



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



JULIANA FRAGA VASCONCELOS SENRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE
SUBSTÂNCIAS PURIFICADAS A PARTIR DE PLANTAS
DO SEMI-ÁRIDO BRASILEIRO NO MODELO DE ASMA
BRÔNQUICA.**

Feira de Santana, BA
2007

JULIANA FRAGA VASCONCELOS SENRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE
SUBSTÂNCIAS PURIFICADAS A PARTIR DE PLANTAS
DO SEMI-ÁRIDO BRASILEIRO NO MODELO DE ASMA
BRÔNQUICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos

Feira de Santana, BA
2007

À minhas filhas queridas GIULIA e RAFAELA, por toda a paciência do mundo, pelas horas de afastamento e pelo eterno amor por nós compartilhado. À querida VERA, minha mãe e aos meus estimados pais MARCUS e LUCIANO pelo apoio nas horas difíceis e pela preocupação e dedicação constante pelos filhos, exemplos de vida. Ao carinho eterno de minha avó JANETE e o amor de meus irmãos RODRIGO, AILTON, MAÍRA, ISADORA e JÚLIA.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e garra que me fez chegar até aqui.

À Cláudio Roberto Costa, pelo amor, infinita paciência e atenção, de extrema importância para a conclusão de mais uma etapa.

Ao Dr Ricardo Ribeiro dos Santos, chefe do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia pela orientação e pelo incentivo durante o trabalho.

À Dra Milena Botelho Pereira Soares, por ter participado, apoiado e possibilitado a realização desse trabalho, mas principalmente pela orientação a mim concedida.

Ao Prof. Dr. Aritósteles Góes Neto, pela dedicação ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela sua preocupação na formação de recursos humanos e pelo apoio dado a nós alunos em todos os momentos.

À Dra Simone Garcia Macambira, pela amizade, pelas discussões e grande incentivo em todas as etapas.

Ao secretário da PPgBIOTEC, Helton Ricardo, pela atenção, disponibilidade e paciência com que nos tratou durante todo esse período.

À Flávia Góes Maciel, por administrar (quase) todos os nossos problemas.

À Roberta e em especial Lucyvera Imbroinise, pelo trabalho de secretaria do LETI e pelo apoio sempre encontrado por mim.

À Ana Fiscina pela ajuda com a referência bibliográfica.

Aos amigos Ricardo Santana de Lima, Daniele Brustolim e Sheilla Andrade pela disponibilidade e ajuda em algumas etapas deste trabalho.

Aos companheiros do LETI, amigos de tantas agruras, por toda amizade, pelo bom-humor, pelo apoio - minha segunda família: Adriana, Aninha, Alice, André, Bruno, Carlota, Claudio, Cris, Dani, Elton, Fabiana, Fabrício, Fernando, Gisele, Liu, Ludi, Mara, Matheus, Mileninha, Sheilla, Siane, Rick.

Aos colegas do curso de mestrado da PPgBIOTEC.

Agradecimento especial às técnicas Edlúcia Cruz, Eunice e Jaqueline Noronha, que tanto nos apoiou nos bastidores.

À amiga Sheila Resende, que seguiu como minha fiel escudeira.

À Camila Vasconcelos, por toda a paciência, pelo incentivo e pela ajuda em momentos nada fáceis.

Agradeço a Universidade Estadual de Feira de Santana que me proporcionou momentos de grande aprendizado, com excelentes mestres.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, pela disponibilidade da excelente estrutura física.

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado, imprescindível para realização deste trabalho.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

RESUMO

A asma é uma inflamação crônica das vias aéreas que está associada a resposta imune Th2, com participação de eosinófilos, mastócitos, IgE e vários mediadores solúveis. Os fármacos disponíveis não possuem uma alta eficácia, sendo os corticóides os mais utilizados, apesar de possuírem efeitos colaterais indesejáveis. Neste trabalho foi investigada a eficácia de quatro moléculas purificadas a partir de plantas do semi-árido brasileiro no tratamento da asma brônquica em camundongos BALB/c imunizados com ovalbumina. O tratamento com as fisalinas B e F (2 mg/animal) não reverteu o quadro inflamatório. Já a administração de umbeliferona ou de lupeol (2 mg/animal) causou uma redução de eosinófilos e outras células inflamatórias no pulmão e da produção de muco e de citocinas pró-inflamatórias (IL-4, IL-5 e IL-13), semelhante a dexametasona. Esses achados enfatizam a importância da flora brasileira como fonte rica de biomoléculas. A investigação dos mecanismos de ação dessas moléculas poderá guiar o desenvolvimento de novos fármacos que intervenham nessa patologia.

