos, nocautes e/ou imunodeficientes (revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005; revisado por HOLMES, SOLARI e HOLGATE, 2011). Vários protocolos para indução de alergia pulmonar, tanto aguda quanto crônica, têm sido descritos, 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 ao antígeno (revisado por SCHRÖDER e MAURER, 2007).

Sobre linhagens de camundongos, a mais comumente usada é a BALB/c, por apresentar uma tendência geneticamente determinada para desenvolver uma resposta imune desviada para linfócitos Th2 (revisado por SCHRÖDER e MAURER, 2007). Entre os antígenos empregados, encontra-se a OVA, alérgeno alimentar que, apesar de não representar um alérgeno pulmonar relevante para humanos, é de fácil obtenção, permite o estudo detalhado de linfócitos T 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; revisado por HOLMES, SOLARI e HOLGATE, 2011). Para a sensibilização, a abordagem mais frequente é a injeção intraperitoneal do antígeno adsorvido ao adjuvante hidróxido de alumínio, que promove necrose local, liberação de ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico e ativa as DCs, que fagocitam o antígeno e induzem uma resposta imune Th2

associada à produção de IgE específica para OVA (revisado por WEGMANN, 2008; revisado por HOLMES, SOLARI e HOLGATE, 2011).

Similarmente aos humanos, os camundongos desenvolvem hiper-responsividade 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. Adicionalmente, nos modelos de alergia pulmonar crônica, os animais apresentam mudanças estruturais nas vias aéreas (revisado por TORRES, PICADO e MORA, 2005; revisado por SCHRÖDER e MAURER, 2007; FERNANDEZ-RODRIGUES et al., 2008; revisado por WEGMANN, 2008).

No modelo murino de alergia pulmonar induzido por OVA, diversos fármacos provenientes de moléculas sintéticas, extratos de plantas e substâncias específicas extraídas de plantas têm sido avaliados, com resultados promissores. Dentre os mais recentes, encontram-se as avaliações dos efeitos dos extratos de *Siegesbeckia glabrescens* (JEON et al., 2014), de *Scrophularia striata* (AZADMEHR et al., 2013), de *Pinus pinaster* (SHIN et al., 2013) e de *Vitex rotundifolia* (BAE et al., 2012), sendo observadas reduções na inflamação no tecido pulmonar, na hipersecreção de muco, na hiper-responsividade das vias aéreas, no número de células inflamatórias no lavado bronco-alveolar (LBA), nos níveis das citocinas de perfil Th2 e nos níveis séricos de IgE. Efeitos semelhantes foram observados com a administração de componentes derivados de plantas como o PPY-345 (4-acetil-3-metil-6-(3,4,5-trimetoxifenila) pirano[3,4-c]piran-1,8-diono) (CHUNG et al., 2013), ácido elágico (ALVES et al., 2013), salidrosideo (WANG et al., 2014) e curcumina (MA et al., 2013). Adicionalmente, o salidrosideo aumentou os níveis de interferon gama (IFN- γ) no LBA e ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de IFN- γ no tecido pulmonar, regulando o equilíbrio das respostas Th1/Th2 (WANG et al., 2014) e a curcumina aumentou os níveis de IL-17A e IL-10 no LBA, reduziu a subpopulação de células Th17 e aumentou a subpopulação de células Treg (MA et al., 2013).

2.2 *Echinodorus grandiflorus* (Chamisso & Schlechtendal) Micheli

Echinodorus grandiflorus pertence à família Alismataceae, a qual reúne plantas herbáceas, aquáticas ou semi-aquáticas. *Echinodorus* ocorre dos Estados Unidos até a Argentina, sendo restrito ao hemisfério ocidental, embora sejam encontradas ornamentando aquários em todo o mundo. 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 (BEVILAQUA et al., 2001; LEHTONEN, 2008). 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 (LOPES et al., 2000; TIBIRIÇÁ 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, chá-de-campanha e aguapé (CARDOSO, PEREIRA, LAINETTI, 2003; CARDOSO, PEREIRA, LAINETTI, 2005; LEITE et al., 2007).

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 (LEHTONEN, 2008; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). 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 (VIEIRA e LIMA, 1997; LEHTONEN, 2008). O aspecto das folhas e das inflorescências com flores em antese pode ser observado na Figura 3.



Figura 3. *Echinodorus grandiflorus*: aspecto das folhas e da inflorescência com flores em ântese. Foto: PIMENTA, D. S. (2002), com autorização.

As partes de *E. grandiflorus* usadas para o tratamento de diversas enfermidades são as folhas e os rizomas. Suas folhas constituem matéria-prima para um dos chás mais empregados como diurético e depurativo e seu uso é muito difundido tanto nos grandes centros como no interior do Brasil. O chá das folhas é utilizado pela população como diurético, preventivo da arteriosclerose, laxativo, adstringente, antiartrítico, antirreumático, 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, como anti-helmíntico e emagrecedor (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002; CARDOSO, PEREIRA, LAINETTI, 2003; NUNES et al., 2003; SOUZA et al., 2004; CARDOSO, PEREIRA, LAINETTI, 2005; AGRA, FREITAS e BARBOSA-FILHO, 2007). 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®”, industrializado pela empresa “Refrigerantes Flexa Ltda.”, com ampla área de cultivo da espécie em Tanguá - Rio de Janeiro, e “Mate Couro®”, produzido em Belo Horizonte - Minas Gerais (PIMENTA, 2002; CARDOSO, PEREIRA, LAINETTI, 2005). Os rizomas são utilizados externamente como cataplasmas no tratamento de hérnias (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002).

Quanto aos constituintes químicos, estudos mais amplos da caracterização farmacognóstica de *E. grandiflorus* evidenciaram grupos químicos de relevância terapêutica, como substâncias fenólicas, diterpenos, flavonoides, saponinas e

taninos (MANNNS e HARTMANN, 1993; TANAKA et al., 1997; COSTA et al., 1999; TANAKA, 2000; DUARTE et al., 2002; PIMENTA, 2002; PIMENTA, FIGUEIREDO e KAPLAN, 2006; SCHNITZLER, PETEREIT e NAHRSTEDT, 2007; GARCIA et al., 2010; LIMA-DELLAMORA et al., 2014; PRANDO et al., 2015). Um resumo dos principais constituintes químicos isolados de *E. grandiflorus* é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Constituintes químicos isolados de *Echinodorus grandiflorus*.

CLASSE	SUBSTÂNCIA	AUTORES
Ácidos graxos	Ácido palmítico	Pimenta, 2002
Ácidos carboxílicos	Ácido trans-aconítico	Schnitzler, Petereit e Nahrstedt, 2007 Garcia et al., 2010
Sesquiterpenos	Óxido de cariofileno (E)-cariofileno α -humuleno (E)-nerolidol Driminol Trans-cariofileno Bisabolano Diidroedulano	Pimenta, 2002 Pimenta, Figueiredo e Kaplan, 2006
Diterpenos	Fitol Ácido hardwickico Echinodol Ácido echinóico	Manns e Hartmann, 1993 Tanaka et al., 1997 Tanaka, 2000 Costa et al., 1999 Tanaka, 2000 Pimenta, 2002 Pimenta, Figueiredo e Kaplan, 2006
Esteroides	Estigmasterol Sitosterol Campesterol	Pimenta, 2002
Ácidos fenólicos	Ácido cafeico Ácido ferúlico Ácido isoferúlico Catequina Ácido clorogênico	Pimenta, 2002 Lunardi et al., 2014
Derivados do ácido tartárico	Ácido caftárico Ácido chicórico Ácido cafeoil feruloil tartárico Ácido 2-O-feruloil tartárico Ácido di-feruloil tartárico	Schnitzler, Petereit e Nahrstedt, 2007 Garcia et al., 2010 Prando et al., 2015
Flavonoides	Isovitexina Isoorientina Swertisina Swertiajaponina Vitexina Epicatequina	Pimenta, 2002 Schnitzler, Petereit e Nahrstedt, 2007 Garcia et al., 2010 Lima-Dellamora et al., 2014 Prando et al., 2015
Alcaloides	Cafeína Teofilina Teobromina	Garcia et al., 2010

Em relação à toxicidade de *E. grandiflorus*, Pimenta (2002) avaliou os extratos brutos aquoso, hexânico e metanólico das folhas e suas partições e não observou nestes extratos nenhum efeito citotóxico. Silva, Bastos e Takahashi (2010) utilizaram o extrato hidroalcoólico das folhas nas doses de 500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg e não observaram genotoxicidade, atividade clastogênica ou efeitos citotóxicos em eritrócitos da medula óssea. Lima-Dellamora e colaboradores (2014) avaliaram diferentes extratos das folhas e não observaram atividade genotóxica. Polacchine (2005) avaliou a toxicidade aguda em camundongos, utilizando a dose máxima de 4000 mg/kg de peso corporal e não registrou mortes nas 24 horas de observação. Brugiolo e colaboradores (2010) avaliaram o efeito do extrato aquoso administrado por via oral a ratas Wistar e, embora não tenham sido observadas alterações na performance reprodutiva, foram registradas anemia e alterações histopatológicas no baço, nos rins e no fígado nas doses de 250 mg/kg, 500 mg/kg e 1000 mg/kg, além de leucocitose na dose de 1000 mg/kg. Entretanto, não foram encontrados na literatura consultada estudos sobre a toxicidade de *E. grandiflorus* em humanos.

Os efeitos demonstrados para os diversos extratos de *E. grandiflorus* em modelos *in vitro* e *in vivo* incluem atividades anti-inflamatória, antiedematogênica, antinociceptiva, diurética, antioxidante, hipotensora, anti-hipertensiva, vasodilatadora, hipocolesteremiante, antimicrobiana, tripanocida, leishmanicida e antineoplásica, conforme descrição a seguir.

As atividades anti-inflamatória e antiedematogênica foram demonstradas em modelos de edema plantar através da inibição da migração celular e redução do volume de exsudato e no modelo de pleurisia (PIMENTA, 2002; CARDOSO, PEREIRA, LAINETTI, 2003; DUTRA et al., 2006; GARCIA et al., 2010). Recentemente, a atividade anti-inflamatória foi demonstrada em modelo experimental de artrite, sendo observadas reduções no número total de células e de neutrófilos na cavidade sinovial, nos níveis de TNF- α e IL-1 β no tecido periarticular, na inflamação e dano articular e ósseo e na hiperalgesia (GARCIA et al., 2016). A redução da liberação de TNF- α por monócitos humanos estimulados com lipopolisacarídeo também foi demonstrada, entretanto, nas células não estimuladas o TNF- α não foi liberado, indicando ausência de propriedades pró-inflamatórias (CAMPANA et al., 2015).

A atividade antinociceptiva foi demonstrada em camundongos através da redução do número de contorções abdominais e do tempo da lambida da pata (CARDOSO, PEREIRA, LAINETTI, 2003; DUTRA et al., 2006).

O efeito diurético foi evidenciado pelo aumento do volume de urina excretado (PIMENTA, 2002; CARDOSO, PEREIRA, LAINETTI, 2003), além de eliminação de sódio, potássio e cloreto pela urina e aumento do fluxo sanguíneo cortical renal (PRANDO et al., 2015).

A atividade antioxidante *in vitro* foi demonstrada em soro e em tecido de fígado de ratos através das suas habilidades de sequestrar o radical livre DPPH (2,2-difenil 1-picrilhidrazila) e prevenir danos aos lipídios e proteínas, além de auxiliar a restaurar as atividades das enzimas catalase e SOD (LUNARDI et al., 2014; PRANDO et al., 2015).

Sobre o sistema cardiovascular, foram observadas ação anti-hipertensiva (RIBEIRO et al., 1986; PIMENTA, 2002; POLACCHINE, 2005; LESSA et al., 2008), redução da frequência cardíaca (RIBEIRO et al., 1986) e efeito vasodilatador (PIMENTA, 2002; TIBIRIÇA et al., 2007). Sobre os níveis plasmáticos de colesterol foram observadas reduções destes níveis tanto em animais normais, quanto nos animais que receberam solução oleosa de colesterol (CARDOSO, PEREIRA, LAINETTI, 2005).

A atividade antimicrobiana foi demonstrada para *Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Micrococcus luteus* (TANAKA, 2000; SOUZA et al., 2004), bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* (DUARTE et al., 2002). Foram observadas ainda atividades tripanocida, leishmanicida e inibição da proliferação de linhagens de células tumorais (PIMENTA, 2002).

É importante destacar que em trabalho anterior, utilizando-se o modelo de alergia pulmonar induzido por OVA com eutanásia após 40 dias a partir da primeira sensibilização intraperitoneal e apenas 8 horas após o último desafio, o tratamento com extrato aquoso das folhas de *E. grandiflorus* por via oral, na dose de 23 mg/kg de peso corporal por 9 dias consecutivos, reduziu o número total de células e de eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e macrófagos no lavado bronco-alveolar, a atividade da 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, apesar

de não ter alterado o infiltrado inflamatório no tecido pulmonar (BRUGIOLO et al., 2011).

2.3 Ácido ferúlico

Substâncias fenólicas ou polifênois representam uma grande variedade de estruturas caracterizadas pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a um ou mais radicais hidroxila e/ou outros substitutos. Dentre eles, os grupos mais abundantes nos alimentos são os ácidos fenólicos, os flavonoides e as lignanas. O ácido ferúlico (AF) é o ácido fenólico mais abundante nos grãos dos cereais e pertence à classe dos ácidos hidroxicinâmicos (revisado por D'ARCHIVIO et al., 2007). Amplamente presente no reino vegetal, foi isolado pela primeira vez da resina comercial derivada de *Ferula foetida*, em 1866, por Hlasiwetz e Barth, na Áustria, mas só foi quimicamente sintetizado em 1925 (revisado por GRAF, 1992; revisado por ZHAO e MOGHADASIAN, 2008).

Ácido ferúlico é o nome comum para o ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico que tem fórmula linear $\text{HOC}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$, peso molecular 194,18 e ponto de fusão de 174°C. É um ácido forte dibásico e geralmente existe como o isômero *trans* quando isolado de plantas. Pode ser solubilizado em etanol, acetato de etila e água quente e é moderadamente solúvel em éter, benzeno e éter de petróleo (revisado por GRAF, 1992). Sua estrutura química pode ser observada na Figura 4.

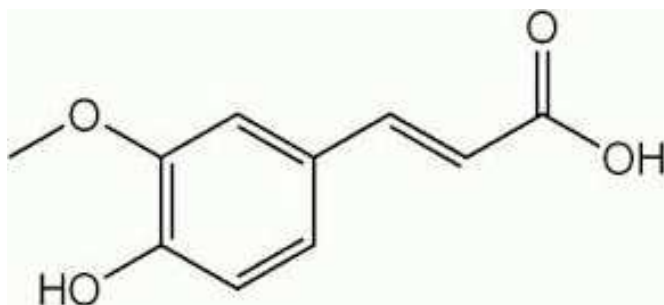


Figura 4. Estrutura química do ácido ferúlico (MANCUSO e SANTANGELO, 2014).

Produzido nos vegetais a partir do metabolismo da fenilalanina e da tirosina, ocorre principalmente em sementes e folhas, tanto na sua forma livre, quanto ligado covalentemente à ligninas, polissacarídeos, glicoproteínas, poliaminas e ácidos graxos (revisado por GRAF, 1992; revisado por ZHAO e MOGHADASIAN, 2008; revisado por MANCUSO e SANTANGELO, 2014). A Figura 5 ilustra a principal via metabólica para a biossíntese do AF em vegetais.

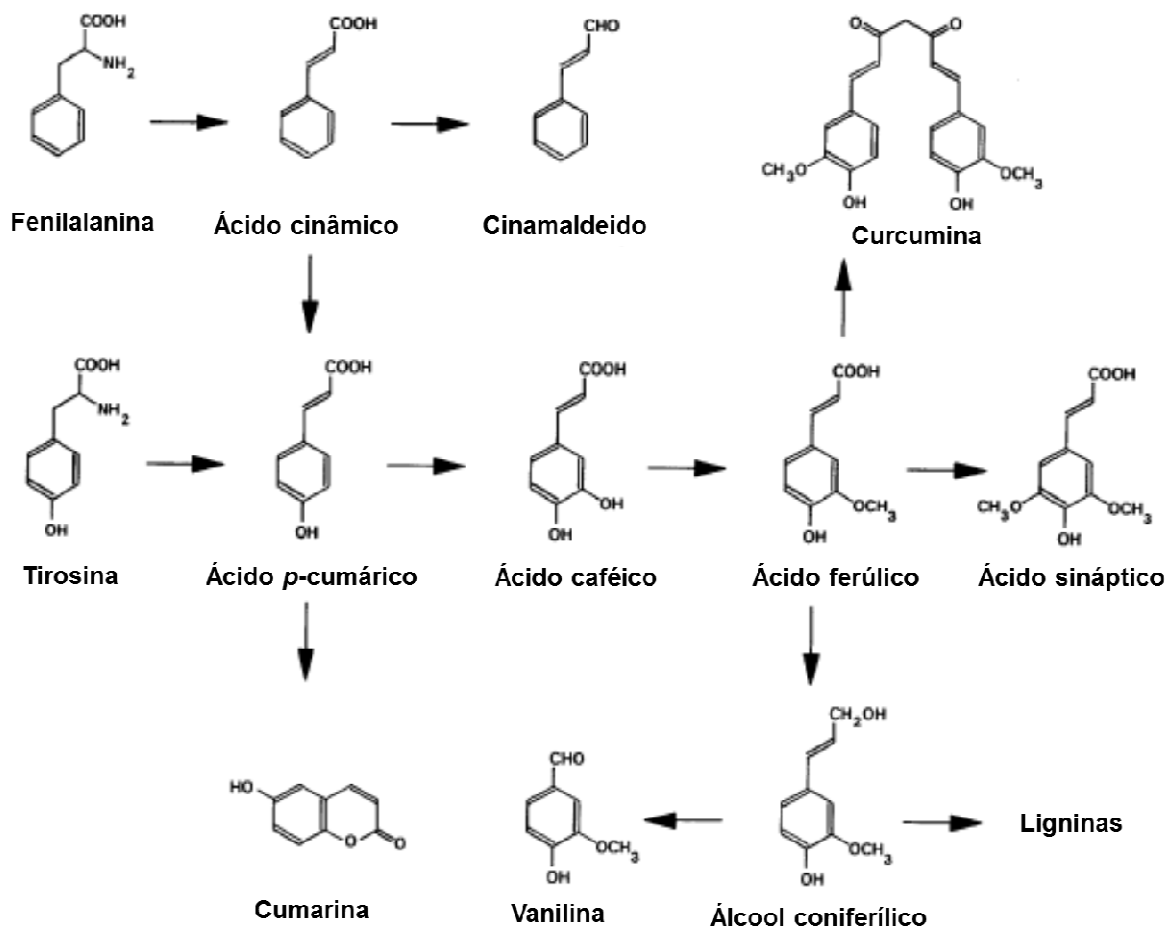


Figura 5. Principal via metabólica de biossíntese do ácido ferúlico em vegetais (adaptado de GRAF, 1992).

Várias funções fisiológicas nas plantas foram descritas para o AF, como aumentar a extensibilidade das paredes durante o alongamento celular, inibir a germinação, aumentar a resistência do hospedeiro contra infestações, além de atuar como defensivo contra predadores naturais e na função alelopática, regulando o

crescimento das plantas. No entanto, a principal função fisiológica relaciona-se a sua potente ação antioxidante explicada pela grande capacidade de eliminar radicais livres e reduzir os efeitos nocivos da radiação ultravioleta (UV) (revisado por GRAF, 1992).

O AF é abundantemente encontrado em grãos, frutas, legumes, bebidas e comidas industrializadas, constitui ingrediente bioativo de muitos alimentos, sendo encontrado em inúmeras espécies alimentares (revisado por GRAF, 1992; revisado por ZHAO e MOGHADASIAN, 2008; revisado por MANCUSO e SANTANGELO, 2014). Estima-se que a soma da ingestão de AF através do consumo de cereais, legumes, frutas, café e sucos pode chegar a 150-250 mg por dia, dependendo dos hábitos alimentares do indivíduo. Entretanto, ainda não está claro se essa quantidade de ingesta é suficiente para gerar efeitos biológicos e também não existem estudos relatando uma dose razoável para ser usado como suplemento alimentar (revisado por ZHAO e MOGHADASIAN, 2008). O AF já foi identificado na planta medicinal *Echinodorus grandiflorus* (PIMENTA, 2002) e é um dos componentes ativos nas ervas medicinais chinesas *Angelica sinensis*, *Cimicifuga heracleifolia* e *Ligusticum chuanxiong* (revisado por OU e KWOK, 2004; revisado por MANCUSO e SANTANGELO, 2014). Além disso, foi aprovado como um aditivo antioxidante e conservante de alimentos no Japão (revisado por ZHAO e MOGHADASIAN, 2008).

A farmacocinética do AF é bem estudada em modelos animais e foi demonstrado que após administração por via oral, pode ser absorvido no estômago, jejuno e íleo e menos de 1% foi encontrado nas fezes de ratos, indicando uma absorção muito eficiente. Além disso, 30 minutos após a administração oral, o AF pode ser encontrado na mucosa gástrica, intestino, sangue e tecidos periféricos, incluindo fígado, rins, pulmões, baço, coração, útero e cérebro. É principalmente transportado pela albumina sérica e excretado através da urina em ratos, tanto na forma livre quanto conjugada. A principal via de metabolismo *in vivo* do AF ocorre através da reação de conjugação com ácido glucurônico e/ou sulfato no fígado, sendo que a mucosa intestinal e os rins também podem contribuir para este processo. Devido ao seu rápido metabolismo, a biodisponibilidade do AF livre é muito baixa e sua meia-vida é curta, podendo variar de 10 a 30 minutos dependendo da dose e via de administração em ratos (revisado por ZHAO e MOGHADASIAN, 2008). Apesar disso, é mais biodisponível que flavonoides e outros monofenóis

dietéticos estudados até o momento, permanecendo no sangue por mais tempo que outros antioxidantes, tais como a vitamina C (revisado por SRINIVASAN, SUDHEER e MENON, 2007).

Já a farmacocinética clínica do AF não é bem documentada, mas estudos limitados sugerem que é similar a dos animais, sendo absorvido rapidamente, atingindo níveis plasmáticos máximos 24 minutos após a administração oral e com meia-vida de 42 minutos (revisado por ZHAO e MOGHADASIAN, 2008). A baixa disponibilidade do AF após sua administração oral poderia limitar seu uso clínico, entretanto, formulações como nanopartículas de lipídeos sólidos e ciclodextrinas têm sido propostas para permitir sua melhor absorção tanto por via oral quanto pela pele, aumentando sua concentração em órgãos periféricos (revisado por BARONE, CALABRESE e MANCUSO, 2009; revisado por MANCUSO e SANTANGELO, 2014). Em relação à toxicidade, a dose letal 50% (DL50) aguda oral foi de 2,1 g/kg por dia nas fêmeas e 2,4 g/kg por dia nos machos de ratos da linhagem F344. Não foi encontrada toxicidade subcrônica significativa em ratos fêmeas e machos da linhagem F344 após 13 semanas de consumo dietético de AF na dose de 0,16 g/kg de peso corporal por dia. Já a DL50 calculada para camundongos foi de 3,2 g/kg por dia (revisado por ZHAO e MOGHADASIAN, 2008).

Os estudos dos efeitos benéficos do AF em humanos são realizados a partir da ingestão de alimentos que o contenham, o que não permite a titulação de uma dose específica associada a determinado efeito biológico. Adicionalmente, o pequeno número de estudos em humanos pode ser explicado pelo fato de suplementos dietéticos, ao contrário de drogas, não necessitarem de estudos clínicos de fase II e III para demonstrar sua segurança e eficácia clínica para serem comercializados (revisado por MANCUSO e SANTANGELO, 2014).

Por suas propriedades antioxidante e antimicrobiana, o AF tem diversas aplicações práticas como, por exemplo, na preservação de alimentos, no aumento da viscosidade e formação de gel a partir de polissacarídeos, na produção de vanilina, no processamento de produtos lácteos, como substância ergogênica em alimentos esportivos, loções de pele, telas e cremes de cabelo com fotoproteção, entre outras (revisado por OU e KWOK, 2004).

O AF apresenta uma ampla variedade de efeitos terapêuticos demonstrados em modelos *in vitro* e *in vivo* que incluem atividades antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, anticâncer e fotoprotetora. A maioria de suas atividades

tem sido atribuída às propriedades antioxidante e anti-inflamatória, sugerindo que o mesmo pode ser útil no tratamento de diversas doenças, como diabetes, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, doenças neurológicas, doenças pulmonares e alergias, conforme descrição a seguir.

O AF livre é um potente antioxidante devido a sua estrutura química que permite estabilizar o radical fenoxil, encerrar a reação em cadeia de radicais livres (revisado por GRAF, 1992) e proteger contra a peroxidação lipídica (revisado por SRINIVASAN, SUDHEER e MENON, 2007). Sendo assim, possui uma grande capacidade de eliminar radicais livres, além de aumentar a atividade de enzimas responsáveis pela eliminação dos radicais livres, inibir enzimas que catalisam a produção de radicais livres e ativar a resposta ao estresse celular (revisado por OU e KWOK, 2004; revisado por MANCUSO e SANTANGELO, 2014).

A atividade anti-inflamatória foi demonstrada *in vitro* através da redução nos níveis de mediadores inflamatórios como prostaglandina E2, TNF- α e óxido nítrico sintase indutível (iNOS) (revisado por SRINIVASAN, SUDHEER e MENON, 2007). Em linhagem de macrófagos murinos, após a infecção com vírus influenza e vírus sincicial respiratório, o tratamento com AF reduziu os níveis de IL-8 e CXCL2, respectivamente. Após a infecção com vírus influenza em camundongos, foram observadas tendência de redução dos níveis de IL-8 e redução do número de neutrófilos no LBA (revisado por OU e KWOK, 2004).

O efeito analgésico foi demonstrado através de testes de hiperalgesia térmica e alodinia mecânica em camundongos, com melhora após o tratamento crônico com AF (LV et al., 2013).

A atividade antiviral foi demonstrada por meio da inibição do crescimento e reprodução do vírus influenza, vírus sincicial respiratório e vírus da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). Além disso, exibiu atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas, bactérias Gram negativas e leveduras e efeitos inibitórios sobre o crescimento de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter koseri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* e *Shigella sonnei* (revisado por OU e KWOK, 2004).

O tratamento com AF teve efeito anti-proliferativo e potencializou a citotoxicidade de agentes antineoplásicos em diversas linhagens de células cancerígenas e em modelos de tumores *in vivo* (revisado por MANCUSO e SANTANGELO, 2014), sendo seus efeitos relacionados a indução de apoptose

(BANDUGULA e PRASAD, 2013; PENG et al., 2013; EROGLU et al., 2015). Apresentou ainda atividade anti-apoptótica em células mononucleares de sangue periférico normais expostas ao estresse oxidativo (KHANDUJA et al., 2006).

Após administração cutânea, o AF é bem absorvido e é efetivo em prevenir lesões de pele causadas pelos raios UV, e por isso constitui ingrediente ativo em muitas loções cosméticas para a pele (revisado por GRAF, 1992; revisado por MANCUSO e SANTANGELO, 2014).

Em diversos modelos animais o AF demonstrou efeitos benéficos, destacando-se a redução da glicose sanguínea no modelo de *diabetes mellitus* (CHOI et al., 2011; AZAY-MILHAU et al., 2013) e a redução da obesidade e dos níveis de TNF- α no soro no modelo de síndrome metabólica (WANG et al. 2015a; SENAPHAN et al., 2015). Sobre o sistema cardiovascular foram observadas a redução dos níveis de triglicérides e colesterol, a redução da pressão arterial, a melhora da função ventricular, a redução das placas ateroscleróticas e efeitos antiarrítmicos (revisado por BARONE, CALABRESE e MANCUSO, 2009; revisado por OU e KWOK, 2004; KIM et al. 2003; revisado por MANCUSO e SANTANGELO, 2014). Em modelos animais de doença de Alzheimer o AF reduziu a neuroinflamação, os níveis de IL-1 β e a apoptose celular (revisado por MANCUSO e SANTANGELO, 2014; revisado por SGARBOSSA, GIACOMAZZA e CARLO, 2015).

Sobre a resposta alérgica foi demonstrado que o AF inibiu a anafilaxia cutânea passiva, a degranulação de mastócitos, as reações de Arthus e a reação de hipersensibilidade tardia em ratos, suprimiu a vasculite cutânea em cobaias e aumentou a função fagocitária dos fagócitos mononucleares. Estes resultados sugerem que AF tem amplos efeitos supressores sobre as reações alérgicas (HU e HANG, 1991). Em estudo publicado recentemente, o AF induziu o desenvolvimento de uma resposta de perfil Th1 e melhorou a inflamação alérgica das vias aéreas (LEE et al., 2015). Entretanto, não foram encontrados na literatura outros trabalhos avaliando os efeitos do AF no modelo de alergia pulmonar, havendo a necessidade de mais estudos para esclarecer a utilidade desse ácido fenólico na melhora do quadro asmático.

Sendo a asma uma doença inflamatória crônica para a qual existe a necessidade do desenvolvimento de novos tratamentos e considerando-se o grande potencial antioxidante e anti-inflamatório atribuído tanto à *E. grandiflorus* quanto ao ácido ferúlico, presente na planta, este trabalho avaliou os efeitos e os prováveis

mecanismos de ação do extrato aquoso das folhas de *E. grandiflorus*, de suas frações metanólica e residual e do ácido ferúlico na modulação da resposta imune em um modelo de alergia pulmonar induzida por OVA.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos e os prováveis mecanismos de ação do extrato aquoso das folhas de *E. grandiflorus*, de suas frações metanólica e residual e do ácido ferúlico na modulação da resposta imune no modelo murino de alergia pulmonar induzida por OVA.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a avaliação do perfil químico do extrato aquoso das folhas de *E. grandiflorus* (EAEg), das frações metanólica (FM) e residual (FR) desse extrato e do ácido ferúlico (AF) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

- Testar o EAEg, a FM, a FR e o AF no modelo murino de alergia pulmonar induzida por OVA e avaliar os seguintes parâmetros:

- a) Contagem total e específica de células no LBA;
- b) Grau de infiltrado celular inflamatório e produção de muco pelas células caliciformes no tecido pulmonar nos cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS), respectivamente;
- c) Atividade da EPO no homogenato de tecido pulmonar através de ensaio enzimático;
- d) Produção das quimiocinas CCL5, CCL11 e CCL20 no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar através de ELISA (ensaio imunoenzimático);
- e) Perfil de produção das citocinas TSLP, IL-25, IL-33, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , TGF- β e IL-10 no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar através de ELISA;
- f) IgE, IgG1 e IgG2a séricas específicas anti-OVA através de ELISA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal, preparação e fracionamento do extrato e aquisição do ácido ferúlico

Optou-se, neste trabalho, por avaliar o efeito do extrato e das frações obtidos a partir das folhas de *Echinodorus grandiflorus*, considerando que o chá das folhas é a forma mais utilizada pela população como diurético e anti-inflamatório. Para isto, as folhas foram coletadas em novembro de 2010 na área de cultivo para a produção do refrigerante Mineirinho®, no município de Tanguá - Rio de Janeiro, e a identificação botânica foi realizada pelo Dr. Daniel Sales Pimenta. A exsicata encontra-se depositada sob o número 30.707 no Herbário CESJ da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). O extrato aquoso de *E. grandiflorus* e o fracionamento foram elaborados sob responsabilidade do Dr. Daniel Sales Pimenta no laboratório de Botânica Aplicada e Etnobotânica do Departamento de Botânica da UFJF. Para a obtenção do extrato, as folhas de *E. grandiflorus* foram limpas e secas em estufa de secagem com circulação e renovação de ar (Cienlab CE-22/480, Campinas, Brasil) com temperatura controlada de 40°C e ventilação forçada até peso constante. Em seguida passaram por um processo de divisão até atingirem tamanho reduzido em torno de 1 cm². Este material vegetal foi colocado em balão de fundo chato, foi acrescentada água destilada quente (50 g de folha/L de água) e foi acoplado ao sistema um condensador para extração sob refluxo. O balão foi colocado em manta de aquecimento e este foi mantido por dez minutos após o início da fervura. Após este período o mesmo foi desligado e o material vegetal permaneceu em infusão por quatro horas, sendo posteriormente filtrado em papel de filtro e levado para congelamento. O EAEg foi descongelado, acondicionado em frascos próprios e liofilizado (Liofilizador Terroni Enterprise I, São Carlos, Brasil). O extrato seco com rendimento de 10,85% foi acondicionado em frasco de vidro e mantido sobre refrigeração. Para o fracionamento, uma alíquota de 5,85 g do EAEg foi solubilizada em metanol (100 mL) e o solvente foi trocado de 2 em 2 dias até

completar o número de 7 extrações. A fração metanólica (2,2334 g) teve o solvente eliminado através de evaporador rotatório a 40°C (Fisatom 802, São Paulo, Brasil). Foi gerado ainda um resíduo (3,4973 g), insolúvel em metanol, que teve o solvente eliminado por evaporação simples. As frações, metanólica e residual, secas, foram acondicionadas em frascos de vidro e mantidas sobre refrigeração. O ácido ferúlico foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich Corp (St Louis, EUA).

4.2 Perfil químico do extrato aquoso de *E. grandiflorus*, das frações metanólica e residual e do ácido ferúlico

Uma alíquota de 30 mg do extrato aquoso de *E. grandiflorus*, das frações metanólica e residual e do ácido ferúlico foram enviadas para análise por CLAE na Plataforma de Metodologia Analítica de Farmanguinhos FIOCRUZ/RJ. Os perfis químicos foram obtidos por CLAE-UV, em equipamento Shimadzu com 2 bombas LC-10AD, desgaseificador DGU-12A, injetor automático SIL-10AD, forno de colunas CTO-10A e detector por arranjo de diodos SPD-M10AVP (São Paulo, Brasil). Os dados foram adquiridos por interface SCL-10A e aquisição de dados e controle pelo software Shimadzu CLASS-VP versão 6.13 SP2 (São Paulo, Brasil). Para isso, 5 mg de cada amostra foram diluídas em 500 µL de água, filtrados em membrana de 0,22 µm Durapore (Millipore, Darmstadt, Alemanha) e injetados em coluna Supelcosil - C18 - 25 cm X 4,6 mm - 5 µm, na presença de coluna guarda do tipo supelcoguard: LC 18 - 2 cm. Foi utilizado um sistema com gradiente linear que consistiu de uma fase móvel: ácido trifluoroacético 0,05% em água (A) e acetonitrila (B), com fluxo de fase a 1 mL/minuto, partindo no tempo zero com 5% de acetonitrila chegando a 65% em 60 minutos. Entre 60 e 70 minutos a concentração de B subiu de 65 para 100%, ao atingir os 70 minutos até os 80 minutos foi mantido os 100% de B, retornando linearmente entre 80 e 83 minutos a 5% B e mantendo-se por mais 15 minutos. Foi realizado um monitoramento utilizando-se o detector UV em varredura entre 200 a 400 nm, sendo selecionadas as leituras a 220, 270, 335 e 360 nm.

4.3 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, com aproximadamente 6 a 8 semanas de idade, pesando em média 22 g, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da 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 (Alesco, Monte Mor, Brasil), na sala de manutenção de animais do laboratório de Imunologia da UFJF. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-reitoria de Pesquisa da UFJF, sob o número 073/2012-CEEA (Anexo A), que segue as regras éticas internacionais em experimentação animal.

4.4 Delineamento experimental

Para indução da alergia pulmonar experimental, os animais foram sensibilizados com OVA (Grade V; Sigma-Aldrich Corp, St Louis, EUA) por meio de duas injeções intraperitoneais (i.p.) de 3 µg de OVA adsorvida com 1 mg de hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, EUA) nos dias 0 e 14 do protocolo experimental. Em seguida, os camundongos foram desafiados, através de nebulização com OVA 1% durante 20 minutos por dia (Inalatec Plus, NSR Ind. Com. e Repr. Ltda, São Paulo, Brasil), nos dias 21, 23, 25, 27 e 29. O EAEG, o AF e a dexametasona foram solubilizados em água filtrada e as frações metanólica e residual foram solubilizadas em água filtrada contendo 10% de Tween 20 (Isofar, Duque de Caxias, Brasil) na maior concentração utilizada (100 mg/kg de peso corporal). A dexametasona foi utilizada como controle positivo do tratamento e todos os tratamentos foram realizados por via oral, em volume de 0,1 mL por animal por dia, do dia 21 ao dia 29 do protocolo, imediatamente antes do desafio. No dia 30 do protocolo, os animais foram eutanasiados e as análises realizadas (Figura 6). Um

resumo dos procedimentos realizados em cada um dos grupos experimentais é mostrado na Tabela 3. É importante destacar que, em análise realizada previamente, os animais com alergia pulmonar (AP) foram divididos em dois grupos, não tratados e tratados com 10% de Tween 20 por via oral, não sendo observadas diferenças (dados não mostrados).

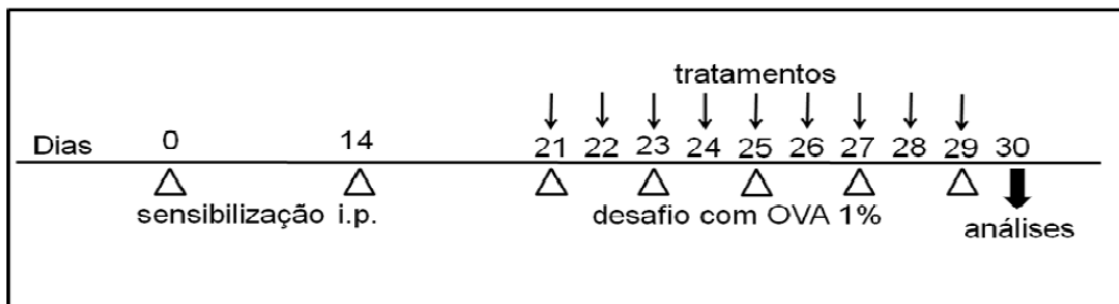


Figura 6. Delineamento experimental.

Tabela 3. Grupos experimentais.

GRUPO (n=12)	INDUÇÃO DA ALERGIA PULMONAR	TRATAMENTO (0,1 mL/animal/dia)	CONCENTRAÇÕES
Controle	-	-	-
Alergia Pulmonar (AP)	+	Veículo (Tween 20)	10%
Dexa	+	Dexametasona	3 mg/kg
EAEg	+	Extrato aquoso das folhas de <i>E. grandiflorus</i>	25 mg/kg 50 mg/kg 100 mg/kg
FM	+	Fração metanólica do EAEg	25 mg/kg 50 mg/kg 100 mg/kg
FR	+	Fração residual insolúvel em metanol do EAEg	25 mg/kg 50 mg/kg 100 mg/kg
AF	+	Ácido ferúlico	25 mg/kg 50 mg/kg 100 mg/kg

4.5 Obtenção de material biológico e análises realizadas

Todo o material biológico foi obtido e armazenado individualmente 24 horas após o último desafio, no dia 30 do protocolo. Cada grupo experimental consistiu em 12 animais que foram divididos em duas partes iguais, sendo a primeira utilizada para coleta do LBA e a segunda parte utilizada para coleta de sangue e de pulmões para análise histopatológica e realização de homogenato de tecido pulmonar. Para a coleta do LBA, os animais foram eutanasiados por dose letal de anestesia por via i.p. com ketamina a 90 mg/kg (Syntec, Cotia, Brasil) e xilasina a 10 mg/kg (Calmiun, Agener União, São Paulo, Brasil). A traqueia foi exposta e canulada com sonda (CPL Medical's, São Paulo, Brasil) conectada a uma seringa e os pulmões foram lavados com 1,0 mL de PBS (solução de tampão fosfato) gelado, por 2 ou 3 vezes para a coleta de aproximadamente 0,7 mL de LBA, que foi armazenado individualmente. O LBA foi utilizado para a contagem total e diferencial de células. O sangue foi coletado sob anestesia por via i.p. com ketamina a 90 mg/kg (Syntec, Cotia, Brasil) e xilasina a 10 mg/kg (Calmiun, Agener União, São Paulo, Brasil) pelo plexo braquial e o soro foi separado por centrifugação a 14000 rpm por 1 minuto (Centrifuge 5410, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e armazenado a -80°C para posterior dosagem de anticorpos. Em seguida, os animais foram mortos por aprofundamento da anestesia e a caixa torácica foi recortada longitudinalmente, o tecido pulmonar foi lavado através de perfusão com 10 mL de PBS gelado e os lobos pulmonares foram retirados. O lobo pulmonar superior direito de cada camundongo foi fixado em formol tamponado a 10% para a avaliação histopatológica. Os lobos pulmonares restantes foram coletados e armazenados individualmente a -80°C para obtenção do homogenato de tecido pulmonar e posterior determinação da atividade da EPO e dosagem de citocinas e quimiocinas.

4.5.1 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 Blue* (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, EUA) para uma parte do LBA, individualmente. Para cada amostra, 20 μL dessa solução foram colocadas na lâmina da câmara de Neubauer e as células foram contadas. O resultado foi expresso como número de células $\times 10^4/\text{mL}$ de LBA. Posteriormente o LBA foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 1200 rpm (Jouan CR 312, Thermo Electron Corporation, Waltham, EUA), o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em PBS e utilizado para contagem específica de leucócitos no LBA através do citospyn. Resumidamente, 200 μL do sedimento do LBA, contendo aproximadamente 1×10^5 células, foram citocentrifugados (Centrífuga Citológica, Fanem, São Paulo, Brasil) a 2800 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com HE com o corante Instant Prov (Newprov, Pinhais, Brasil) e foi realizada a contagem de 300 células por lâmina, com o auxílio de microscópio óptico (BX41PF, Olympus Optical, Tokyo, Japão) nos aumentos de 400 e 1000 vezes. As células foram caracterizadas de acordo com critérios morfológicos padrão e os resultados expressos como número específico de células $\times 10^4/\text{mL}$ de LBA.

4.5.2 Análise histopatológica

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 μm de espessura e as lâminas foram coradas pela HE (EasyPath, São Paulo, Brasil), para análise do infiltrado celular, ou pelo PAS (EasyPath, São Paulo, Brasil), para análise da produção de muco pelas células caliciformes. Após coloração, os cortes foram dispostos sobre lâminas e montados em lamínulas com Entellan (Merck

Millipore, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram observadas em toda sua extensão em microscópio óptico Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) nos aumentos de 100, 200 e 400 vezes, por dois avaliadores independentes, calibrados e cegados em relação aos grupos. As áreas peribronquiolares e perivasculares foram avaliadas de acordo com o grau de infiltrado celular inflamatório, nos cortes pulmonares corados com HE, 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.

A avaliação da produção de muco pelas células caliciformes foi realizada nos cortes pulmonares corados com PAS e foi expressa através da contagem do número de células PAS positivas por 100 μm^2 de tecido pulmonar, em aumento de 400 vezes. Para a análise estatística foram utilizadas as médias aritméticas simples dos campos pulmonares avaliados, sendo 6 lâminas representativas de cada grupo experimental, para cada coloração avaliada.

4.5.3 Determinação da atividade da EPO no tecido pulmonar

Para a obtenção do homogenato, 100 mg de cada tecido pulmonar foi macerado em 1 mL de PBS contendo inibidores de proteases (0,1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM cloreto de benzetonio, 10 mM ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e 2 μL de aprotinina A) e 0,05% Tween 20. As amostras foram então centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm a 4°C (CR 312, Thermo Electron Corporation, Waltham, EUA). Os sobrenadantes foram armazenados a -80°C, até serem utilizados para dosagem de quimiocinas e citocinas através de ELISA. O sedimento do homogenato de tecido pulmonar foi processado para determinação da

atividade da EPO. Após lise das hemácias, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C (CR 312, Thermo Electron Corporation, Waltham, EUA), o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 1,9 mL de hexadeciltrimetil brometo de amônio (HTAB) 0,5% em PBS e homogeneizado. Seguiu-se o congelamento das amostras por três vezes em nitrogênio líquido e a centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C (CR 312, Thermo Electron Corporation, Waltham, EUA). O sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático. Resumidamente, 10 mg de OPD (*o*-fenilenodiamina) foi dissolvida em 5,5 mL de água destilada e, em seguida, 1,5 mL de solução de OPD foi adicionado a 8,5 mL de tampão Tris (pH 8,0), seguido pela adição de 7,5 µL de água oxigenada. Usando uma placa de 96 poços, 100 µL da solução de substrato foi adicionado em 50 µL de cada amostra. Após 30 minutos, a reação foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico 1 M e a absorbância foi lida a 490 nm em leitor de microplacas (Spectramax 190, Molecular Devices, Silicon Valley, EUA).

4.5.4 Dosagem de quimiocinas e citocinas no sobrenadante de homogenato de tecido pulmonar

As amostras de sobrenadante de homogenato de tecido pulmonar não foram diluídas para dosagem das quimiocinas CCL5 e CCL20 e das citocinas TSLP, IL-25, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ e IL-10 e foram diluídas na proporção 1:4 para dosagem da quimiocina CCL11 e da citocina IL-33 e na proporção 1:8 para dosagem da citocina TGF- β . Foram utilizados os kits de ELISA da R&D Diagnostics (Minneapolis, EUA) para quantificar as quimiocinas CCL5, CCL11 e CCL20 e as citocinas TSLP, IL-13, IL-25 e IL-33 e os kits de ELISA BD OptEIA (BD Biosciences, San Jose, EUA) para quantificar as citocinas IL-4, IL-5, IFN- γ , TGF- β e IL-10, de acordo com as instruções do fabricante. Para a dosagem de quimiocinas e 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. 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 em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e a reação foi revelada pela adição do substrato. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1 M e a leitura foi feita em leitor de microplacas (Spectramax 190, Molecular Devices, Silicon Valley, EUA) a 450 nm. As concentrações de quimiocinas e citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações das quimiocinas e citocinas recombinantes.

4.5.5 Dosagem sérica de anticorpos IgE, IgG1 e IgG2a anti-OVA

A avaliação da produção dos isotipos IgE, IgG1 e IgG2a específicos anti-OVA foi realizada através de ELISA. Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o antígeno OVA (Grade V; Sigma-Aldrich Corp, St Louis, EUA) a 10 µg/mL em tampão carbonato e permaneceram incubando por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com PBST, bloqueadas com PBST com 10% soro fetal bovino e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. A seguir, as placas foram novamente lavadas, as amostras de soro foram adicionadas, nas concentrações de 1:20 para IgE, 1:3000 para IgG1 e 1:100 para IgG2a e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas, os anticorpos anti-IgE, anti-IgG1 e anti-IgG2a biotinizados (Pharmingen™, Becton Dickinson, San Diego, EUA) foram adicionados e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. A seguir as placas foram lavadas e a estreptavidina marcada com peroxidase (Pharmingen™, Becton Dickinson, San Diego, EUA) foi adicionada e incubada por 30 minutos. Após as lavagens a reação foi revelada pela adição do substrato contendo ácido cítrico 0,1 M, citrato de sódio 0,1 M, água destilada, cromógeno OPD e água oxigenada 30%. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 1 M e a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 492 nm. A detecção dos anticorpos específicos foi quantificada como densidade

óptica (DO) em leitor de microplacas (Spectramax 190, Molecular Devices, Silicon Valley, EUA).