Palavras chaves: Asma experimental. Inflamação. Produtos naturais. Eosinófilos.

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammation of airways associated with a Th2 immune response, involving eosinophils, mast cells, IgE and several soluble mediators. The available drugs are not very efficient, being the corticosteroids the most used, despite their side effects. In this work we investigated the efficacy of four pure substances, isolated from plants found in the Brazilian semi-arid region, in the treatment of bronchial asthma in BALB/c mice immunized with ovalbumin. Treatment with physalins B or F did not revert the inflammatory response. In contrast, the administration of lupeol or umbelliferone caused the reduction of eosinophils and other inflammatory cells in the lung and of the production of mucus and pro-inflammatory cytokines (IL-4, IL-5 and IL-13) similar to the effect of dexamethasone. Our findings reinforce the importance of the Brazilian flora as a rich source of biomolecules. The investigation of the mechanisms of action of these molecules may contribute for the development of new drugs for the treatment of this pathology.

Keywords: Experimental asthma. Inflammation. Natural products. Eosinophils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de ativação de linfócitos Th2 por alérgeno e desencadeamento da fase aguda e fase crônica da asma brônquica.	18
Figura 2	Estrutura química das quatro moléculas testadas em modelo de asma brônquico experimental.	23
Figura 3	Delineamento experimental do teste farmacológico de moléculas de origem vegetal em modelo de asma brônquica experimental.	26
Figura 4	Verificação da eficácia na indução de asma brônquica experimental.	30
Figura 5	Células do LBA de camundongos asmáticos após o tratamento com fisalinas B ou F.	32
Figura 6	Células do LBA de camundongos asmáticos após o tratamento com umbeliferona ou lupeol.	33
Figura 7	Quantificação da celularidade no LBA de animais asmáticos tratados com fisalinas B ou F.	34
Figura 8	Quantificação da celularidade no LBA de animais asmáticos tratados com umbeliferona ou lupeol.	35
Figura 9	Inflamação em cortes histológicos de pulmões de animais asmáticos após diversos tratamentos.	37
Figura 10	Produção de muco em cortes histológicos de pulmões de animais asmáticos após diversos tratamentos.	38
Figura 11	Infiltrado inflamatório no pulmão dos animais dos diferentes grupos experimentais.	40
Figura 12	Produção de muco nos bronquíolos dos animais dos diferentes grupos experimentais.	41
Figura 13	Concentração de citocinas no LBA de camundongos asmáticos tratados com fisalinas B e F.	43
Figura 14	Concentração de citocinas no LBA de camundongos asmáticos tratados com umbeliferona ou lupeol.	44