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). As variáveis numéricas foram avaliadas pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para distribuição gaussiana dos dados e posteriormente, foi utilizado o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparação múltipla. O nível de significância admitido para os testes foi de $p < 0,05$. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

5 RESULTADOS

5.1 Perfil cromatográfico por CLAE do extrato aquoso de *E. grandiflorus*, de suas frações metanólica e residual e do ácido ferúlico

As amostras de extrato aquoso de *E. grandiflorus*, das frações metanólica e residual e do ácido ferúlico foram analisadas por CLAE a 220, 270, 335 e 360 nm e a melhor resolução foi obtida a 335 nm. Nesse comprimento de onda, foi detectado um maior número de substâncias no EAEg (22 substâncias), seguido pela FM (14 substâncias) e por último pela FR (6 substâncias). Em todas as amostras analisadas foram identificadas 2 substâncias majoritárias, sendo a principal (maior sinal no cromatograma) detectada a 20,4 minutos de corrida cromatográfica, tendo atingido 39,7% do total de substâncias no EAEg, 43,5% na FM e 55,4% na FR. A segunda substância majoritária foi detectada a 9,6 minutos de corrida cromatográfica, tendo atingido, 20,9% do total de substâncias no EAEg, 17,6% na FM e 27,6% na FR. Através do espectro em UV, ambas as substâncias majoritárias foram identificadas como prováveis arilpropanoides, uma importante classe de ácidos fenólicos. Entretanto, as mesmas não foram isoladas, purificadas e identificadas (Figuras 7A, 7B e 7C). Já o ácido ferúlico padrão foi detectado a 17,3 minutos de corrida cromatográfica (Figura 7D) e não foi detectado nas amostras de EAEg, FM e FR. As análises em cromatografia em camada delgada confirmaram as análises realizadas por CLAE (dados não apresentados).

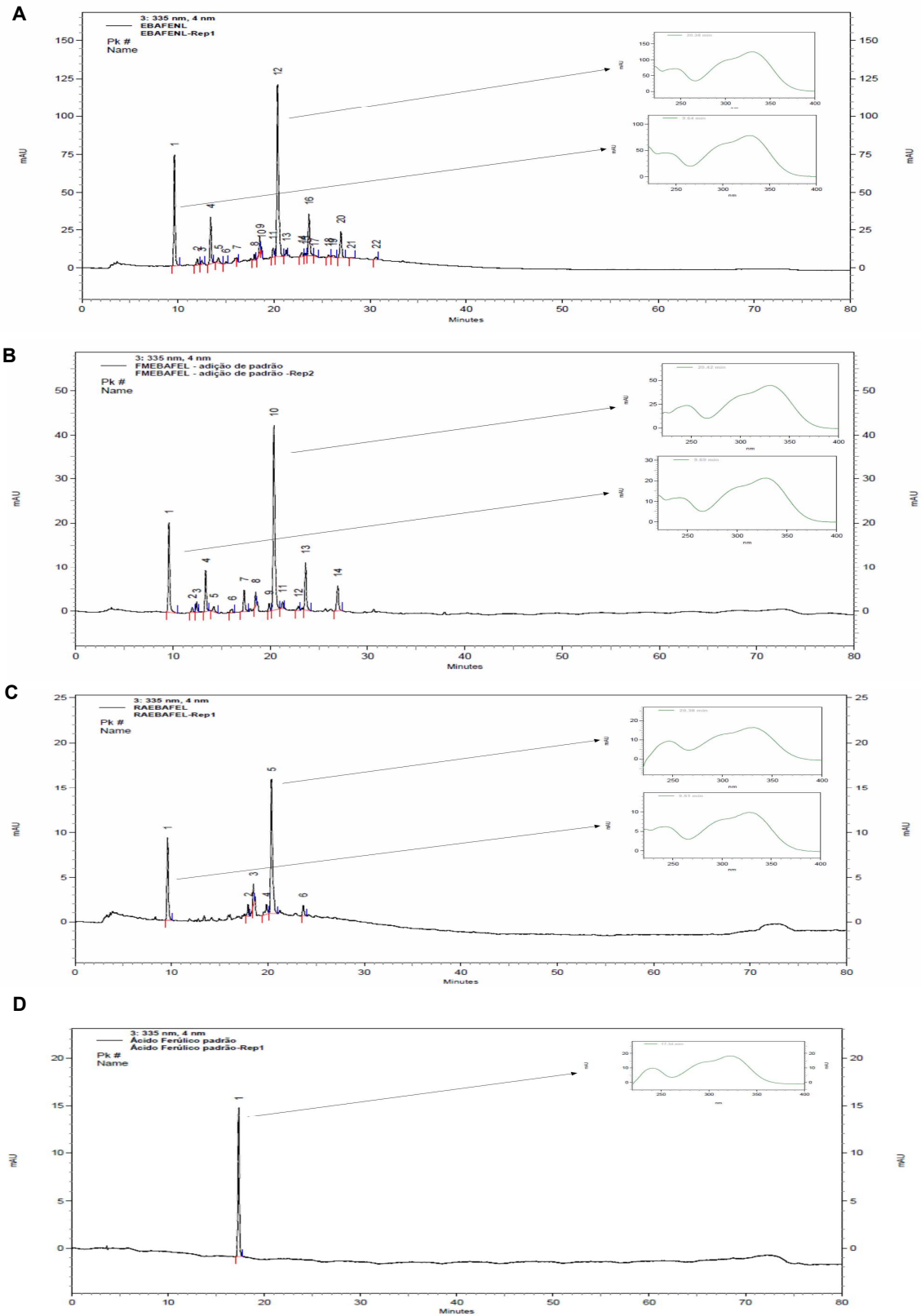


Figura 7. Análises por CLAE a 335 nm do (A) extrato aquoso de *E. grandiflorus* (EAEg), (B) fração metanólica (FM), (C) fração residual (FR) e (D) ácido ferúlico (AF). Em destaque o espectro em ultravioleta dos componentes majoritários das amostras (tempo de retenção 20,4 min e 9,6 min) ou do ácido ferúlico (tempo de retenção de 17,3 min).

Sabe-se que o ácido ferúlico é um dos componentes de *E. grandiflorus*, (PIMENTA, 2002, LUNARDI et al., 2014), entretanto, o mesmo não foi identificado no EAEg e nas frações neste trabalho. Apesar disso, optou-se por avaliar os efeitos desse ácido fenólico no modelo murino de alergia pulmonar, considerando que, entre os ácidos fenólicos identificados em *E. grandiflorus*, o ácido ferúlico era o de menor custo e de mais fácil aquisição no mercado. Sendo assim, para uma melhor compreensão dos resultados obtidos sobre a resposta imune no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA, os mesmos serão apresentados didaticamente em duas partes: na primeira parte serão descritos os resultados dos tratamentos realizados com o EAEg e suas frações metanólica e residual, na segunda parte serão apresentados os resultados do tratamento com o ácido ferúlico.

5.2 Efeito da administração oral do EAEg e das FM e FR sobre a alergia pulmonar induzida por OVA

5.2.1 Efeito da administração oral do EAEg e das FM e FR sobre a inflamação pulmonar e a produção de muco

Pela avaliação semiquantitativa dos cortes histológicos dos pulmões corados com HE, 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 e peribronquiolar, sendo atribuído escore médio 3,8 para este grupo (Figuras 9B e 10B). Já os animais do grupo controle apresentaram características histológicas compatíveis com a normalidade, sendo atribuído escore médio 0,1 para este grupo (Figuras 9A e 10A). Nos animais com alergia pulmonar, o tratamento com dexametasona reduziu o infiltrado inflamatório em relação ao grupo AP, sendo observado discreto infiltrado inflamatório, com escore médio de 0,3 atribuído para este grupo (Figuras 9C e 10C). Em relação aos demais tratamentos, apenas o EAEg

na dose de 25 mg/kg (Figuras 9D e 10D), a FM nas doses de 25 mg/kg (Figuras 9E e 10E) e 50 mg/kg e a FR na dose de 100 mg/kg (Figuras 9F e 10F) foram capazes de reduzir o infiltrado inflamatório em relação ao grupo AP, sendo atribuídos escores de 2,5, 1,4, 2,4 e 1,7 para estes grupos, respectivamente (Figura 8). Considerando esta avaliação inicial do infiltrado celular inflamatório, optou-se por apresentar para os demais parâmetros avaliados neste trabalho, apenas o grupo que apresentou resposta mais significativa para cada uma das substâncias testadas, embora todos os parâmetros tenham sido avaliados em todos os grupos. Nas Figuras 9 e 10, é possível observar o perfil inflamatório no parênquima pulmonar dos grupos selecionados corados com HE nos aumentos de 200 e 400 vezes, respectivamente.

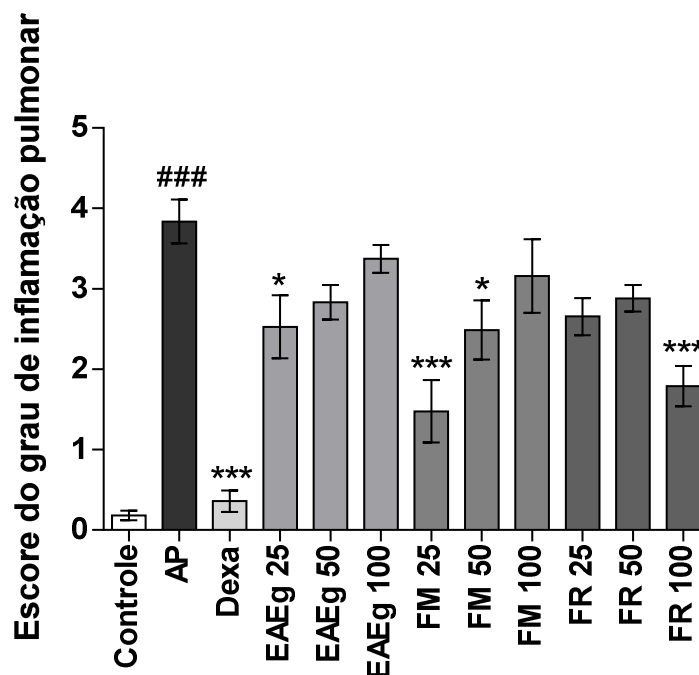


Figura 8. Escore do grau de inflamação pulmonar após tratamento com o extrato e frações. As áreas peribronquiolares e perivasculares das lâminas coradas com HE foram avaliadas de maneira semiquantitativa de acordo com o grau de infiltrado celular inflamatório. Barras representam a média \pm EPM. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. EAEg, Extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus*. FM, Fração metanólica. FR, Fração residual insolúvel em metanol. ### p < 0,001 versus controle, * p < 0,05 versus AP, *** p < 0,001 versus AP.

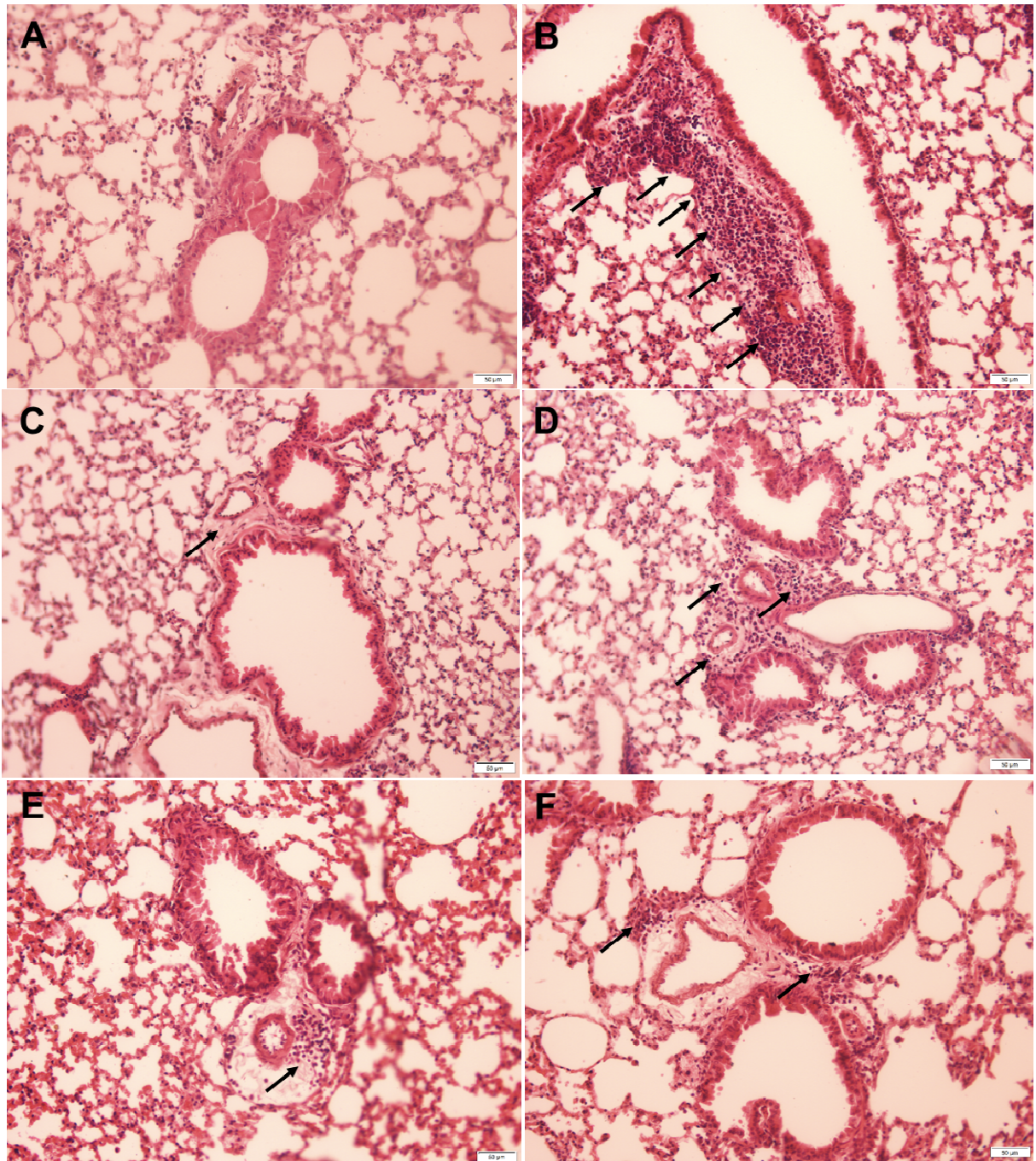


Figura 9. Perfil inflamatório no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com o extrato e frações, coloração com HE, aumento original 200X, barras representam 50 µm. (A) Controle, (B) AP, (C) Dexa, (D) EAEg 25, (E) FM 25 e (F) FR 100. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. EAEg, Extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus*. FM, Fração metanólica. FR, Fração residual insolúvel em metanol. As setas indicam o infiltrado inflamatório no tecido pulmonar.

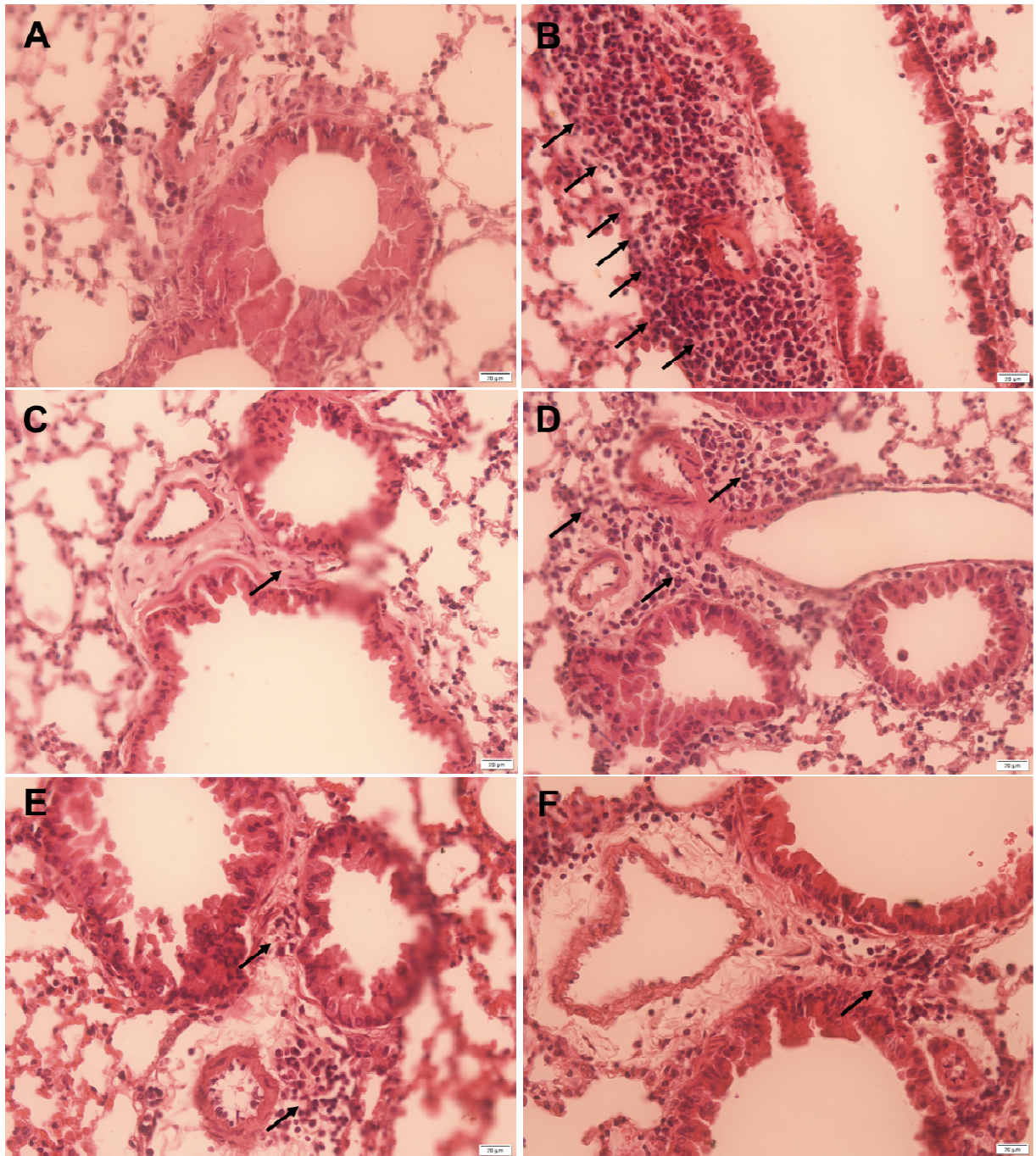


Figura 10. Perfil inflamatório no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com o extrato e frações, coloração com HE, aumento original 400X, barras representam 20 µm. (A) Controle, (B) AP, (C) Dexa, (D) EAEg 25, (E) FM 25 e (F) FR 100. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. EAEg, Extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus*. FM, Fração metanólica. FR, Fração residual insolúvel em metanol. As setas indicam o infiltrado inflamatório no tecido pulmonar.

Nos cortes histológicos corados com PAS foi observado aumento significativo na produção de muco pelas células caliciformes nos animais do grupo AP, quando comparados com os animais do grupo controle. Nos animais com alergia pulmonar, o tratamento com dexametasona, EAEg (25 mg/kg), FM (25 mg/kg) ou FR (100 mg/kg), reduziram significativamente a produção de muco pelas células caliciformes (Figura 11). Nas Figuras 12 e 13 é possível observar a produção de muco no parênquima pulmonar dos grupos estudados nos aumentos de 200 e 400 vezes, respectivamente.

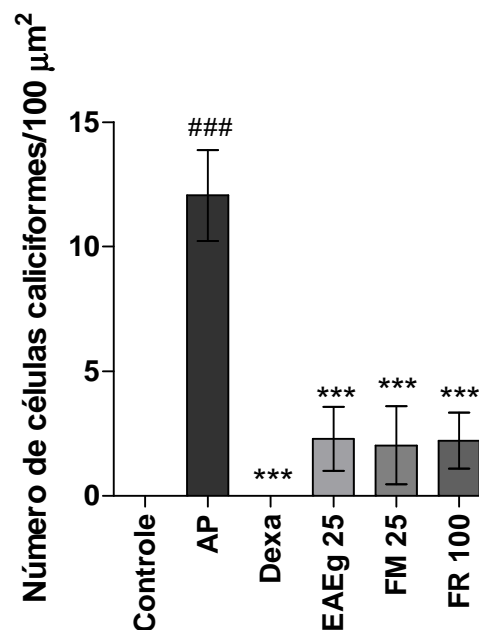


Figura 11. Número de células caliciformes/100 μm^2 após tratamento com o extrato e frações. As células PAS positivas foram contadas em áreas de 100 μm^2 de tecido pulmonar, em aumento de 400X. Barras representam a média \pm EPM. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. EAEg, Extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus*. FM, Fração metanólica. FR, Fração residual insolúvel em metanol. ### $p < 0,001$ versus controle, *** $p < 0,001$ versus AP.

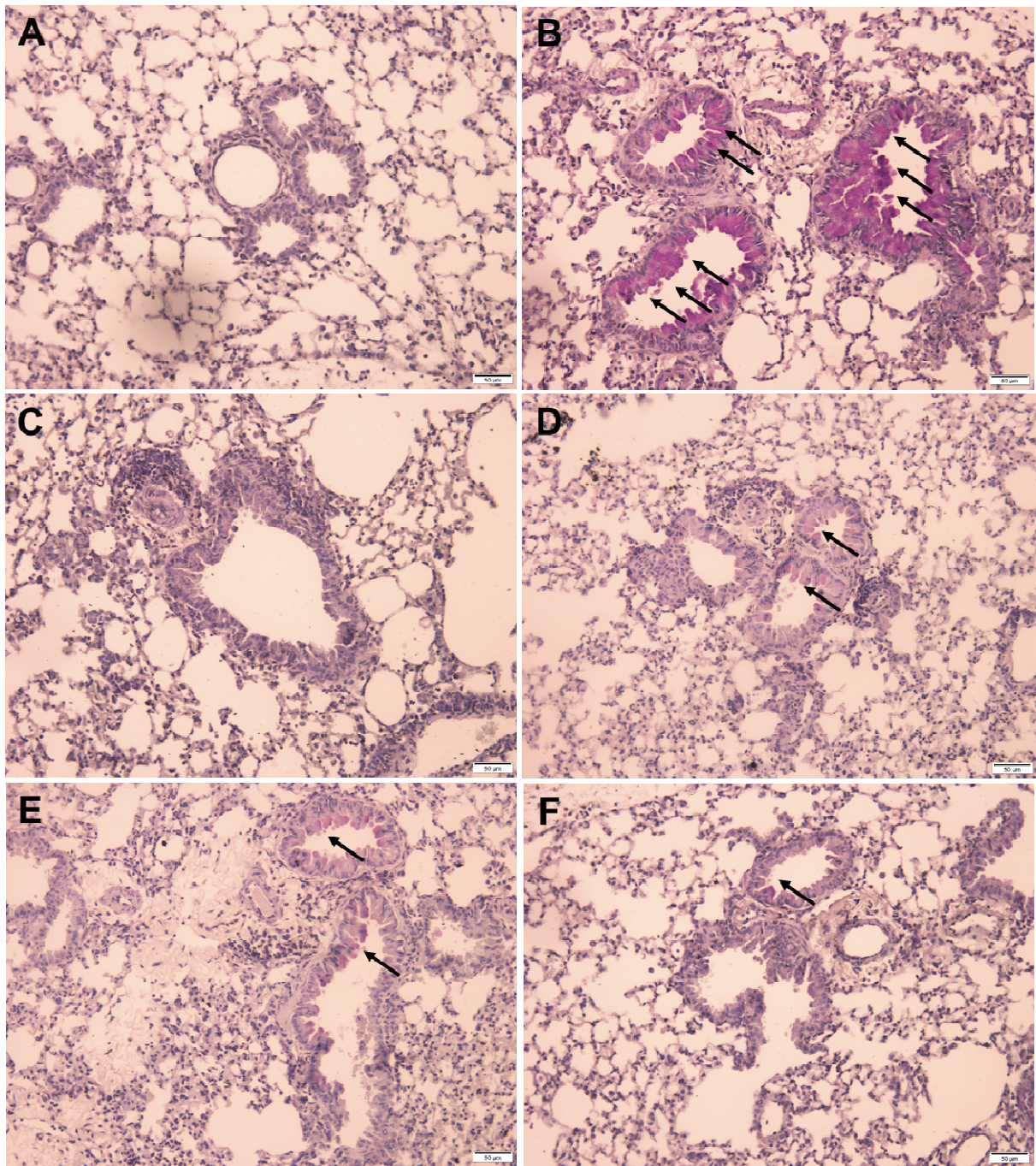


Figura 12. Produção de muco no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com o extrato e frações, coloração com PAS, aumento original 200X, barras representam 50 µm. (A) Controle, (B) AP, (C) Dexa, (D) EAEg 25, (E) FM 25 e (F) FR 100. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. EAEg, Extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus*. FM, Fração metanólica. FR, Fração residual insolúvel em metanol. As setas indicam a produção de muco no tecido pulmonar.