LISTA DE ABREVIATURAS

Ig	Imunoglobulina
Th	Linfócito T auxiliar (T helper)
IL	Interleucina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (tumor necrosis factor- α)
Fc	Fração constante do anticorpo
GINA	Iniciativa Global para Asma
NAEPP	Programa Nacional de Educação e Prevenção da Asma
ISAAC	Estudo Internacional de asma e alergia na Infância
SUS	Sistema Único de Saúde
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
AGECON	Agência Geral de Comunicação Social do estado da Bahia
IMSEAR	Instituto do Milênio do Semi-árido
BDT	Banco de Dados Tropical
ELISA	Ensaio imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay)
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
CD	Conjunto de diferenciação (cluster differentiation)
OVA	Ovalbumina
DMSO	Dimetilsufóxido
LBA	Lavado Bronco alveolar
TMB	Pastilha de tetrametilbenzodine (tetramethylbenzidine tablets)
HE	Hematoxilina e Eosina
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Solução tampão fosfato (phosphate buffered saline)
LPS	Lipopolisacarídeos
IFN-γ	Interferon gama
ROS	Espécies reativas de oxigênio
MCT	Ministério da Ciência e Tecnologia
PG	Prostaglandina
PAF	Fator de agregação plaquetária
ICAM	Molécula de adesão intercelular
ECP	Proteína catiônica de eosinófilo
MBP	Proteína principal básica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	A ASMA	16
2.2	EPIDEMIOLOGIA	17
2.3	PATOGÊNESE	19
2.4	TRATAMENTO	20
2.5	DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS A PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS	21
2.6	MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA BRÔNQUICA	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	ANIMAIS	25
3.2	OBTENÇÃO DAS DROGAS	25
3.3	SENSIBILIZAÇÃO	25
3.4	DESAFIO	25
3.5	TRATAMENTO	26
3.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
3.7	OBTENÇÃO DO LAVADO BRONCO ALVEOLAR	27
3.8	CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NO LBA	27
3.9	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	27
3.10	ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA	28
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4	RESULTADOS	29
4.1	EFICÁCIA NA INDUÇÃO DA ASMA BRÔNQUICA	29
4.2	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS SUBSTÂNCIAS PURAS TESTADAS NA CELULARIDADE DO LBA.	31
4.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO PULMÃO	36
4.4	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO PULMÃO	39
4.5	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO LBA	42
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÕES	49
7	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

A asma brônquica constitui um estado inflamatório crônico geralmente acompanhado de sinais clínicos familiares, tais como dispnéia, tosse, sibilo intermitente, opressão torácica e broncoconstrição (RUSSO *et al.*, 1997; LIMA *et al.*, 2002; TEMELKOVSKI *et al.*, 2005). A asma é caracterizada por ataques recorrentes de falta de ar, que variam de severidade e frequência de pessoa a pessoa, afeta pessoas de todas as idades, começando geralmente na infância. Ela representa uma das condições patológicas crônicas de maior incidência no mundo contemporâneo, crescendo assustadoramente nos países industrializados. Dados da Organização Mundial de Saúde (2005) revelam que são gastos mais de US\$ 6 bilhões nos EUA com essa enfermidade. Segundo dados do *International Study for Asthma and Allergies in Childhood -ISAAC* (1998), a estimativa de prevalência no Brasil situa-se em torno de 20%, sendo responsável por aproximadamente 350.000 internações hospitalares no SUS/ano (CAMPOS, 2005).

As doenças alérgicas, como a asma, estão associadas com resposta imune do tipo Th2, envolvendo eosinofilia, mastocitose e elevação dos níveis de IgE (SILVEIRA *et al.*, 2002). A fisiopatologia do processo asmático está relacionada aos mecanismos de ativação, produção e liberação de mediadores químicos endógenos de células sanguíneas e teciduais, como mastócitos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos, basófilos e plaquetas (RUSSO *et al.*, 1997). A presença de receptores de IgE de alta afinidade na membrana de mastócitos confere a estas células papel importante no desenvolvimento da resposta de fase imediata da asma brônquica, por meio da liberação de autácóides aminados, como a histamina e serotonina, e lipídicos, tais como os leucotrienos e prostaglandina, que atuam sinergicamente no desenvolvimento da broncoconstrição. Há também o aumento da produção de diferentes citocinas, tais como IL-1, IL-4, IL-5, IL-8 e IL-13 e TNF- α . Outro tipo celular presente e muito importante na manutenção da inflamação é o eosinófilo, que se diferencia na medula óssea e migra para o tecido por efeito quimiotático de citocinas, principalmente IL-5 e eotaxina, e potencializa a inflamação pela liberação de proteínas básicas, citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) (VARGA *et al.*, 2002).

A maioria dos fármacos disponíveis para o tratamento da asma são divididos em agentes broncodilatadores (agonistas β_2 -adrenérgicos, anticolinérgicos) ou antiinflamatórios (corticosteróides, anti-histamínicos, inibidores da 5-lipoxigenase). O tratamento à base de corticóide é o mais eficaz, apresentando múltiplos mecanismos de ação, tais como repressão da produção de citocinas e quimiocinas, de proteínas

inflamatórias e de ativadores de fatores de transcrição (BARNES, 2001; BOYTON & ALTMANN, 2004). Embora os corticóides apresentem uma alta eficácia no tratamento de alergias, alguns efeitos moleculares e celulares adversos continuam sendo uma fonte de preocupação. Lima e colaboradores (2002) ao compararem o uso desses medicamentos ao aumento do índice de mortalidade em países como o Reino Unido e Itália, evidenciaram a baixa eficácia dos antiasmáticos clássicos utilizados no tratamento sintomático dessa patologia, confirmando a urgente necessidade de novas abordagens terapêuticas.