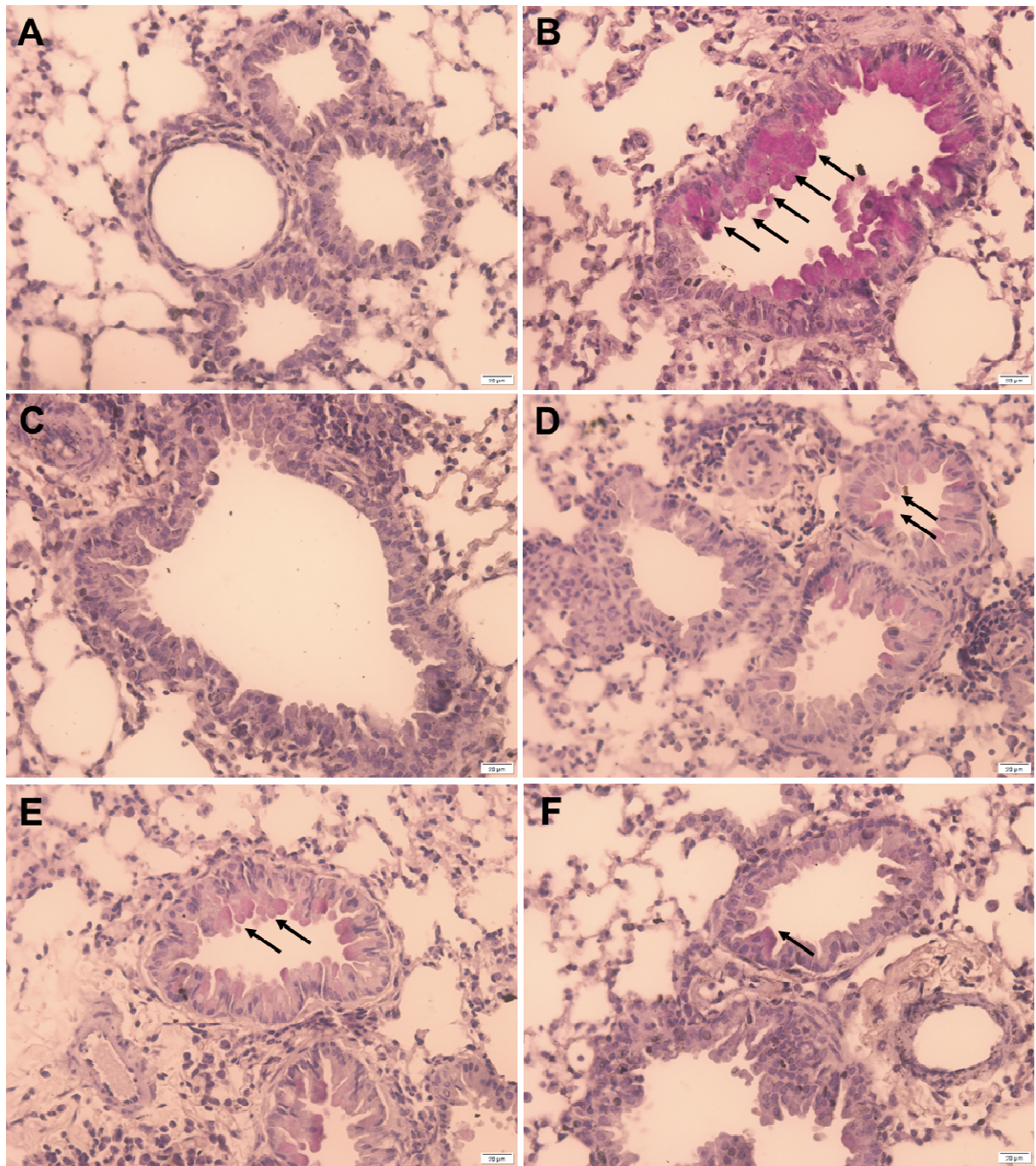


Figura 13. Produção de muco no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com o extrato e frações, coloração com PAS, aumento original 400X, barras representam 20 µm. (A) Controle, (B) AP, (C) Dexa, (D) EAEg 25, (E) FM 25 e (F) FR 100. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. EAEg, Extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus*. FM, Fração metanólica. FR, Fração residual insolúvel em metanol. As setas indicam a produção de muco no tecido pulmonar.

5.2.2 Efeito da administração oral do EAEG e das FM e FR sobre a inflamação das vias aéreas

A contagem de células no LBA demonstrou que a indução do modelo de alergia pulmonar aumentou significativamente o número total de células, eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e macrófagos, quando comparado aos animais do grupo controle (Figura 14).

Nos animais com alergia pulmonar, os tratamentos com dexametasona ou com EAEG (25 mg/kg), FM (25 mg/kg) e FR (100 mg/kg) reduziram significativamente o número total de células no LBA e as subpopulações de eosinófilos, linfócitos e neutrófilos, quando comparado com o grupo AP (Figuras 14A, 14B, 14C e 14D). Em relação à subpopulação de macrófagos houve redução significativa apenas com os tratamentos com dexametasona e FR (100 mg/kg) (Figura 14E).

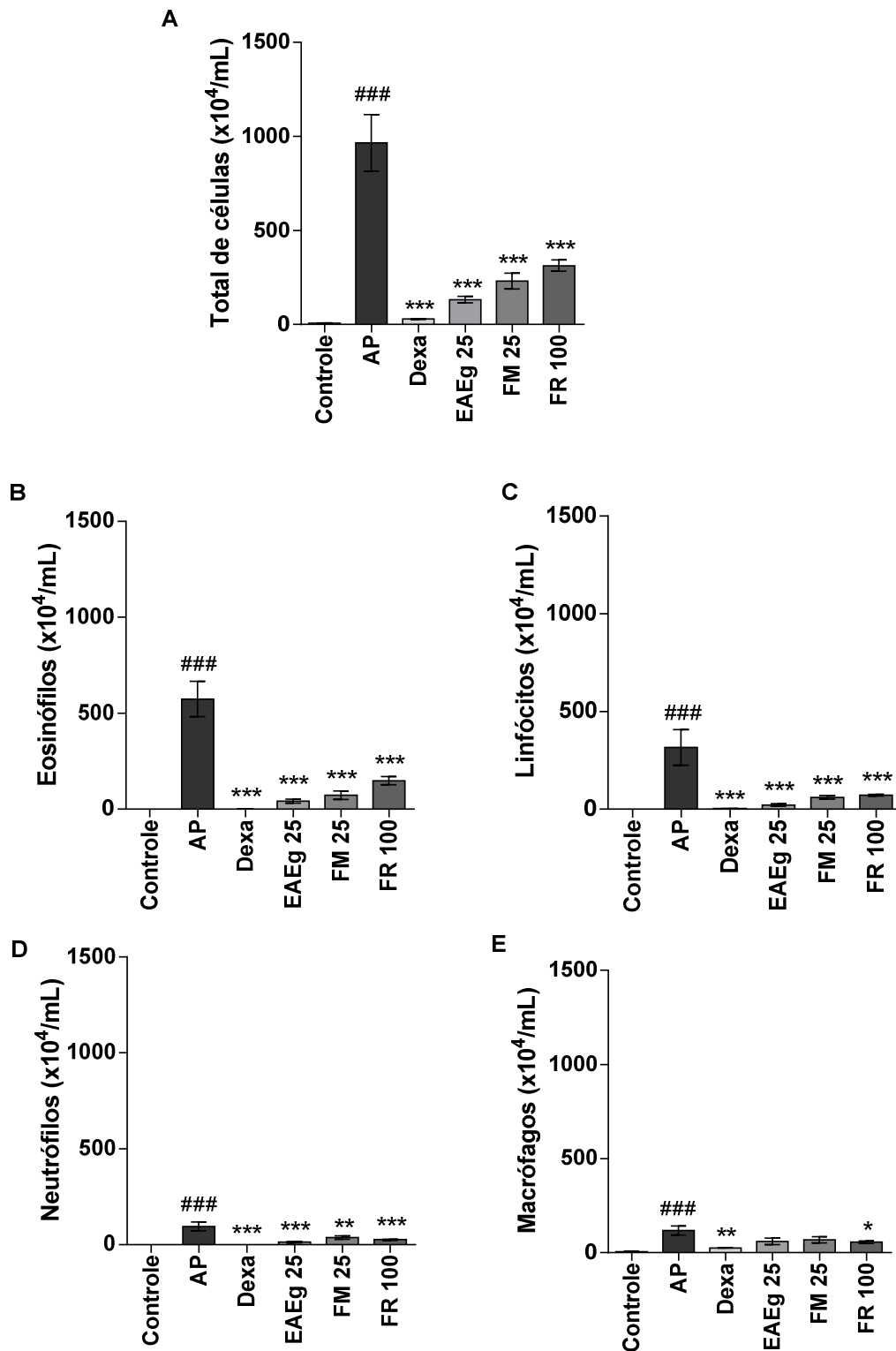


Figura 14. Perfil celular no LBA após tratamento com o extrato e frações. (A) Número total de células, (B) eosinófilos, (C) linfócitos, (D) neutrófilos e (E) macrófagos no LBA ($\times 10^4/\text{mL}$). Barras representam a média \pm EPM. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. EAEg, Extrato aquoso de *Echinodoros grandiflorus*. FM, Fração metanólica. FR, Fração residual insolúvel em metanol. ### $p < 0,001$ versus controle, * $p < 0,05$ versus AP, ** $p < 0,01$ versus AP, *** $p < 0,001$ versus AP.

5.2.3 Efeito da administração oral do EAEg e das FM e FR sobre a atividade da EPO no homogenato de tecido pulmonar

A EPO é uma enzima que está presente em grande quantidade no interior dos grânulos dos eosinófilos, podendo contribuir para a inflamação pulmonar alérgica. Sendo assim, a avaliação de sua atividade foi utilizada como medida indireta da infiltração eosinofílica nos pulmões e os resultados demonstraram que a indução do modelo de alergia pulmonar aumentou significativamente a atividade da EPO, comparado com os animais do grupo controle. Entretanto, nos animais com alergia pulmonar, apenas o tratamento com dexametasona reduziu significativamente a atividade da EPO, quando comparado com o grupo AP (Figura 15).

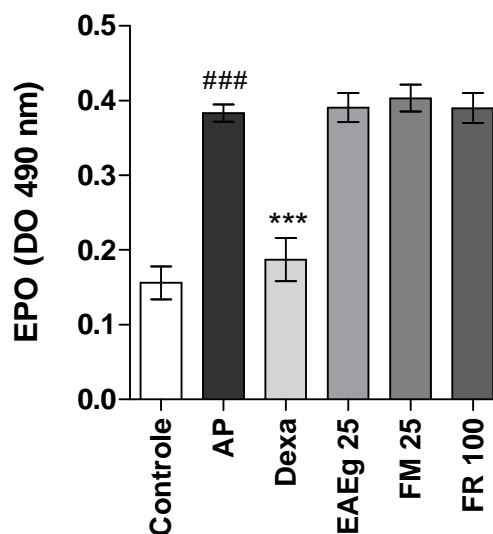


Figura 15. Atividade da EPO no homogenato de tecido pulmonar após tratamento com o extrato e frações (DO 490 nm). Barras representam a média \pm EPM. EPO, peroxidase eosinofílica. DO, Densidade óptica. AP, Alergia pulmonar. Dexta, Dexametasona. EAEg, Extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus*. FM, Fração metanólica. FR, Fração residual insolúvel em metanol. ### $p < 0,001$ versus controle, *** $p < 0,001$ versus AP.

5.2.4 Efeito da administração oral do EAEG e das FM e FR sobre os níveis de quimiocinas no homogenato de tecido pulmonar

Considerando que as quimiocinas CCL20, CCL11 (eotaxina) e CCL5 são mediadoras do recrutamento, respectivamente, de células dendríticas, eosinófilos e linfócitos T, principalmente, a expressão das mesmas foi avaliada no homogenato de tecido pulmonar dos animais estudados. Os resultados demonstraram que houve aumento significativo na produção de CCL20, CCL11 e CCL5 com a indução do modelo de alergia pulmonar, quando comparado com os animais do grupo controle (Figura 16).

Nos animais com alergia pulmonar, os níveis de CCL20 e CCL11 reduziram significativamente com os tratamentos com dexametasona, EAEG (25 mg/kg), FM (25 mg/kg) e FR (100 mg/kg) (Figura 16A e 16B).

Em relação à quimiocina CCL5, os tratamentos com dexametasona, FM (25 mg/kg) e FR (100 mg/kg) diminuíram significativamente a sua produção, quando comparados ao grupo AP, embora o tratamento com EAEG (25 mg/kg) não tenha alterado sua produção (Figura 16C).

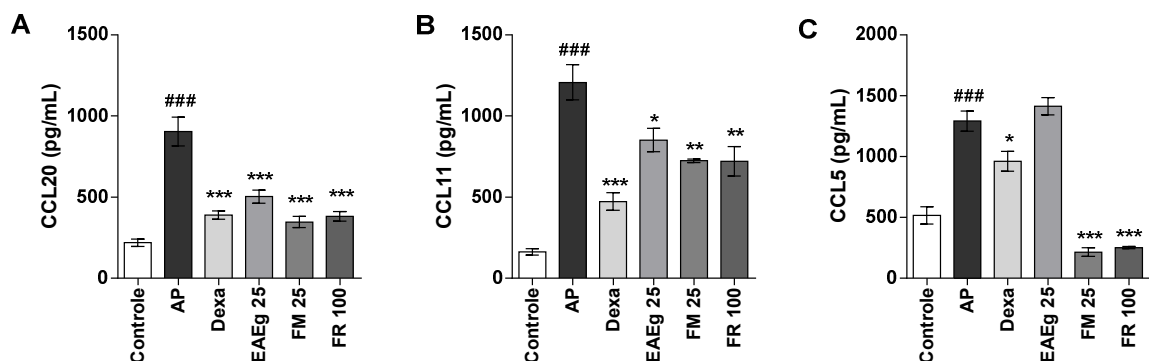


Figura 16. Níveis de quimiocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar após tratamento com o extrato e frações. (A) Níveis de CCL20, (B) CCL11 e (C) CCL5 no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar (pg/mL). AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. EAEG, Extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus*. FM, Fração metanólica. FR, Fração residual insolúvel em metanol. Barras representam a média \pm EPM. ### p < 0,001 versus controle, * p < 0,05 versus AP, ** p < 0,01 versus AP, *** p < 0,001 versus AP.

5.2.5 Efeito da administração oral do EAEg e das FM e FR sobre os níveis de citocinas no homogenato de tecido pulmonar

O desenvolvimento e a modulação da resposta imune são influenciados por vários fatores, entre eles, os níveis e o perfil de citocinas sendo produzidos e liberados localmente, por isso, as citocinas TSLP, IL-25, IL-33, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , TGF- β e IL-10 foram avaliadas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar. Os resultados das dosagens das citocinas liberadas pelas células epiteliais das vias aéreas, demonstraram que a indução do modelo de alergia pulmonar aumentou significativamente os níveis de TSLP, IL-25 e IL-33 e os tratamentos realizados reduziram significativamente os níveis dessas citocinas, exceto para o tratamento com EAEg (25 mg/kg) que não reduziu os níveis de IL-33, quando comparados com os animais do grupo AP (Figuras 17A, 17B e 17C).

A análise dos resultados confirmou a indução de uma resposta imunológica de perfil Th2 no modelo de alergia pulmonar, já que houve aumento significativo nos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 nos animais do grupo AP e os tratamentos realizados reduziram significativamente os níveis dessas citocinas, exceto para o tratamento com EAEg (25 mg/kg) que não reduziu os níveis de IL-13, quando comparados com os animais do grupo AP (Figuras 17D, 17E e 17F).

Com relação à análise de IFN- γ , verificou-se que a indução do modelo de alergia pulmonar aumentou os níveis desta citocina no homogenato de tecido pulmonar e todos os tratamentos realizados reduziram significativamente os seus níveis, quando comparados com os animais do grupo AP (Figura 17G).

Dentre as citocinas relacionadas à atividade reguladora da resposta imune, encontram-se as citocinas TGF- β e IL-10. Os resultados das dosagens dessas citocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar demonstraram que a indução do modelo de alergia pulmonar aumentou significativamente os níveis de TGF- β , que foram significativamente reduzidos com todos os tratamentos avaliados, exceto pela dexametasona, quando comparados com os animais do grupo AP (Figura 17H). Em relação aos níveis da citocina IL-10, a indução do modelo de alergia pulmonar não alterou seus níveis e houve redução significativa apenas com

os tratamentos com as frações, quando comparados com os animais do grupo AP (Figura 17).

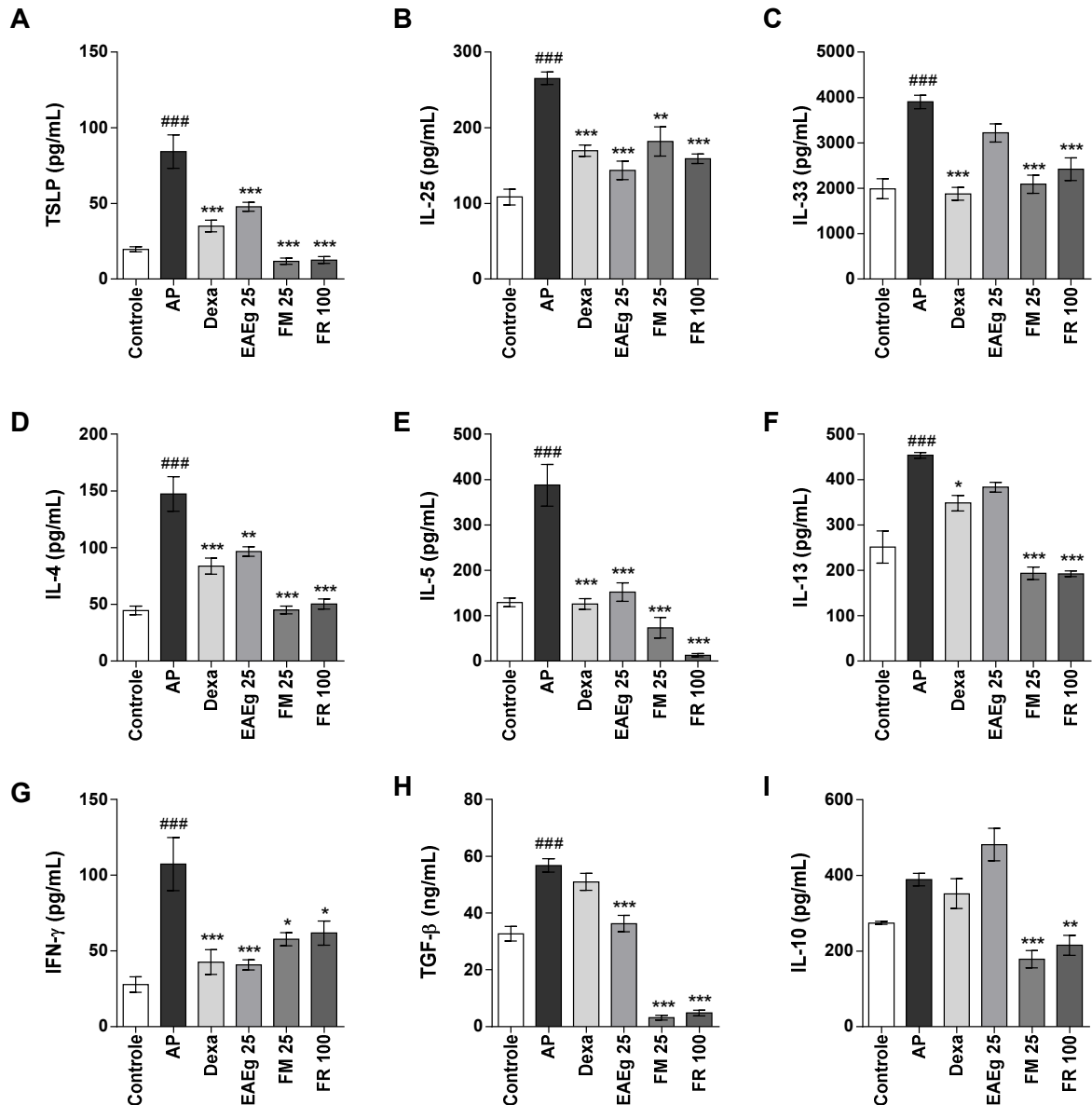


Figura 17. Níveis de citocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar após tratamento com o extrato e frações. (A) Níveis de TSLP (pg/mL), (B) IL-25 (pg/mL), (C) IL-33 (pg/mL), (D) IL-4 (pg/mL), (E) IL-5 (pg/mL), (F) IL-13 (pg/mL), (G) IFN- γ (pg/mL), (H) TGF- β (ng/mL) e (I) IL-10 (pg/mL) no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. EAEG, Extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus*. FM, Fração metanólica. FR, Fração residual insolúvel em metanol. Barras representam a média \pm EPM. ### p < 0,001 versus controle, * p < 0,05 versus AP, ** p < 0,01 versus AP, *** p < 0,001 versus AP.

5.2.6 Efeito da administração oral do EAEg e das FM e FR sobre os níveis séricos de anticorpos específicos anti-OVA

Para avaliar se a administração oral do EAEg e de suas frações seriam capazes de exercer um efeito modulador sistêmico sobre a resposta inflamatória alérgica, os níveis séricos dos isotipos IgE, IgG1 e IgG2a específicos anti-OVA foram analisados. Os resultados demonstraram que a indução do modelo de alergia pulmonar aumentou significativamente esses parâmetros, quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 18). Nos animais com alergia pulmonar, o tratamento com dexametasona não alterou os níveis dos anticorpos específicos anti-OVA avaliados (Figura 18), enquanto o tratamento com o EAEg (25 mg/kg) reduziu apenas os níveis séricos de IgE, quando comparados com o grupo AP (Figura 18A). Os tratamentos com FM (25 mg/kg) e FR (100 mg/kg) reduziram apenas os níveis séricos de IgG1, isotipo relacionado ao perfil Th2 de resposta imune, quando comparados com os animais do grupo AP (Figura 18B). Quanto aos níveis séricos de IgG2a, isotipo relacionado ao perfil Th1, estes não foram alterados por nenhum dos tratamentos avaliados, quando comparados com os animais do grupo AP (Figura 18C).