Espécies vegetais representam uma excelente fonte de busca de novas drogas, tendo em vista a grande diversidade molecular dos produtos naturais. O uso das plantas na medicina tradicional vem de longa data, há milênios os vegetais têm sido utilizados pelos seres humanos no tratamento de doenças, porém apenas recentemente as plantas se tornaram objeto de estudo científico no que diz respeito as suas variadas propriedades medicinais. Segundo Simões (2001), o Brasil possui o título de país com maior biodiversidade do mundo; nossos biomas formam um verdadeiro patrimônio genético, científico, tecnológico, econômico e cultural, mas que apesar da necessidade de valorização e exploração racional, faltam dados básicos sobre o potencial de utilização das espécies existentes.

Uma das vertentes do Instituto do Milênio do Semi-árido (IMSEAR) foi o Programa de Bioprospecção, que objetivou identificar espécies vegetais como fonte de substâncias para o tratamento de doenças que incidem em grande parte da população, através de análises fitoquímicas, farmacológicas, imunológicas e toxicológicas (AGECOM, 2007). Resultados preliminares de ensaios com moléculas estudadas no IMSEAR realizados no LETI/CPqGM/FIOCRUZ demonstraram uma atividade de modulação da resposta imune *in vitro*, em ensaio de produção de óxido nítrico por macrófagos ativados e de proliferação de linfócitos ativados, o que nos levou a investigar sua atividade em um modelo experimental de asma brônquica.

Existem alguns modelos experimentais de asma brônquica, sendo os camundongos mais amplamente utilizados por apresentarem uma resposta alérgica que se assemelha em certos aspectos a asma humana, incluindo resposta de fase aguda e de fase tardia. Nosso estudo é baseado na sensibilização sistêmica de proteína antigênica (OVA) e subsequente desafio por inalação, sendo este um dos protocolos de indução de asma brônquica mais aceito na literatura (BRAUN & TSCHERNIG, 2006; CONEJERO *et al.*, 2007). Utilizando

este modelo, investigamos o potencial anti-asmático de quatro substâncias puras isoladas a partir de espécies vegetais do semi-árido brasileiro.

OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade farmacológica das fisalinas B e F, do lupeol e da umbeliferona no tratamento da asma brônquica experimental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade das moléculas puras testadas na diminuição da celularidade no lavado broncoalveolar;
- Avaliar a atividade das moléculas puras testadas na eosinofilia;
- Avaliar a atividade das moléculas testadas na diminuição da inflamação no pulmão e da produção de muco nos bronquíolos;
- Avaliar a atividade das moléculas testadas na modulação da produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 *in vivo*;
- Comparar a eficácia dos tratamentos com as moléculas puras testadas com o tratamento com o esteróide sintético dexametasona.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A ASMA

Apesar de a asma ser uma doença crônica conhecida desde a antiguidade, ela é uma patologia de difícil definição. Recentemente a asma foi caracterizada como uma doença inflamatória das vias aéreas, apresentando obstrução variável do fluxo aéreo e hiperresponsividade das vias aéreas, na qual as manifestações clínicas proeminentes incluem a respiração dificultosa e ruidosa, com encurtamento da respiração (RUSSO *et al.*, 1997; TEMELKOVSKI *et al.*, 2005). Os ataques diferem de indivíduo para indivíduo e, entre os ataques, muitos indivíduos permanecem assintomáticos. Os ataques podem ocorrer espontaneamente ou em resposta a vários fatores desencadeantes, infecções respiratórias, estresse emocional ou mudanças no clima (SILVA & VARGAFTIG, 2005). O asmático, ao entrar em contato com alguns fatores desencadeantes, apresenta uma contração involuntária da musculatura dos brônquios, fazendo com que o ar tenha dificuldade para entrar e sair dos pulmões.