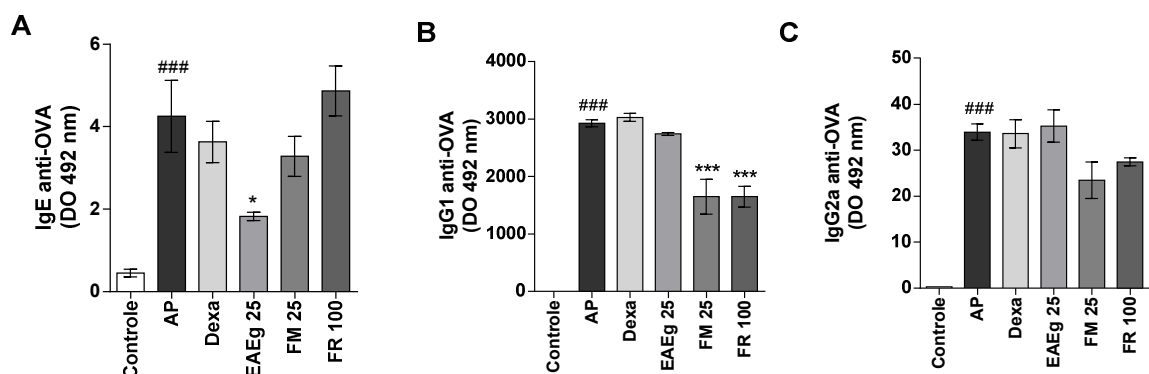


Figura 18. Níveis séricos de (A) IgE (1:20), (B) IgG1 (1:3000) e (C) IgG2a (1:100) específicas anti-OVA após tratamento com o extrato e frações. DO, Densidade óptica. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. EAEg, Extrato aquoso de *Echinodorus grandiflorus*. FM, Fração metanólica. FR, Fração residual insolúvel em metanol. Barras representam a média \pm EPM. ### $p < 0,001$ versus controle, * $p < 0,05$ versus AP, *** $p < 0,001$ versus AP.

5.3 Efeito da administração oral do ácido ferúlico sobre a alergia pulmonar induzida por OVA

5.3.1 Efeito da administração oral do ácido ferúlico sobre a inflamação pulmonar e a produção de muco

Nos cortes histológicos corados com HE, foi observado, pela avaliação semiquantitativa, aumento significativo na quantidade de células infiltradas no tecido pulmonar dos animais do grupo AP (escore médio 3,8, Figuras 20B e 21B) quando comparados com os animais do grupo controle (escore médio 0,1, Figuras 20A e 21A). Nos animais com alergia pulmonar, tanto o tratamento com dexametasona (escore médio 0,3, Figuras 20C e 21C), quanto os tratamentos com o AF nas doses de 25 mg/kg (escore médio 1,3, Figuras 20D e 21D), 50 mg/kg (escore médio 2,0, Figuras 20E e 21E) e 100 mg/kg (escore médio 1,2, Figuras 20F e 21F) reduziram significativamente o infiltrado inflamatório em relação ao grupo AP (Figura 19). Nas Figuras 20 e 21 é possível observar o perfil inflamatório no parênquima pulmonar dos grupos estudados nos aumentos de 200 e 400 vezes, respectivamente.

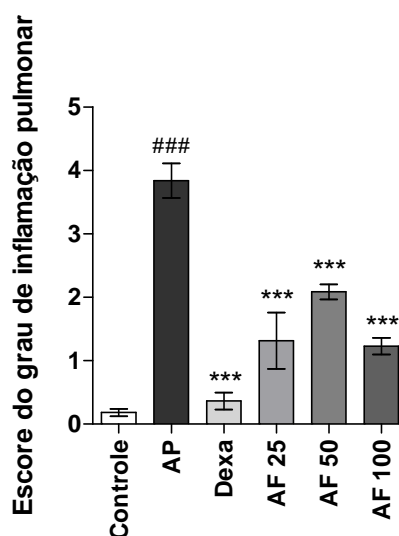


Figura 19. Escore do grau de inflamação pulmonar após tratamento com ácido ferúlico. As áreas peribronquiolares e perivasculares das lâminas coradas com HE foram avaliadas de maneira semiquantitativa de acordo com o grau de infiltrado celular inflamatório. Barras representam a média \pm EPM. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. AF, Ácido ferúlico. ### $p < 0,001$ versus controle, *** $p < 0,001$ versus AP.

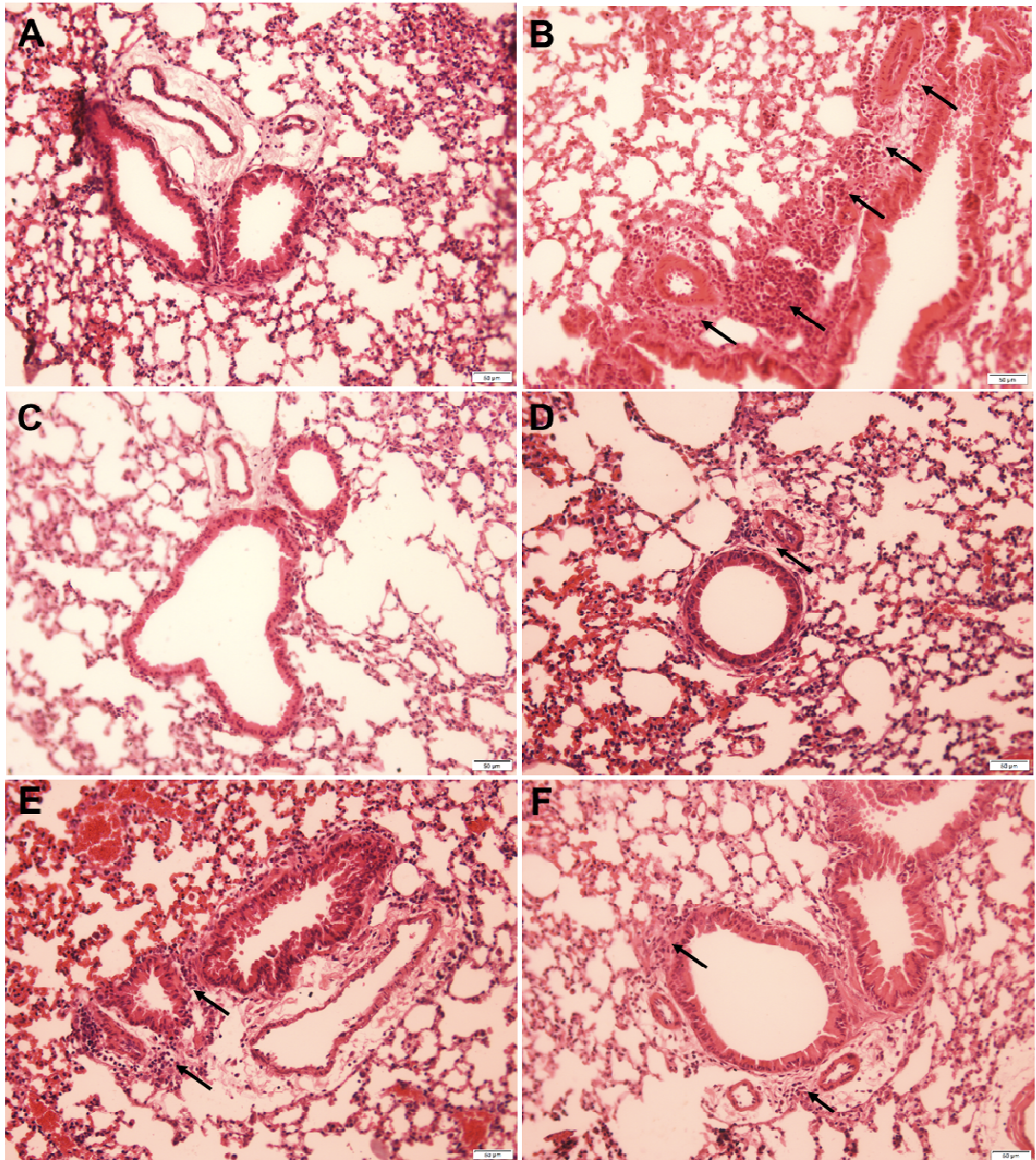


Figura 20. Perfil inflamatório no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com ácido ferúlico, coloração com HE, aumento original 200X, barras representam 50 µm. (A) Controle, (B) AP, (C) Dexa, (D) AF 25, (E) AF 50 e (F) AF 100. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. AF, Ácido ferúlico. As setas indicam o infiltrado inflamatório no tecido pulmonar.

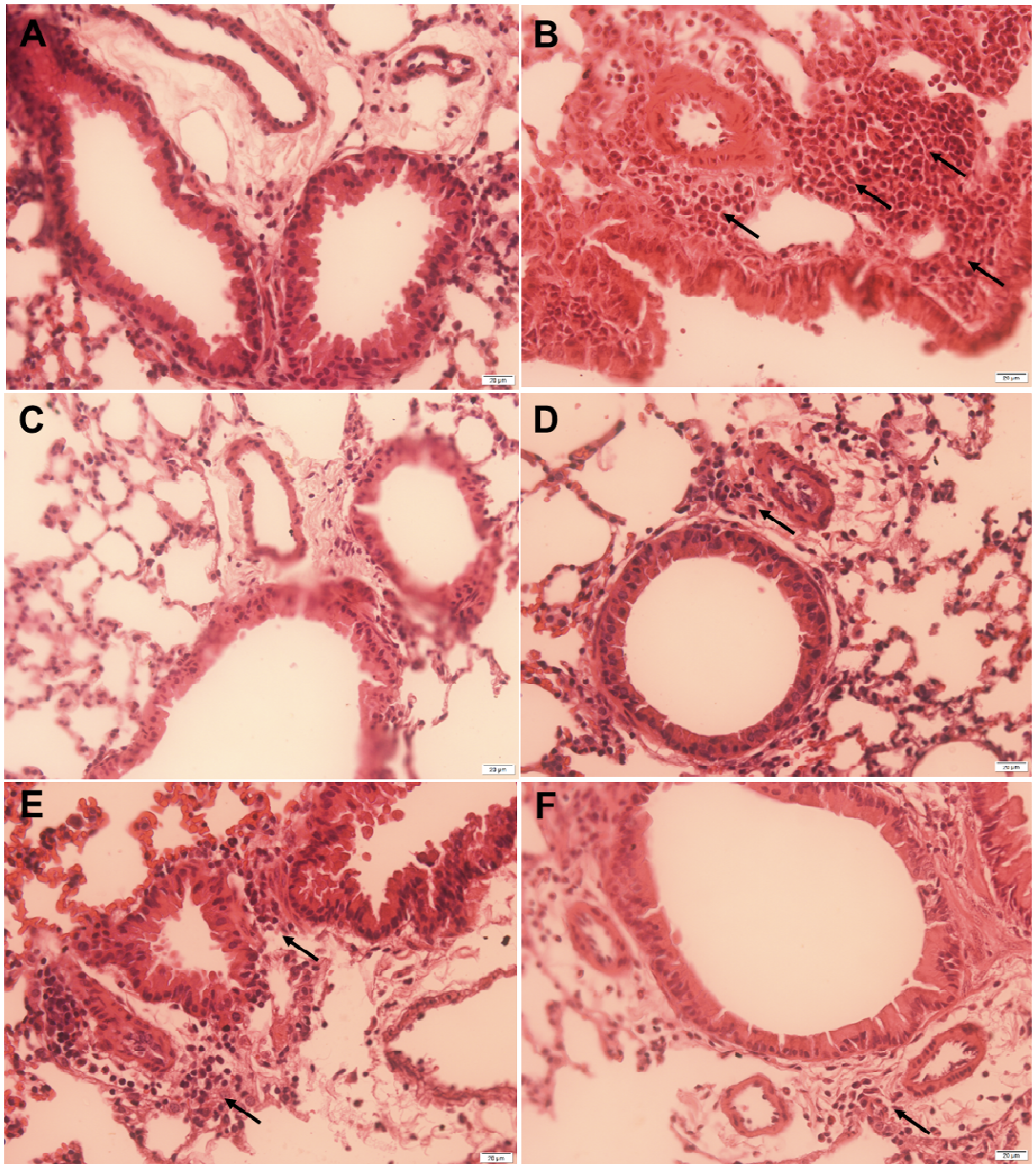


Figura 21. Perfil inflamatório no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com ácido ferúlico, coloração com HE, aumento original 400X, barras representam 20 μm . (A) Controle, (B) AP, (C) Dexa, (D) AF 25, (E) AF 50 e (F) AF 100. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. AF, Ácido ferúlico. As setas indicam o infiltrado inflamatório no tecido pulmonar.

Nos cortes histológicos corados com PAS, foi observado aumento significativo na produção de muco pelas células caliciformes nos animais do grupo AP, quando comparados com os animais do grupo controle. Nos animais com alergia pulmonar, o tratamento com dexametasona e com AF, nas três doses avaliadas, reduziram significativamente a produção de muco pelas células caliciformes (Figura 22). Nas Figuras 23 e 24 é possível observar a produção de muco no parênquima pulmonar dos grupos estudados nos aumentos de 200 e 400 vezes, respectivamente.

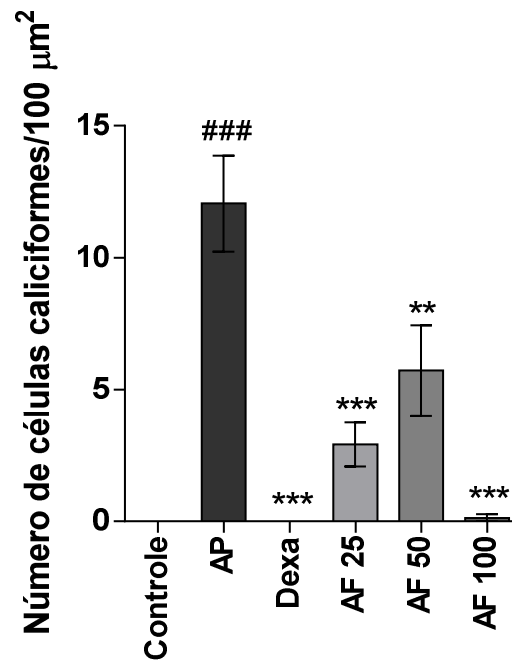


Figura 22. Número de células caliciformes/100 μm^2 após tratamento com ácido ferúlico. As células PAS positivas foram contadas em áreas de 100 μm^2 de tecido pulmonar, em aumento de 400X. Barras representam a média \pm EPM. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. AF, Ácido ferúlico. ### $p < 0,001$ versus controle, * $p < 0,05$ versus AP, ** $p < 0,01$ versus AP. *** $p < 0,001$ versus AP.

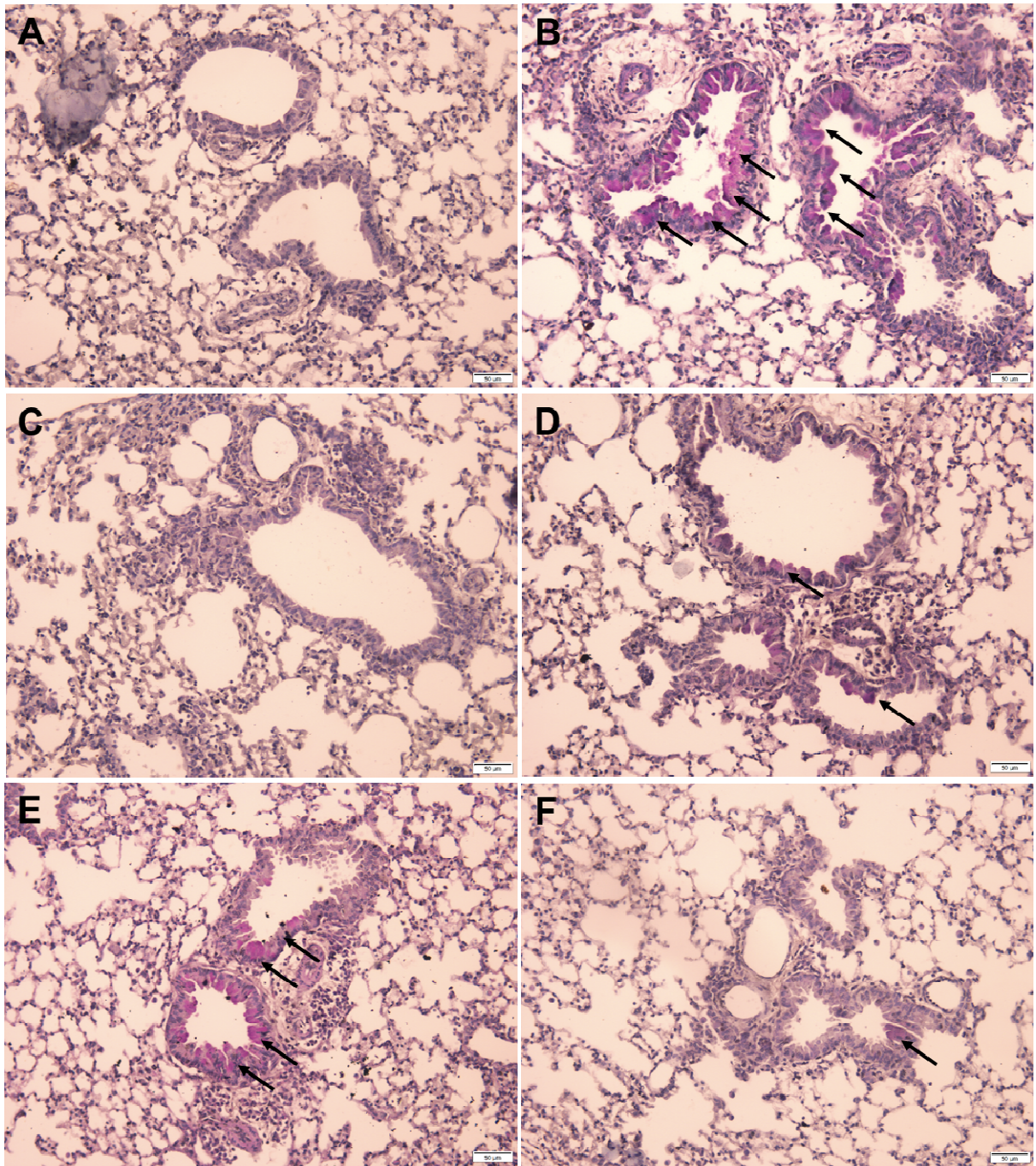


Figura 23. Produção de muco no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com ácido ferúlico, coloração com PAS, aumento original 200X, barras representam 50 µm. (A) Controle, (B) AP, (C) Dexa, (D) AF 25, (E) AF 50 e (F) AF 100. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. AF, Ácido ferúlico. As setas indicam a produção de muco no tecido pulmonar.

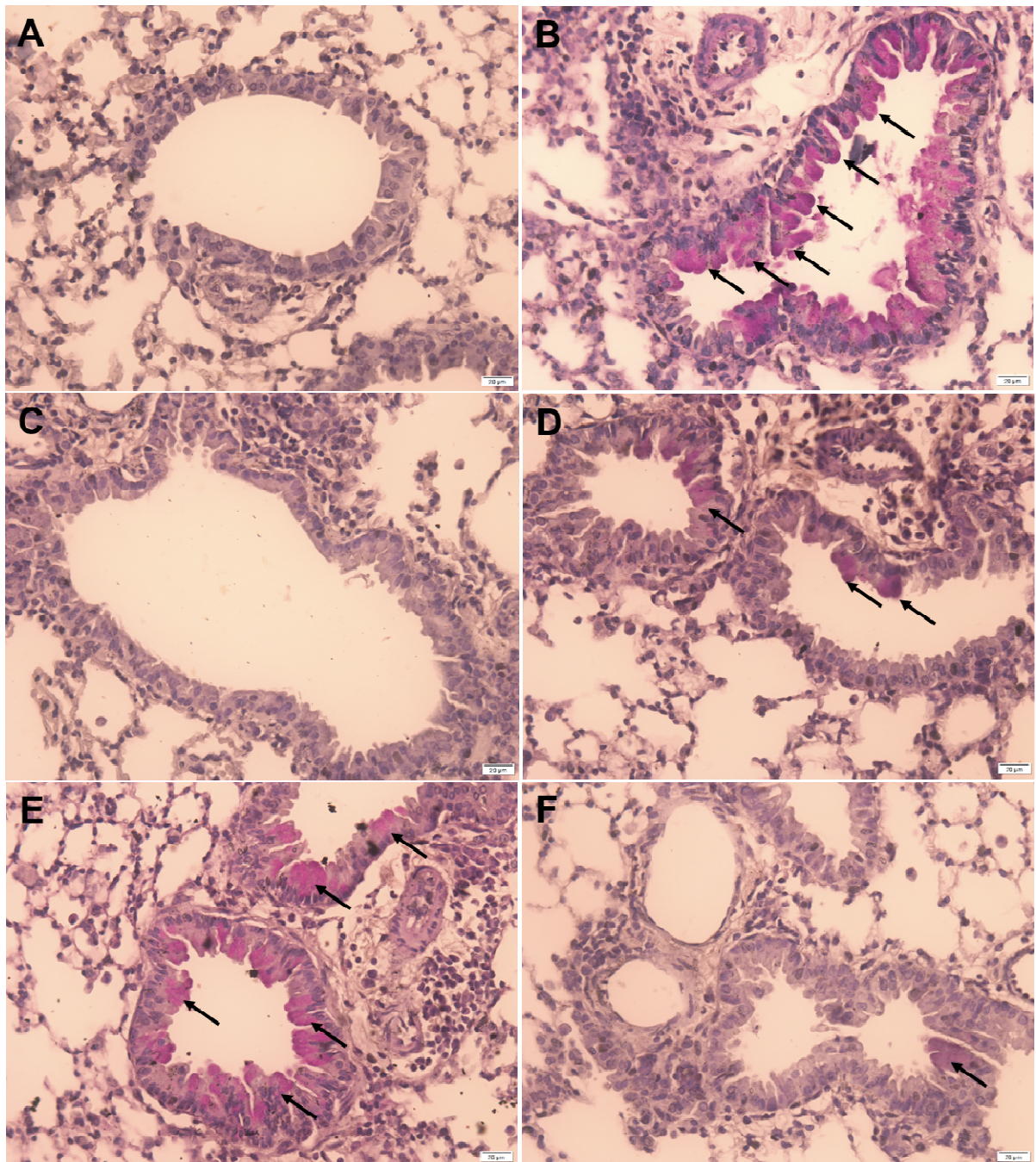


Figura 24. Produção de muco no parênquima pulmonar dos grupos estudados após tratamento com ácido ferúlico, coloração com PAS, aumento original 400X, barras representam 20 μm . (A) Controle, (B) AP, (C) Dexa, (D) AF 25, (E) AF 50 e (F) AF 100. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. AF, Ácido ferúlico. As setas indicam a produção de muco no tecido pulmonar.

5.3.2 Efeito da administração oral do ácido ferúlico sobre a inflamação das vias aéreas

A indução do modelo de alergia pulmonar aumentou significativamente o número total de células, eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e macrófagos no LBA, quando comparado ao grupo controle. Nos animais com alergia pulmonar, os tratamentos com dexametasona ou com AF, nas três doses avaliadas, reduziram significativamente o número total de células no LBA e as subpopulações de eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e macrófagos, quando comparado com o grupo AP (Figura 25).

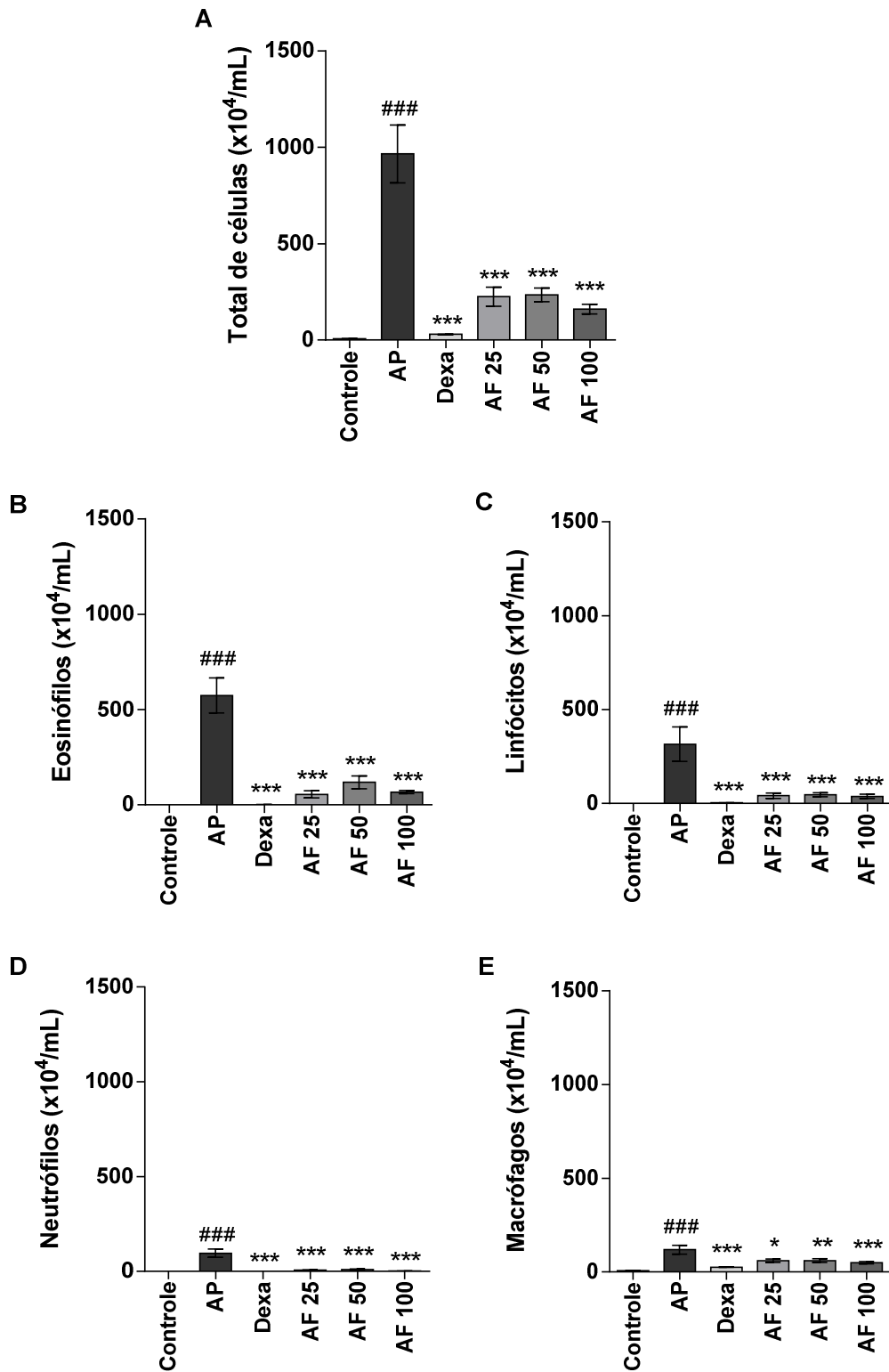


Figura 25. Perfil celular no LBA após tratamento com ácido ferúlico. (A) Número total de células, (B) eosinófilos, (C) linfócitos, (D) neutrófilos e (E) macrófagos no LBA ($\times 10^4/\text{mL}$). Barras representam a média \pm EPM. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. AF, Ácido ferúlico. ### $p < 0,001$ versus controle, * $p < 0,05$ versus AP, ** $p < 0,01$ versus AP, *** $p < 0,001$ versus AP.

5.3.3 Efeito da administração oral do ácido ferúlico sobre a atividade da EPO no homogenato de tecido pulmonar

A atividade da EPO aumentou significativamente com a indução do modelo de alergia pulmonar, quando comparado com o grupo controle. Nos animais com alergia pulmonar, apenas o tratamento com dexametasona reduziu significativamente a atividade da EPO, quando comparado com o grupo AP (Figura 26).

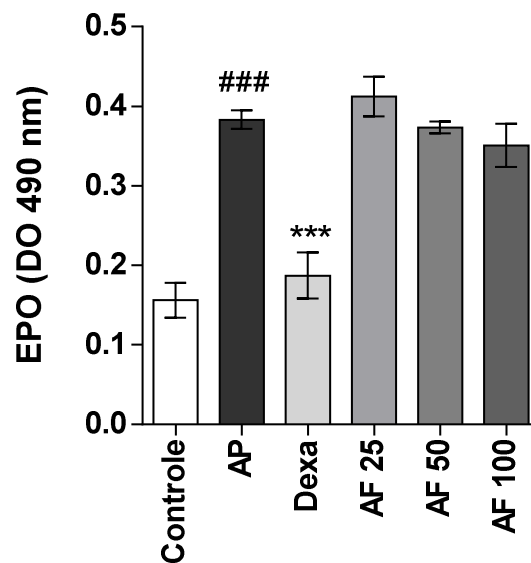


Figura 26. Atividade da EPO no homogenato de tecido pulmonar após tratamento com ácido ferúlico (DO 490 nm). Barras representam a média \pm EPM. EPO, peroxidase eosinofílica. DO, Densidade óptica. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. AF, Ácido ferúlico. ### $p < 0,001$ versus controle, *** $p < 0,001$ versus AP.

5.3.4 Efeito da administração oral do ácido ferúlico sobre os níveis de quimiocinas no homogenato de tecido pulmonar

A dosagem dos níveis de quimiocinas no homogenato de tecido pulmonar demonstrou aumento significativo na produção de CCL20, CCL11 e CCL5 com a indução do modelo de alergia pulmonar, quando comparado com o grupo controle. Nos animais com alergia pulmonar, os níveis das quimiocinas CCL20, CCL11 e CCL5 reduziram significativamente com os tratamentos com dexametasona e com AF, nas três doses avaliadas (Figura 27).

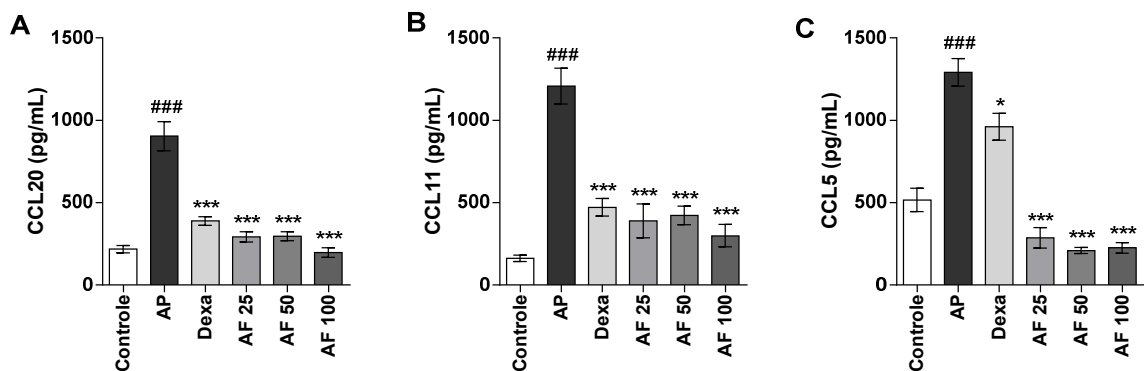


Figura 27. Níveis de quimiocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar após tratamento com ácido ferúlico. (A) Níveis de CCL20, (B) CCL11 e (C) CCL5 no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar (pg/mL). AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. AF, Ácido ferúlico. Barras representam a média \pm EPM. ### $p < 0,001$ versus controle, * $p < 0,05$ versus AP, *** $p < 0,001$ versus AP.

5.3.5 Efeito da administração oral do ácido ferúlico sobre os níveis de citocinas no homogenato de tecido pulmonar

Os níveis de citocinas produzidos e liberados localmente foram avaliados no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar e foram observados aumentos

nos níveis de TSLP, IL-25, IL-33, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , TGF- β e IL-10 com a indução do modelo de alergia pulmonar, quando comparados ao grupo controle. Os tratamentos com dexametasona e com AF, nas três doses avaliadas, reduziram os níveis de todas as citocinas, exceto para IL-10 e TGF- β , que não foram alteradas pelo tratamento com a dexametasona, quando comparados ao grupo AP (Figura 28).

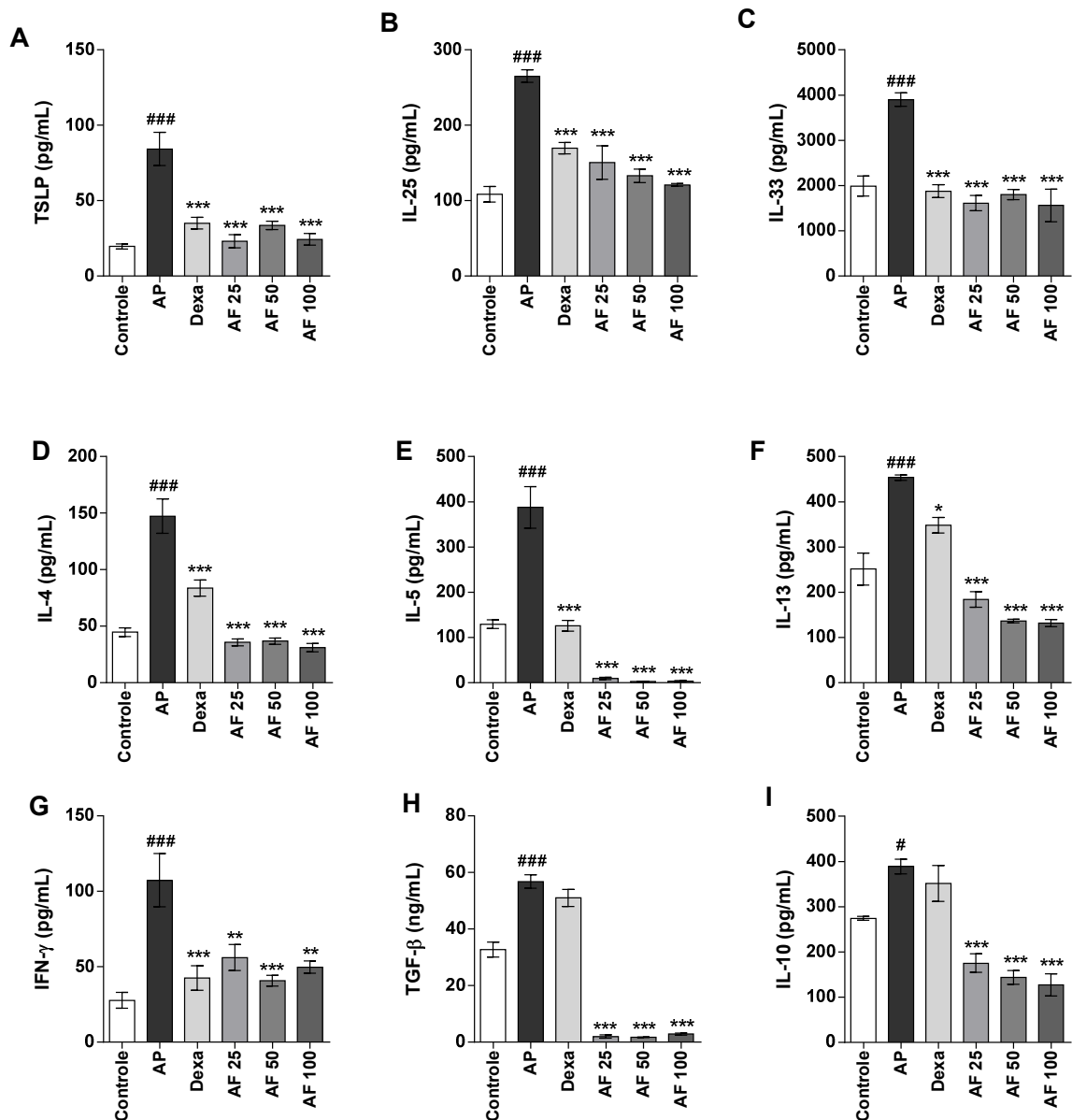


Figura 28. Níveis de citocinas no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar após tratamento com ácido ferúlico. (A) Níveis de TSLP (pg/mL), (B) IL-25 (pg/mL), (C) IL-33 (pg/mL), (D) IL-4 (pg/mL), (E) IL-5 (pg/mL), (F) IL-13 (pg/mL), (G) IFN- γ (pg/mL), (H) TGF- β (ng/mL) e (I) IL-10 (pg/mL) no sobrenadante do homogenato de tecido pulmonar. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. AF, Ácido ferúlico. Barras representam a média \pm EPM. # $p < 0,05$ versus controle, ### $p < 0,001$ versus controle, * $p < 0,05$ versus AP, ** $p < 0,01$ versus AP, *** $p < 0,001$ versus AP.

5.3.6 Efeito da administração oral do ácido ferúlico sobre os níveis séricos de anticorpos específicos anti-OVA

Os níveis séricos dos isotipos IgE, IgG1 e IgG2a específicos anti-OVA foram analisados e os resultados demonstraram aumentos com a indução do modelo de alergia pulmonar, quando comparados aos animais do grupo controle. Nos animais com alergia pulmonar, o tratamento com dexametasona não alterou os níveis dos anticorpos anti-OVA avaliados, quando comparados com o grupo AP (Figura 29).

Já o tratamento com o AF reduziu os níveis de IgE e IgG1 anti-OVA no soro nas três doses avaliadas, quando comparados com os animais do grupo AP (Figuras 29A e 29B). Quanto aos níveis séricos de IgG2a, estes não foram alterados pelo tratamento com o AF, quando comparados com os animais do grupo AP (Figura 29C).

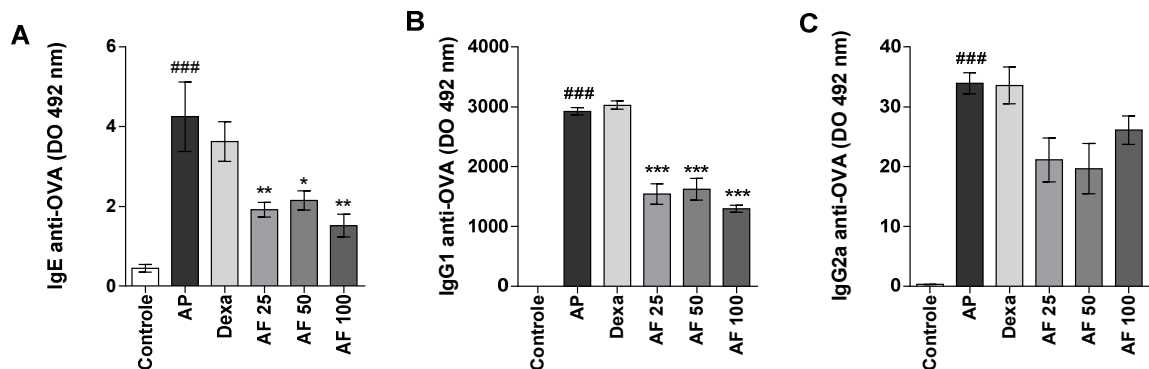


Figura 29. Níveis séricos de (A) IgE (1:20), (B) IgG1 (1:3000) e (C) IgG2a (1:100) específicas anti-OVA após tratamento com ácido ferúlico. DO, Densidade óptica. AP, Alergia pulmonar. Dexa, Dexametasona. AF, Ácido ferúlico. Barras representam a média \pm EPM. ### $p < 0,001$ versus controle, * $p < 0,05$ versus AP, ** $p < 0,01$ versus AP, *** $p < 0,001$ versus AP.

5.4 Comparação entre os efeitos da administração oral da fração metanólica do extrato aquoso de *E. grandiflorus* e do ácido ferúlico sobre a alergia pulmonar induzida por OVA

Com base nos resultados obtidos, merecem destaque os tratamentos com a fração metanólica do extrato aquoso de *E. grandiflorus* e com o ácido ferúlico, ambos na dose de 25 mg/kg, que apresentaram melhores efeitos utilizando doses mais baixas. Considerando esses resultados, foi realizada a análise comparativa entre estes grupos para os principais parâmetros associados a resposta imune no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA e que foram aumentados no grupo AP, quando comparado ao grupo controle. Os tratamentos com a fração metanólica na dose de 25 mg/kg e com o ácido ferúlico na dose de 25 mg/kg reduziram significativamente a quantidade de células infiltradas no tecido pulmonar nos cortes histológicos corados com HE (Figura 30A), a produção de muco pelas células caliciformes nos cortes histológicos corados com PAS (Figura 30B) e o número total de células, eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e macrófagos no LBA (Figura 31). Adicionalmente, não foram observadas diferenças significativas entre estes grupos de tratamento para os parâmetros avaliados.

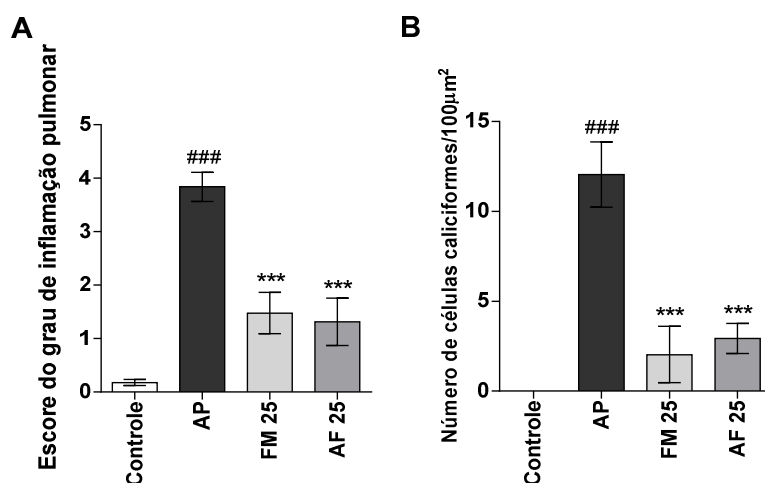


Figura 30. (A) Escore do grau de inflamação pulmonar e (B) número de células caliciformes/100 μm^2 após tratamento com fração metanólica e ácido ferúlico. As áreas peribronquiolares e perivasculares das lâminas coradas com HE foram avaliadas de maneira semiquantitativa de acordo com o grau de infiltrado celular inflamatório. As células PAS positivas foram contadas em áreas de 100 μm^2 de tecido pulmonar, em aumento de 400X. Barras representam a média \pm EPM. AP, Alergia pulmonar. FM, Fração metanólica. AF, Ácido ferúlico. ### p < 0,001 versus controle, *** p < 0,001 versus AP.

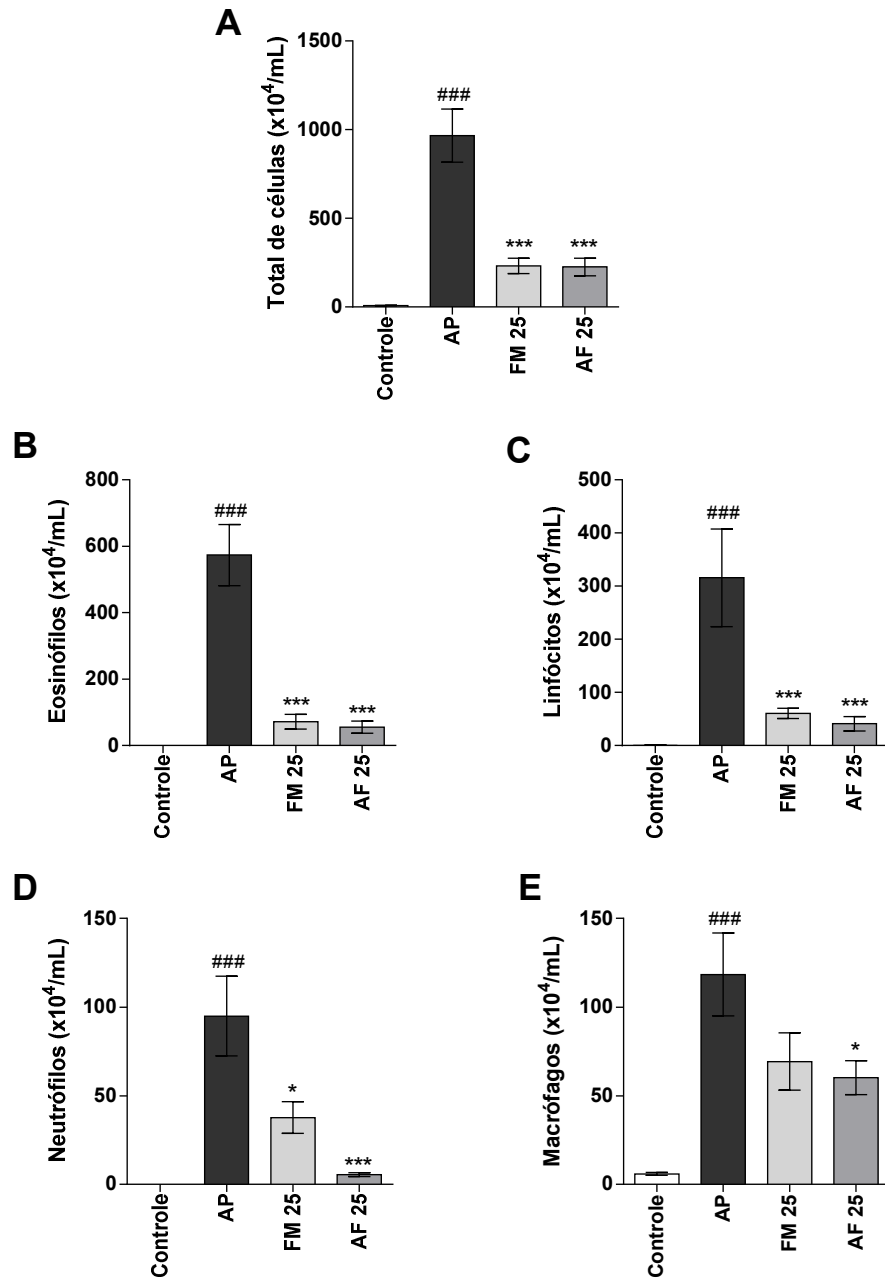


Figura 31. Perfil celular no LBA após tratamento com fração metanólica e ácido ferúlico. (A) Número total de células, (B) eosinófilos, (C) linfócitos, (D) neutrófilos e (E) macrófagos no LBA ($\times 10^4/\text{mL}$). Barras representam a média \pm EPM. AP, Alergia pulmonar. Dexametasona. FM, Fração metanólica. AF, Ácido ferúlico. ^{###} $p < 0,001$ versus controle, ^{*} $p < 0,05$ versus AP, ^{***} $p < 0,001$ versus AP.

6 DISCUSSÃO

O modelo de alergia pulmonar induzida por OVA, utilizado no presente trabalho, foi capaz de mimetizar as principais características da asma alérgica humana, sendo a avaliação histopatológica do parênquima pulmonar e das vias aéreas 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). Neste trabalho foram observados intenso infiltrado inflamatório perivascular e peribronquiolar, aumento do número de células calciformes, da atividade da EPO no tecido pulmonar, dos níveis séricos de IgE específica anti-OVA e do número de eosinófilos no LBA, sendo o modelo, portanto, caracterizado como eosinofílico, uma vez que essas células representaram aproximadamente 60% do total de células no LBA.

Adicionalmente, foram observados neste trabalho, com a indução do modelo de alergia pulmonar, aumento dos níveis das quimiocinas CCL20, CCL11 e CCL5 que participam ativamente do desenvolvimento e manutenção das respostas alérgicas (revisado por ROLLINS, 1997; revisado por HOLGATE, 2012). Em relação às citocinas, foram observados aumentos nos níveis de TSLP, IL-25 e IL-33 liberadas pelas células epiteliais das vias aéreas e que interagem com as células efetoras, favorecendo a manutenção da resposta Th2 de maneira crônica (revisado por HOLGATE, 2012), além de aumentos dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13, características das respostas imunes na alergia pulmonar com predominância de linfócitos Th2 (VIEIRA et al., 2007).

No que diz respeito às imunoglobulinas, já foi demonstrado que indivíduos alérgicos apresentam, além dos níveis séricos elevados de IgE, níveis séricos elevados de IgG e o tipo de resposta observada, se patogênica ou protetora, é influenciada pelo isotipo de IgG e pela sua ligação preferencial a receptores Fcγ de ativação ou de inibição (BANDUKWALA et al., 2007). Sabe-se que a citocina IL-4 promove a produção de IgE e IgG1, enquanto a citocina IFN-γ induz a produção de IgG2a (LEE et al., 2015). Neste trabalho, os níveis séricos de IgG1 específica anti-OVA encontraram-se elevados nos animais alérgicos e já foi demonstrado que a ligação desse isotipo aos receptores de baixa afinidade para a porção Fc de IgG

(Fc γ RIII), presentes principalmente na superfície de células dendríticas, promove a diferenciação de linfócitos Th2 e está relacionada ao desenvolvimento de sintomas alérgicos (BANDUKWALA et al., 2007). Quanto aos níveis séricos de IgG2a específica anti-OVA, isotipo relacionado ao perfil Th1 de resposta imune, também se encontraram elevados nos animais alérgicos, o que se correlacionou ao aumento dos níveis de IFN- γ observados. Embora a resposta alérgica seja predominantemente de células Th2, esses resultados já foram observados anteriormente no modelo de alergia pulmonar (GOUVEIA et al., 2013).

Também foi observada a manutenção dos níveis de IL-10 e elevação nos níveis de TGF- β nos animais alérgicos, o mesmo tendo sido observado em outros trabalhos (PACÍFICO et al., 2009; GOUVEIA et al., 2013). Sabe-se que a IL-10 tem um papel regulador bem estabelecido nas doenças alérgicas, enquanto o TGF- β apresenta um papel paradoxal que precisa ser melhor compreendido, apresentando tanto propriedades reguladoras, quanto podendo contribuir para o remodelamento e fibrose relacionadas a patogênese da asma (revisado por PALOMARES et al., 2014).

Neste estudo, a dexametasona, glicocorticoide sintético muito utilizado no tratamento da asma (JUNGSUWADEE et al., 2004), foi usado como controle positivo no modelo murino de inflamação pulmonar e esse tratamento reduziu significativamente todos os parâmetros relacionados à inflamação pulmonar alérgica, conforme já descrito por diversos autores (JUNGSUWADEE et al., 2004; HERBERT et al., 2008; ROGERIO et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2008; MEDEIROS et al., 2009). Entretanto, o tratamento com dexametasona no presente estudo, não alterou os níveis das citocinas IL-10 e TGF- β no homogenato de tecido pulmonar e os níveis séricos de IgE, IgG1 e IgG2a. No estudo de Ma e colaboradores (2013) o tratamento com dexametasona foi realizado por gavagem por 7 dias consecutivos na dose de 2 mg/kg e foi observado aumento nos níveis de IL-10 no LBA. Wei e colaboradores (2015) realizaram o tratamento oral com dexametasona na dose de 1 mg/kg por 8 semanas e observaram aumento nos níveis de IL-10 e redução nos níveis de TGF- β no LBA. No trabalho de Herbert e colaboradores (2008) o tratamento foi realizado por via oral na dose de 1 mg/kg por 14 dias consecutivos e foi observada redução da expressão de RNAm de IL-10, enquanto a expressão de RNAm de TGF- β nas vias aéreas não foi alterada. No estudo de Jungsuwadee e colaboradores (2004) foram realizados tratamentos com dexametasona inalada ou por injeção intraperitoneal na

dose de 1 mg/kg, duas vezes por dia por 5 dias consecutivos, no trabalho de Vasconcelos e colaboradores (2008) o tratamento foi realizado por via oral na dose de 30 mg/kg por 5 dias consecutivos e no de Medeiros e colaboradores (2009) por injeção subcutânea na dose de 1 mg/kg, por 4 dias consecutivos, sendo observadas reduções da produção de anticorpos. Esses resultados divergentes encontrados podem ter sido influenciados pelas diferenças na indução do modelo experimental, além da dose, do tempo de tratamento e da via de administração da dexametasona utilizada nos diversos trabalhos.

Sabe-se que o efeito anti-inflamatório dos glicocorticoides é fundamental para sua eficácia no tratamento de doenças alérgicas, entretanto, os mesmos apresentam muitos efeitos adversos. Seria desejável, portanto, identificar substâncias com efeitos semelhantes aos glicocorticoides, mas com menos efeitos colaterais para o tratamento da asma. Nos últimos anos, grandes esforços têm sido empregados nesse sentido e as plantas medicinais, fármacos derivados de plantas, dietas suplementares e alimentos funcionais têm atraído atenção (AZADMEHR et al., 2013; BAE et al., 2012; JEON et al., 2014). Sendo assim, após a indução e caracterização do modelo de alergia pulmonar e da avaliação da dexametasona como um bom controle positivo, foi iniciada a avaliação referente à administração oral do extrato aquoso de *E. grandiflorus*, de suas frações metanólica e residual e do ácido ferúlico no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA.

Baseados nos resultados promissores obtidos anteriormente por nosso grupo (BRUGIOLO et al., 2011) ao testar o extrato aquoso de *E. grandiflorus* no modelo de alergia pulmonar, optou-se por fracionar o mesmo, a partir de sua ressolubilização com metanol, objetivando retirar substâncias relativamente menos polares de um extrato muito polar, para possibilitar a seleção de substâncias farmacologicamente ativas. Sendo assim, esperava-se que os ácidos fenólicos e os flavonoides, substâncias com atividades antioxidante e anti-inflamatória amplamente descritas na literatura e que tem maior polaridade (revisado por DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004), ficassem retidos na fração metanólica, enquanto substâncias menos polares e sem ação farmacológica ficassem retidas na fração insolúvel em metanol. Entretanto, o fracionamento do extrato aquoso não foi satisfatório e foram identificadas duas substâncias majoritárias, cuja análise do espectro em UV sugere que sejam arilpropanoides, uma importante classe de ácidos fenólicos, com os mesmos tempos de retenção na corrida cromatográfica, tanto no

extrato aquoso, quanto nas frações, sendo que a presença dessa classe de substâncias já foi demonstrada para *E. grandiflorus* (PIMENTA, 2002; BRUGIOLO et al., 2010).

Apesar de Pimenta (2002) ter identificado o ácido ferúlico em fração do extrato aquoso de *E. grandiflorus*, o mesmo não ocorreu no presente trabalho, uma vez que o ácido ferúlico padrão não foi detectado nem no extrato aquoso nem nas frações analisadas. Este fato pode ser explicado, em parte, pela época de coleta da planta, sendo realizada em novembro de 2010 neste estudo e em setembro de 1997 no estudo de Pimenta (2002). Sabe-se que as variações climáticas podem influenciar a presença e a quantidade de substâncias detectadas na planta, sendo as mesmas susceptíveis a oscilação em relação aos fatores ambientais, podendo chegar inclusive a sua não detecção em determinadas condições (PIMENTA, 2002). Sabe-se também que o ácido ferúlico pode estar presente nas plantas tanto na sua forma livre, quanto ligado covalentemente à lignina, polissacarídeos, glicoproteínas, poliaminas e ácidos graxos (revisado por GRAF, 1992; revisado por ZHAO e MOGHADASI, 2008; revisado por MANCUSO e SANTANGELO, 2014), o que tornaria seu tempo de retenção na corrida cromatográfica diferente do ácido ferúlico padrão. Em estudo recente utilizando CLAE preparativa, foi possível excluir exclusivamente o ácido ferúlico dos extratos de *Angelicae sinensis*, *Ligusticum chuanxiong* e sua combinação e comprovar que este ácido ferúlico foi um dos principais constituintes responsáveis pela ação antioxidante dos extratos avaliados e proporcionou uma abordagem confiável e eficaz para esclarecer a contribuição de uma mesma substância em diferentes extratos (WANG et al., 2015b). Considerando que o papel de uma mesma substância pode ser diferente em diferentes ambientes químicos, a utilização de CLAE preparativa pode contribuir para a caracterização do extrato e das frações de *E. grandiflorus*.

Apesar disso, os resultados obtidos mostraram-se promissores e tanto os tratamentos com o extrato aquoso e suas frações metanólica e residual, quanto com o ácido ferúlico reduziram a resposta imune patogênica alérgica com resultados semelhantes aos resultados obtidos com o tratamento com dexametasona para a maioria dos parâmetros avaliados. A migração de células inflamatórias para os pulmões e vias aéreas, principalmente eosinófilos, e a produção de muco são aspectos característicos da asma que contribuem significativamente para o desenvolvimento da doença e para a limitação do fluxo expiratório (GALLI, TSAI e

PILIPONSKY, 2008). Estas características patogênicas são bem documentadas em modelos de alergia pulmonar induzida por OVA e a melhora destes parâmetros está relacionada com a eficácia terapêutica, os quais são resultados esperados de uma terapia promissora (BAE et al., 2012; WANG et al., 2014). Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os efeitos anti-inflamatórios descritos tanto para *E. grandiflorus* (PIMENTA, 2002; CARDOSO, PEREIRA, LAINETTI, 2003; DUTRA et al., 2006; GARCIA et al., 2010; BRUGIOLO et al., 2011; CAMPANA et al., 2015), quanto para o ácido ferúlico (OU e KWOK, 2004; SRINIVASAN, SUDHEER e MENON, 2007). Associado a isso e, considerando que as células do infiltrado inflamatório perivascular e peribrônquico no epitélio e no tecido submucoso são as principais responsáveis pelo dano ao tecido pulmonar quando comparadas as células infiltradas nas vias aéreas (JUNGSUWADEE et al., 2004), é possível sugerir que a eficácia terapêutica deve ser avaliada principalmente pelo efeito no infiltrado inflamatório pulmonar. Sendo assim, neste trabalho foram apresentados os grupos cujas dosagens obtiveram melhores respostas em relação ao infiltrado inflamatório no tecido pulmonar para o extrato aquoso (25 mg/kg) e para as frações metanólica (25 mg/kg) e residual (100 mg/kg).

Quanto à atividade de EPO no tecido pulmonar, seus níveis não foram alterados por nenhum dos tratamentos avaliados, embora tenham sido observadas reduções nos níveis de IL-5 e CCL11 no tecido pulmonar e no número de eosinófilos no LBA. Sabe-se que EPO está presente em grandes quantidades em grânulos específicos no interior dos eosinófilos e que essas células degranulam em resposta a estímulos específicos, entretanto, pesquisas tem demonstrado que a exocitose dos grânulos para liberar todo o seu conteúdo de uma vez raramente ocorre *in vivo* (revisado por EGESTEN et al., 2001; revisado por NEVES e WELER, 2009). A degranulação pode ocorrer em resposta a estímulos como a ligação com IgG, e esse processo pode ser potencializado pelas citocinas IL-5 e GM-CSF (revisado por EGESTEN et al., 2001). Considerando que a dosagem da EPO foi realizada após lise celular de acordo com a metodologia empregada neste trabalho (item 4.5.3) é possível sugerir que os tratamentos avaliados tenham, portanto, reduzido a degranulação e a liberação de EPO dos eosinófilos presentes no tecido pulmonar durante a evolução da resposta alérgica, uma vez que o processo inflamatório foi reduzido o que foi associado também a reduções nos níveis de IL-5 e níveis séricos de IgG1.

Sabe-se que 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). Adicionalmente, 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). Além de IgE, o isotipo IgG1 também está relacionado aos sintomas alérgicos e a diferenciação de linfócitos Th2 (BANDUKWALA et al., 2007). Sendo assim, tanto a redução nos níveis de IgE, quanto a redução nos níveis IgG1, são importantes para o controle das respostas alérgicas inflamatórias. Neste trabalho, embora todos os tratamentos tenham reduzido a inflamação pulmonar, os mecanismos subjacentes parecem ser distintos entre eles, uma vez que o extrato aquoso reduziu apenas os níveis de IgE anti-OVA, as frações metanólica e residual reduziram apenas os níveis de IgG1 anti-OVA e o ácido ferúlico reduziu ambos os níveis de IgE e IgG1 anti-OVA. O mesmo resultado já foi observado para a IgE com o tratamento com extrato aquoso (BRUGIOLO et al., 2011) e para a IgE e IgG1 com o tratamento com ácido ferúlico (LEE et al., 2015). Ainda neste contexto, já foi demonstrado que a geração de IgE de alta afinidade ocorre através de uma sequência de troca de isotipos das cadeias das imunoglobulinas, na qual a IgG1 é uma fase intermediária. Em contraste, a IgE de baixa afinidade é gerada através de troca direta de IgM para IgE (XIONG et al., 2012), e este fato corrobora a importância da redução nos níveis séricos de IgE e IgG1, na modulação sistêmica da resposta alérgica.

Na asma, as quimiocinas são secretadas principalmente pelas células epiteliais das vias aéreas e participam diretamente no desenvolvimento e manutenção das respostas alérgicas (revisado por LAMBRECHT e HAMMAD, 2012). Um provável mecanismo envolvido no efeito imunomodulatório de *E. grandiflorus* e do ácido ferúlico pode estar associado com a redução nos níveis de CCL20, CCL11 e CCL5, já que essas quimiocinas recrutam células efectoras importantes na resposta alérgica (revisado por ROLLINS, 1997). É interessante destacar que o extrato aquoso não reduziu os níveis de CCL5, quimioatraente principalmente de linfócitos T de memória. Sabe-se que essas células são responsáveis por uma resposta mais rápida e intensa em exposições posteriores ao mesmo alérgeno (revisado por AVERBECK et al., 2007). Sendo assim, é provável que o pulmão dos animais alérgicos tratados com o extrato aquoso apresente maior número de linfócitos T de

memória, como consequência da presença de níveis mais elevados de CCL5, o que pode ter contribuído para o menor efeito desse extrato sobre a inflamação alérgica.

As células dendríticas, em especial, são ativadas na presença de TSLP, IL-25 e IL-33, liberadas pelas células epiteliais das vias aéreas, e tem um papel fundamental em dirigir e sustentar a resposta alérgica através da indução da expansão e ativação dos linfócitos Th2. Estas citocinas também ativam as ILC2 que, juntamente com os linfócitos Th2, produzem citocinas de perfil Th2 (revisado por HOLGATE, 2012; revisado por DECKERS, MADEIRA e HAMMAD, 2013). Portanto, a inibição de respostas Th2 através da modulação da maturação e função das células dendríticas e ILC2 pode ser considerada uma estratégia promissora para o tratamento da asma. Foi demonstrado recentemente que o tratamento com ácido ferúlico em células dendríticas estimuladas com lipopolissacarídeo induziram a diferenciação de linfócitos Th1 produtores de IFN- γ *in vitro* (LEE et al., 2015). Entretanto, o presente trabalho é o primeiro a demonstrar que os tratamentos avaliados atuam sobre as células epiteliais das vias aéreas, no início da resposta imune após a exposição ao alérgeno, reduzindo os níveis de quimiocinas e citocinas liberadas por essas células. Pode-se sugerir, portanto, que os tratamentos avaliados atuem reduzindo a migração e a ativação das células dendríticas e ILC2, prevenindo assim o desenvolvimento da resposta patogênica, corroborando com os resultados de redução da resposta Th2 no modelo murino de alergia pulmonar obtidos após o tratamento com *E. grandiflorus* (BRUGIOLO et al., 2011) e com o ácido ferúlico (LEE et al., 2015). Apesar desses dados relevantes, a avaliação das células dendríticas pulmonares, incluindo a análise da expressão de moléculas de ativação em sua superfície, é necessária para confirmar se os tratamentos utilizados foram, de fato, capazes de atuar sobre essa população de células, seja reduzindo sua ativação ou mesmo induzindo uma resposta de tolerância ao alérgeno.

De maneira interessante, apenas o tratamento com o extrato aquoso não reduziu os níveis das citocinas IL-33 e IL-13. Este fato talvez possa ser atribuído ao antagonismo entre as substâncias presentes no extrato aquoso, mais abundante em número de componentes detectados pela CLAE, além de menor percentual no extrato aquoso dos arilpropanoídeos majoritários, quando comparado com as frações metanólica e residual utilizadas neste trabalho. Considerando que a IL-33 promove o aumento da hiper-responsividade das vias aéreas, através da ativação e aumento da liberação de IL-13 pelos mastócitos (KAUR et al., 2015), a avaliação desse

parâmetro no modelo utilizado pode auxiliar a esclarecer e confirmar se o extrato aquoso atua ou não sobre essa característica da asma alérgica.

Trabalhos anteriores demonstraram que um dos mecanismos pelos quais os tratamentos podem suprimir efetivamente as respostas alérgicas envolve a indução de uma resposta imune de perfil Th1 e/ou T regulatória (GOUVEIA et al., 2013; MA et al., 2014; WANG et al., 2014). No presente estudo, a redução da resposta patogênica ao alérgeno não foi associada com a troca de uma resposta de perfil Th2 para uma resposta Th1, já que nenhum dos tratamentos avaliados aumentou os níveis de IFN- γ . Apesar de níveis elevados de IFN- γ e IgG2a serem frequentemente associados ao desenvolvimento de uma resposta Th1 protetora (LI e ZHANG, 2013), um estudo demonstrou que a produção de IFN- γ por linfócitos Th1 pode levar ao desenvolvimento de inflamação pulmonar (HAYASHI et al., 2007) e, portanto, a redução nos níveis dessa citocina, conforme observado nesse trabalho, poderia ser também benéfico no controle da resposta inflamatória. Contraditoriamente, foi demonstrado recentemente que o tratamento com o ácido ferúlico reduziu a resposta patogênica Th2 induzida por OVA através do desenvolvimento de uma resposta Th1, com aumento dos níveis de IFN- γ e IgG2a específica anti-OVA. Embora o tratamento com o ácido ferúlico tenha sido realizado por via oral e com as mesmas doses, foram 26 dias de tratamento, enquanto no presente trabalho foram apenas 9 dias de tratamento. Em contrapartida, a indução do modelo de alergia pulmonar foi diferente, sendo mais longo, com 48 dias de duração e cinco desafios consecutivos, comparados aos 30 dias de duração do protocolo, com cinco desafios em dias alternados no presente trabalho. Essas diferenças podem ter favorecido o desenvolvimento de uma resposta Th1 no trabalho de Lee e colaboradores (2015).

Os tratamentos com *E. grandiflorus* ou com ácido ferúlico não aumentaram os níveis das citocinas IL-10 e TGF- β e, corroborando com os dados encontrados no presente trabalho, já foi demonstrada redução dos níveis de produção de IL-10 em células dendríticas estimuladas com lipopolissacarídeo após o tratamento com ácido ferúlico. Além disso, os autores observaram aumento da resposta proliferativa de linfócitos T quando incubados com células dendríticas estimuladas com lipopolissacarídeo, sugerindo que o ácido ferúlico não induz o desenvolvimento de uma resposta regulatória (LEE et al., 2015). Entretanto, a indução de uma resposta regulatória protetora não pode ser completamente descartada, considerando que uma inibição mediada por contato celular pode estar envolvida neste mecanismo,

independente de produção de citocinas (revisado por HAWRYLOWICZ e O'GARRA, 2005). Desta forma, a análise fenotípica da população de Tregs presentes no pulmão dos animais pode contribuir para esclarecer se essas células estão envolvidas no mecanismo modulador dos tratamentos sobre a resposta alérgica patogênica.

Em relação aos tratamentos com o extrato aquoso e as frações, é importante destacar que, quando se trata de extratos vegetais, pode ocorrer tanto ação sinérgica, quanto ação antagônica entre os seus constituintes químicos e, com base nos resultados obtidos, merece destaque a fração metanólica que apresentou melhores efeitos utilizando uma dose mais baixa, o que seria mais vantajoso em relação ao menor custo para obtenção e à redução de riscos de efeitos adversos. Paralelamente, é possível sugerir que as ações no modelo murino de alergia pulmonar tenham sido devido aos arilpropanoides majoritários presentes nas amostras. Análises mais detalhadas não puderam ser realizadas neste trabalho por impossibilidades técnicas, entretanto, o isolamento, a purificação e a identificação destes componentes presentes no extrato aquoso e nas frações irão permitir futuramente a avaliação da ação destes constituintes no modelo murino de alergia pulmonar.

Quanto ao tratamento com o ácido ferúlico, a dose mais efetiva foi de 25 mg/kg, já que esta dose reduziu todos os parâmetros associados a resposta imune no modelo de alergia pulmonar induzida por OVA e doses mais elevadas não proporcionaram incrementos significativos nos efeitos biológicos observados. Quando se avalia um fármaco, a dose de escolha deve ser a menor dose com que se obteve a ação terapêutica, pois assim garante-se menor custo e possivelmente efeitos adversos reduzidos. Em trabalhos que avaliaram os efeitos do ácido ferúlico no modelo de toxicidade induzida pela nicotina (SUDHEER et al., 2008) e em modelo de alergia pulmonar (LEE et al., 2015), os melhores resultados foram obtidos com doses semelhantes de 20 mg/kg e 25 mg/kg, respectivamente. O ácido ferúlico tem baixo grau de toxicidade após a administração oral, sendo a DL50 aguda oral de aproximadamente 2 g/kg em ratos (revisado por ZHAO e MOGHADASIAN, 2008), muito acima da dose terapêutica avaliada neste trabalho. Apesar disso, a biodisponibilidade do ácido ferúlico após a administração oral também é baixa o que poderia limitar seu uso clínico e formulações como nanopartículas de lipídeos sólidos e ciclodextrinas têm sido propostas para permitir sua melhor absorção e

concentração em órgãos periféricos (revisado por BARONE, CALABRESE e MANCUSO, 2009; revisado por MANCUSO e SANTANGELO, 2014). Outra limitação é o fato de estudos dos efeitos do ácido ferúlico em humanos serem realizados a partir da ingestão de alimentos que o contenham e não da administração isolada desse ácido fenólico, o que dificulta a titulação de uma dose específica associada a determinado efeito biológico (revisado por MANCUSO e SANTANGELO, 2014), existindo a necessidade de pesquisas futuras para garantir sua segurança e eficácia no tratamento da asma. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com a fração metanólica e o ácido ferúlico, ambos na dose de 25 mg/kg, para os principais parâmetros avaliados. Com os resultados obtidos, seria interessante investigar esses tratamentos nos demais fenótipos da doença, inclusive nos casos de resistência à dexametasona que não foram alvo deste estudo.

É importante destacar que na asma ocorre produção de altos níveis de ROS e RNS em resposta aos alérgenos, com desequilíbrio no sistema redox, o que leva ao início e manutenção da inflamação nas vias aéreas, associada a disfunção dos sistemas antioxidantes SOD e catalase (revisado por ANDREADIS et al., 2003; revisado por COMHAIR e ERZURUM, 2010). Sendo assim, o uso de antioxidantes da dieta na terapia da asma parece promissor, uma vez que estudos epidemiológicos sugerem associações entre os baixos níveis de ingestão de antioxidantes com a redução da função pulmonar e conseqüentemente aumento dos sintomas respiratórios em asmáticos (revisado por ANDREADIS et al., 2003; revisado por COMHAIR e ERZURUM, 2010).

Considerando as propriedades antioxidantes demonstradas para *E. grandiflorus*, através da eliminação de radicais livres e restauração das atividades das enzimas SOD e catalase (LUNARDI et al., 2014; PRANDO et al., 2015) e levando-se em conta a grande capacidade do ácido ferúlico eliminar radicais livres, aumentar a atividade de enzimas responsáveis pela eliminação dos radicais livres, inibir enzimas que catalisam a produção de radicais livres e ativar a resposta ao estresse celular, incluindo o aumento da atividade da SOD e catalase e inibição da produção de iNOS (revisado por OU e KWOK, 2004; revisado por MANCUSO e SANTANGELO, 2014), é possível inferir que esses fatores podem ter contribuído para os efeitos benéficos observados, atuando na fase inicial da resposta imune após a produção de ROS e RNS pelas células epiteliais das vias aéreas em resposta aos alérgenos, reduzindo conseqüentemente a resposta patogênica Th2.

7 CONCLUSÕES

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. Os tratamentos com o extrato aquoso de *E. grandiflorus*, suas frações metanólica e residual e com o ácido ferúlico foram capazes de melhorar a resposta inflamatória elicitada pelo alérgeno via redução da resposta patogênica Th2, com destaque para a fração metanólica e o ácido ferúlico, ambos na dose de 25 mg/kg. Esta propriedade imunomodulatória provavelmente está relacionada à capacidade de atuar na fase inicial da resposta imune, sobre as células epiteliais das vias aéreas, reduzindo os níveis de quimiocinas e citocinas liberadas por essas células e reduzindo, conseqüentemente, a migração e a ativação das células dendríticas (Figura 32).

Os resultados obtidos com o EAEg e com suas frações podem estar relacionados à presença de duas substâncias majoritárias e, portanto, pesquisas adicionais devem ser realizadas para isolar, purificar e identificar essas substâncias, o que poderia permitir a avaliação mais específica do mecanismo de ação de *E. grandiflorus*, considerando que esta erva medicinal já vem sendo utilizada pela população brasileira a algum tempo. Quanto ao ácido ferúlico, novos estudos devem ser realizados para garantir sua segurança e eficácia, uma vez que o mesmo é amplamente consumido pela população em alimentos e bebidas e, assim como *E. grandiflorus*, tem grande potencial para uso na terapia da asma alérgica.

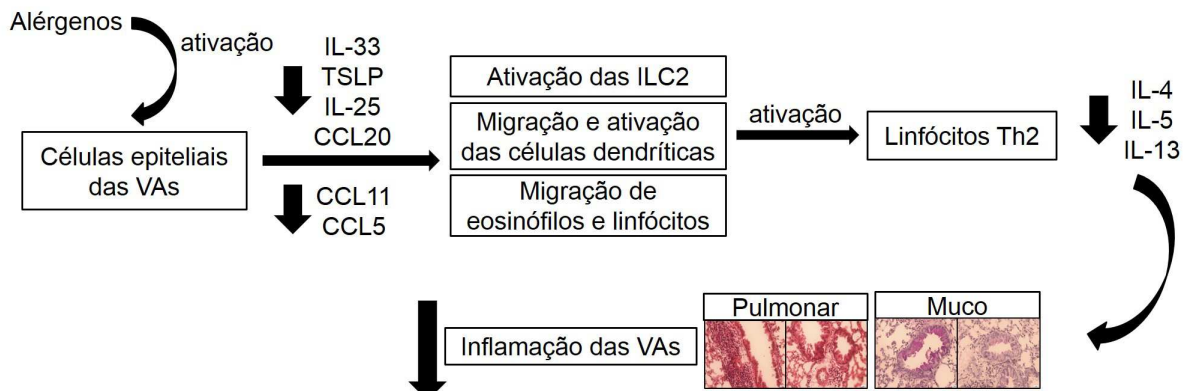


Figura 32. Provável mecanismo de imunossupressão dos tratamentos avaliados. AF, Ácido ferúlico. FM, Fração metanólica. ILC2, Células linfóides inatas 2. VAs, vias aéreas.

REFERÊNCIAS

- ADCOCK, I. M.; CARAMORI, G.; CHUNG, K. F. 2008. New targets for drug development in asthma. **Lancet**, **372 (9643)**: 1073-1087.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **17 (1)**: 114-140.
- AKDIS, C. A. 2012. Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. **Nature Medicine**, **18 (5)**: 736-749.
- ALVES, C. F.; ANGELI, G. N.; FAVARIN, D. C.; ANDRADE, E. L.; CHICA, J. E. L.; FACCIOLI, L. H.; SILVA, P. R. ROGERIO, A. P. 2013. The Effects of Proresolution of Ellagic Acid in an Experimental Model of Allergic Airway Inflammation. **Mediators of Inflammation**, **2013**: 1-9.
- ANDREADIS, A. A.; HAZEN, S. L.; COMHAIR, S. A. A.; ERZURUM, S. C. 2003. Oxidative and nitrosative events in asthma. **Free Radical Biology & Medicine**, **35 (3)**: 213-225.
- 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.
- AZADMEHR, A.; HAJIAGHAEI, R.; ZOHAL, M. A.; MALIJI, A. G. 2013. Protective effects of *Scrophularia striata* in Ovalbumin-induced mice asthma model. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, **21**: 56.
- AZAY-MILHAU, J.; FERRARE, K.; LEROY, J.; AUBATERRE, J.; TOURNIER, M.; LAJOIX, A.; TOUSCH, D. 2013. Antihyperglycemic effect of a natural chicoric acid extract of chicory (*Cichorium intybus* L.): A comparative in vitro study with the effects of caffeic and ferulic acids. **Journal of Ethnopharmacology**, **150**: 755-760.
- BAE, H.; KIM, Y.; LEE, E.; PARK, S.; JUNG, K.; GU, M.; HONG, S.; KIM, J. 2012. *Vitex rotundifolia* L. prevented airway eosinophilic inflammation and airway remodeling in an ovalbumin-induced asthma mouse model. **International Immunology**, **25 (3)**: 197-205.
- BANDUGULA, V. R.; PRASAD R. N. 2013. 2-Deoxy-D-glucose and ferulic acid modulates radiation response signaling in non-small cell lung cancer cells. **Tumor Biology**, **34**: 251-259.
- BANDUKWALA, H. S.; CLAY, B. S.; TONG, J.; MODY, P. D.; CANNON, J. L.; SHILLING, R. A.; VERBEEK, J. S.; WEINSTOCK, J. V.; SOLWAY, J.; SPERLING A. I. 2007. Signaling through Fc γ RIII is required for optimal T *helper* type (Th)₂ responses and Th₂-mediated airway inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, **204 (8)**: 1875-1889.

BARLOW, J. L.; FLYNN, R. J.; BALLANTYNE, S. J.; MCKENZIE, A. N. J. 2011. Reciprocal expression of IL-25 and IL-17A is important for allergic airways hyperreactivity. **Clinical & Experimental Allergy**, **41**: 1447–1455.

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

BARONE, E.; CALABRESE, V.; MANCUSO, C. 2009. Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases. **Biogerontology**, **10**: 97-108.

BENDIKS, M.; KOPP, M. V. 2013. The Relationship Between Advances in Understanding the Microbiome and the Maturing Hygiene Hypothesis. **Current Allergy and Asthma Reports**, **13 (5)**: 487-494.

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 (Supl. 1)**: S1.

BRUGIOLO A. S. S.; ALVES, C. C. S.; GOUVEIA, A. C. C.; DIAS, A. T.; RODRIGUES, M. F.; PACÍFICO, L. G. G.; AARESTRUP, B. J. V.; MACHADO, M. A.; DOMINGUES, R.; TEIXEIRA, H. C.; GAMEIRO, J.; FERREIRA, A. P. 2011. Effects of aqueous extract of *Echinodorus grandiflorus* on the immune response in ovalbumin-induced pulmonary allergy. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, **106**: 481-488.

BRUGIOLO, S. S. S.; PETERS, V. M.; PIMENTA, D. S.; AARESTRUP, B. J. V.; BRUGIOLO, A. S. S.; RIBEIRO, D. M.; GUERRA, M. O. 2010. Reproductive toxicity of *Echinodorus grandiflorus* in pregnant rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, **35 (6)**: 911-922.

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.

CAMPANA, P. R. V.; MANSUR, D. S.; GUSMAN, G. S.; FERREIRA, D.; TEIXEIRA, M. M.; BRAGA, F. C. 2015. Anti-TNF- α activity of Brazilian medicinal plants and compounds from *Ouratea semiserrata*. **Phytotherapy Research**, **29**: 1509-1515.

CARDOSO, G. L. C.; PEREIRA, N. A.; LAINETTI, R. 2003. Avaliação das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória 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, R.; KIM, B. H.; NAOWABOON, J.; LEE, M. Y.; HYUN, M. R.; CHO, E. J.; LEE, E. S.; LEE, E. Y.; YANG, Y. C.; CHUNG, C. H. 2011. Effects of ferulic acid on diabetic nephropathy in a rat model of type 2 diabetes. **Experimental and Molecular Medicine**, **43 (12)**: 676-683.

CHUNG, H.; KIM, Y.; OH, S. J.; KIM, H.; CHOI, S. I.; ZHANG, Y.; JEONG, J.; BAE, H. 2013. A synthetic compound, 4-acetyl-3-methyl-6-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dione, ameliorates ovalbumin-induced asthma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **21**: 6359-6365.

COMHAIR, S. A. A.; ERZURUM, S. C. 2010. Redox Control of Asthma: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, **12 (1)**: 93-124.

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.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, **43 (4)**: 348-361.

DECKERS, J.; MADEIRA, F. B.; HAMMAD, H. 2013. Innate immune cells in asthma. **Trends in Immunology**, **34 (11)**: 540-547.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. 2004. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, **5 (1)**: 33-40.

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

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma. 2012. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, **38 (Supl. 1)**: S1-S46.

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 anti-inflamatória 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.

EROGLU, C.; SEÇME, M.; BAGCI, G.; DODURGA, Y. 2015. Assessment of the anticancer mechanism of ferulic acid via cell cycle and apoptotic pathways in human prostate cancer cell lines. **Tumor Biololy**, **36 (12)**: 9437-9446.

FARMACOPEIA BRASILEIRA [on line]. Ed. 2010. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), volume 2. Brasília. [acesso em 26 de dezembro de 2015]. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/Volume%201.pdf

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.

GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. 2008. The development of allergic inflammation. **Nature**, **454 (7203)**: 445-54.

GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, M. A.; CANDIDO, L. C. M.; COELHO, F. M.; COSTA, V. V.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; BOFF, D.; AMARAL, F. A.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M.; BRAGA, F. C. 2016. Effect of the Hydroethanolic Extract from *Echinodorus grandiflorus* Leaves and a Fraction Enriched in Flavone-C-Glycosides on Antigen-Induced Arthritis in Mice. **Planta Med.**

GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, M. A.; GODIN, A. M.; FERREIRA, W. C.; BASTOS, L. F. S.; COELHO, M. M.; BRAGA, F. C. 2010. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. **Phytomedicine** **18**: 80-86.

GENUNEIT, J.; CANTELMO, J. L.; WEINMAYR, G.; WONG, G. W.; COOPER, P. J.; RIIKJÄRV, M. A.; GOTUA, M.; KABESCH, M.; VON MUTIUS, E.; FORASTIERE, F.; CRANE, J.; NYSTAD, W.; EL-SHARIF, N.; BATLLES-GARRIDO, J.; GARCÍA-MARCOS, L.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, G.; MORALES-SUAREZ-VARELA, M.; NILSSON, L.; BRÅBÄCK, L.; SARAÇLAR, Y.; WEILAND, S. K.; COOKSON, W. O.; STRACHAN, D.; MOFFATT, M. F. 2009. A multi-centre study of candidate genes for wheeze and allergy: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase 2. **Clinical and Experimental Allergy**, **39 (12)**: 1875-1888.

GINA - Global Strategy for Asthma Management and Prevention [on line]. Ed. 2015. Reino Unido. [acesso em 26 de dezembro de 2015]. Disponível em:
<http://www.ginasthma.org>.

GOUVEIA, A. C. C.; BRUGIOLO, A. S. S., ALVES, C. C. S.; SILVA, F. M. C.; MESQUITA, F. P.; GAMEIRO, J.; FERREIRA, A. P. 2013. Th2 Responses in OVA-Sensitized BALB/c Mice Are Down-Modulated By Mycobacterium bovis BCG Treatment. **Journal of Clinical Immunology**, **33**: 235-245.

GRAF, E. 1992. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, **13**: 435-448.

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.

- HAYASHI, N.; YOSHIMOTO, T.; IZUHARA, K.; MATSUI, K.; TANAKA, T.; NAKANISHI, K. 2007. T *helper* 1 cells stimulated with ovalbumin and IL-18 induce airway hyperresponsiveness and lung fibrosis by IFN- γ and IL-13 production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **104 (37)**: 14765-14770.
- 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.
- HOLGATE, S. T. 2012. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nature medicine**, **18 (5)**: 673-683.
- HOLMES, A. M.; SOLARI, R; HOLGATE, S. T. 2011. Animal models of asthma: value, limitations and opportunities for alternative approaches. **Drug Discovery Today**, **16 (15/16)**: 659-670.
- HOLTZMAN, M. J.; BYERS, D. E.; ALEXANDER-BRETT, J.; WANG, X. 2014. The role of airway epithelial cells and innate immune cells in chronic respiratory disease. **Nature Reviews Immunology**, **10 (14)**: 686-698.
- HU, H. J.; HANG, B. Q. 1991. Effects of ferulic acid on allergic reaction. **Zhongguo Yao Li Xue Bao**, **12 (5)**: 426-430.
- HUNTLEY, A.; ERNEST, E. 2000. Herbal medicines for asthma: a systematic review. **Thorax**, **55 (11)**: 925-929.
- 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.
- JEON, C. M.; SHIN, I. S.; SHIN, N. R.; HONG, J. M.; KWON, O. K.; KIM, H. S.; OH, S. R.; MYUNG, P. K.; AHN, K. S. 2014. *Siegesbeckia glabrescens* attenuates allergic airway inflammation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells and OVA induced asthma murine model. **International Immunopharmacology**, **22 (2)**: 414-419.
- 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.
- KAUR, D.; GOMEZ, E.; DOE, C.; BERAIR, R.; WOODMAN, L.; SAUNDERS, R.; HOLLINS, F.; ROSE, F. R.; AMRANI, Y.; MAY, R.; KEARLEY, J.; HUMBLE, A.; COHEN, E. S.; BRIGHTLING, C. E. 2015. IL-33 drives airway hyper-responsiveness through IL-13-mediated mast cell: airway smooth muscle crosstalk. **Allergy**, **70**: 556-567.
- KHANDUJA, K. L.; AVTI, P. K.; KUMAR, S.; MITTAL, N.; SOHI, K. K.; PATHAK, C. M. 2006. Anti-apoptotic activity of caffeic acid, ellagic acid and ferulic acid in normal

human peripheral blood mononuclear cells: A Bcl-2 independent mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1760**: 283-289.

KIM, H. K.; JEONG, T.; LEE, M.; PARK, Y. B.; CHOI, M. 2003. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. **Clinica Chimica Acta**, **327**: 129-137.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. 2012. The airway epithelium in asthma. **Nature Medicine**, **18 (5)**: 684-692.

LEE, C.; WANG, C.; HUANG, H.; LIN, C., LEU, S.; LEE, Y. 2015. Ferulic Acid Induces Th1 Responses by Modulating the Function of Dendritic Cells and Ameliorates Th2-Mediated Allergic Airway Inflammation in Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, **2015**:1-16.

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.

LI, J.; ZHANG, B. 2013. Apigenin protects ovalbumin-induced asthma through the regulation of Th17 cells. **Fitoterapia**, **91**: 298-304.

LIMA-DELLAMORA, E. C.; WALDHELM, K. C. V.; ALVES, A. M.; LAGE, C. A. S.; LEITÃO, A. A. C.; KUSTER, R. M. 2014. Genotoxic Maillard byproducts in current phytopharmaceutical preparations of *Echinodorus grandiflorus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **86 (3)**: 1385-1394.

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.

LUNARDI, R. F.; WOHLLENBERG, M.; MEDEIROS, N.; AGOSTINI, F.; FUNCHAL, C.; DANI, C. 2014. *In vitro* antioxidant capacity of tea of *Echinodorus grandiflorus*, "leather hat," in Wistar rat liver. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **86 (3)**: 1451-1461.

- LV, W. H.; ZHANG, L.; WU, S. J.; CHEN, S. Z.; ZHU, X. B.; PAN, J. C. 2013. Analgesic effect of ferulic acid on CCI mice: behavior and neurobiological analysis. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, **38 (21)**: 3736-3741.
- MA, C.; MA, Z.; FU, Q.; MA, S. 2013. Curcumin attenuates allergic airway inflammation by regulation of CD4+ CD25+ regulatory T cells (Tregs)/Th17 balance in ovalbumin-sensitized mice. **Fitoterapia**, **87**: 57-64.
- 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.
- MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. 2014. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. **Food and Chemical Toxicology**, **65**: 185-195.
- MANS, D.; HARTMANN, R. 1993. Echinodol: a new cembrene derivate from *Echinodorus grandiflorus*. **Planta Medica**, **59**: 465-466.
- MARTIN, R. A.; HODGKINS, S. R.; DIXON, A. E.; POYNTER, M. E. 2014. Aligning mouse models of asthma to human endotypes of disease. **Respirology**, **19 (6)**: 823–833.
- MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLT, S.; BEASLEY, R. 2004. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. **Allergy**, **59**: 469-478.
- 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.
- NAGEL, G.; WEINMAYR, G.; KLEINER, A.; GARCIA-MARCOS, L.; STRACHAN, D. P. 2010. Effect of diet on asthma and allergic sensitisation in the International Study on Allergies and Asthma in Childhood (ISAAC) Phase Two. **Thorax**, **65 (6)**: 516-522.
- NEVES, J. S.; WELLER, P. F. 2009. Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology. **Current Opinion in Immunology**, **21 (6)**: 694-699.
- NUNES, G.P.; SILVA, M.F.; RESENDE, U.M.; SIQUEIRA, J.M. 2003. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **13 (2)**: 83-92.
- OU, S.; KWOK, K. 2004. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **84**: 1261-1269.
- 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⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T Cells Independent of Interleukin-10. **Infection and Immunity**, **77 (1)**: 98-107.

PALOMARES, O.; MARTIN-FONTECHA, M.; LAUENER, R.; TRAUD-HOFFMANN, C.; CAVKAYTAR, O.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. 2014. Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF- β . **Genes and Immunity**, **(2014)**: 1-10.

PENG, C. CHYAU, C.; WANG, H.; CHANG, C.; CHEN, K.; CHOU, K.; PENG, R. 2013. Cytotoxicity of ferulic acid on T24 cell line differentiated by different microenvironments. **BioMed Research International**, **2013**: 1-7.

PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, 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.

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.

PRANDO, T. B. L.; BARBOZA, L. N.; GASPAROTTO, F. M.; ARAÚJO, V. O.; TIRLONI, C. A. S.; SOUZA, L. M.; LOURENÇO, E. L. B.; GASPAROTTO JUNIOR, A. 2015. Ethnopharmacological investigation of the diuretic and hemodynamic properties of native species of the Brazilian biodiversity. **Journal of Ethnopharmacology**, **174**: 369-378.

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.; 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.

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

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.

SENAPHAN, K.; KUKONGVIRIYAPAN, U.; SANGARTIT, W.; PAKDEECHOTE, P.; PANNANGPETCH, P.; PRACHANEY, P.; GREENWALD, S. E.; KUKONGVIRIYAPAN, V. 2015. Ferulic acid alleviates changes in a rat model of metabolic syndrome induced by high-carbohydrate, high-fat diet. **Nutrients**, **7**: 6446-6464.

SGARBOSSA, A.; GIACOMAZZA, D.; CARLO, M. 2015. Ferulic Acid: A Hope for Alzheimer's Disease Therapy from Plants. **Nutrients**, **7**: 5764-5782.

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

SHIN, I.; SHIN, N.; JEON, C.; HONG, J.; KWON, O.; KIM, J.; OH, S.; HAHN, K.; AHN, K. 2013. Inhibitory effects of Pycnogenol[®] (French maritime pine bark extract) on airway inflammation in ovalbumin-induced allergic asthma. **Food and Chemical Toxicology**, **62**: 681-686.

SILVA, C. J.; BASTOS, J. K.; TAKAHASHI, C. S. 2010. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. **Journal of Ethnopharmacology**, **127**: 445-450.

SIMPSON, A.; TAN, V. Y. F.; WINN, J.; SVENSE, M.; BISHOP, C. M.; HECKERMAN, D. E.; BUCHAN, I.; CUSTOVIC, A. 2010. Multiple Patterns of Sensitization in Relation to Asthma in a Birth Cohort Study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, **181**: 1200-1206.

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.

SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; MENON, V. P. 2007. Ferulic Acid: therapeutic potential through its antioxidant property. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, **40 (2)**: 92-100.

STRACHAN, D. P. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. **British Medical Journal**, **299 (18)**: 1259-1260.

SUDHEER, A. R.; DEVIPRIYA, N.; VISHWANATHAN, P.; MENON, V. P. 2008. Dose-response effect of ferulic acid against nicotine-induced tissue damage and

altered lipid levels in experimental rats: a pathohistological evaluation. **Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique Fundamental & Clinical Pharmacology**, **22**: 557-567.

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.

VERCELLI, D. 2008. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. **Nature Reviews**, **8**: 169-182.

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.

WANG, J.; JIN, R.; XIAO, L.; WANG, Q.; YAN, T. 2014. Anti-asthma effects of synthetic salidroside through regulation of Th1/Th2 balance. **Chinese Journal of Natural Medicines**, **12 (7)**: 500-504.

WANG, L.; TANG, Y.; LIU, X.; ZHU, M.; TAO, W.; LI, W.; DUAN, J. 2015b. Effects of ferulic acid on antioxidant activity in *Angelicae Sinensis Radix*, *Chuanxiong Rhizoma*, and their combination. **Chinese Journal of Natural Medicines**, **13 (6)**: 401-408.

WANG, O.; LIU, J.; CHENG, Q.; GUO, X.; WANG, Y.; ZHAO, L.; ZHOU, F.; JI, B. 2015a. Effects of Ferulic Acid and γ -Oryzanol on High-Fat and High-Fructose Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. **Plos One**, **10 (2)**: 1-14.

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

WEI, Y.; LIU, B.; SUN, J.; LV, Y.; LUO, Q.; LIU, F.; DONG, J. 2015. Regulation of Th17/Treg function contributes to the attenuation of chronic airway inflammation by icariin in ovalbumin-induced murine asthma model. **Immunobiology**, **220 (2015)**:789-797.

WENZEL, S. E. 2012. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nature Medicine**, **18 (5)**: 716-725.

XIONG, H.; DOLPADY, J.; WABL, M.; CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; LAFAILLE, J. J. 2012. Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. **The Journal of Experimental Medicine**, **209 (2)**: 353-364.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. **Food Chemistry**, **109**: 691-702.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 073/2012– CEEA sobre “AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE ECHINODORUS GRANDIFLORUS, DE SUAS FRAÇÕES E COMPONENTE ISOLADO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NO MODELO DE ALERGIA PULMONAR INDUZIDA POR OVA”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de ANA PAULA FERREIRA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/10/2012. Para o desenvolvimento da pesquisa foram liberados 324 animais (324 fêmeas) da linhagem BALB/c, conforme solicitado.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 073/2012- CEEA about “AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE ECHINODORUS GRANDIFLORUS, DE SUAS FRAÇÕES E COMPONENTE ISOLADO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NO MODELO DE ALERGIA PULMONAR INDUZIDA POR OVA” under responsibility of ANA PAULA FERREIRA- is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 02/10/2012. For the development of this research 324 animals (324 female) lineage BALB/c were released, as requested.

Juiz de Fora, 04 de outubro de 2012.



Presidente/ CEEA



p/ Secretário/CEEA

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO NA INTERNATIONAL ARCHIVES OF ASTHMA AND IMMUNOLOGY

Webmail UFJF :: Fwd: International Archives of Allergy and Immuna... https://correio.ufjf.edu.br/?_task=mail&_action=print&_uid=1171...

Assunto: Fwd: International Archives of Allergy and Immunology
Submission Received
De: <ana.paula@ufjf.edu.br>
Para: <alessesft@hotmail.com>
Data: 22/01/2016 12:11

MAIL@



----- Mensagem original -----

Assunto: International Archives of Allergy and Immunology Submission Received
Data: 19/11/2015 09:35
De: <ias@karger.com>
Para: <ana.paula@ufjf.edu.br>

Dear Prof. Dr. Ana Paula Ferreira:

Thank you for submitting your manuscript entitled "Immunomodulatory action of *Echinodorus grandiflorus* in OVA-induced pulmonary allergy associated with TSLP, IL-33, and IL-25 inhibition" to "International Archives of Allergy and Immunology"; the submission number is: 6916. Your submission will now be checked by the editorial office. Once this has been done, you will receive a confirmation mail from the editorial office.

If you have any queries please send an email to: ias@karger.com.

With kind regards,

Editorial Office