A hiperreatividade brônquica pode ser definida como uma resposta exagerada a estímulos broncoconstritores que não causariam broncoespasmo em indivíduos normais (COCKCROFT & DAVIS, 2006). A hiperreatividade brônquica pode ser medida por testes de broncoprovocação causada por administração de histamina, metacolina e até por exercício, ou inferida pela variabilidade circadiana da função pulmonar. Apesar de não ser específica para asma, a presença de hiperreatividade das vias aéreas pode auxiliar o diagnóstico em diversas situações, com base em dados obtidos pela histórico, exame físico, radiografia e testes de função pulmonar (VIANNA, 1998).

A causa desta patologia está relacionada ao desenvolvimento de uma resposta imune exacerbada contra antígenos tolerados pela população normal. Essa reação é mediada por células inflamatórias e por um grande número de mediadores químicos produzidos por essas células. Segundo Porth (2004), a asma é dependente tanto de fatores ambientais, tais como pó, ácaro e agentes infecciosos, quanto de fatores genéticos. De acordo com Reed (2006), a asma compreende uma fase aguda seguida de uma fase crônica mais prolongada. Os sintomas da resposta aguda, começam em média 10 a 20 minutos após a exposição ao alérgeno e são causados pela liberação de mediadores químicos por mastócitos revestidos de IgE. Apenas indivíduos que têm uma predisposição genética a uma maior produção de anticorpos IgE contra o alérgeno podem desenvolver essa patologia e são chamados de atópicos. Além disso, há uma broncoconstrição devida à estimulação direta dos receptores

parassimpáticos, associado a edema da mucosa em virtude da maior permeabilidade vascular e ao aumento da secreção de muco. A resposta da fase tardia é evidenciada de quatro a oito horas após a exposição ao alérgeno, caracterizada pela infiltração do brônquio por linfócitos T e eosinófilos ativados, prontos a liberarem seu conteúdo químico. Segundo Porth (2004), essa resposta envolve inflamação e aumento da capacidade de resposta das vias aéreas, que prolongam o ataque de asma e desencadeiam um círculo vicioso de exacerbações.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

À despeito dos enormes avanços científicos na fisiopatologia e no seu tratamento, a asma é uma das enfermidades crônicas mais frequentes em todas as faixas etárias, constituindo-se em uma das principais causas de internamentos e atendimentos de emergência na maioria dos países. Segundo a Iniciativa Global para a Asma – GINA (2003), ela é uma das principais causas de morbidade crônica e de mortalidade em todo o mundo, sendo considerada a principal causa de ausência no trabalho e na escola; responde também por muitas noites perdidas de sono, podendo limitar a vida social e o lazer, e ser causa de desagregação familiar. Dados do Programa Nacional de Educação e Prevenção da asma (NAEPP), no ano de 1999, indicam que, no Reino Unido, a prescrição anual de medicamentos para asma foi dobrada a partir de 1982; e em 1998, nos EUA, os custos diretos e indiretos da asma foram estimados em US\$ 11,3 bilhões, acometendo cerca de 20 milhões de pacientes. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2003), os gastos com essa enfermidade superam o custo combinado de doenças como tuberculose e AIDS.

A asma é considerada pelo DATASUS (Ministério da Saúde do Brasil) a 3ª causa de hospitalização pelo Sistema Único de Saúde (SUS), gerando cerca de 2.000 óbitos/ano. Dados do *International Study for Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC, 1998) indicam a estimativa de prevalência no Brasil de 20%, sendo responsável por aproximadamente 350.000 internações hospitalares no SUS/ano (CAMPOS *et al.*, 2005). Esses números apontam para uma maior incidência no mundo contemporâneo, crescendo assustadoramente nos países industrializados. A asma é subestimada nas estatísticas de mortalidade que consideram apenas a causa básica de morte. No Brasil, o coeficiente de mortalidade aumentou cerca de 50%, considerando todas as menções de asma nas declarações de óbito (SANTO, 2006).

Uma explicação sugerida para o aumento na incidência e mortalidade da asma é o

aumento da exposição de alérgenos domésticos decorrentes de ambientes mais fechados, com mais carpetes e móveis forrados que acumulam ácaros, além das pessoas passarem mais tempo dentro de casa (PORTH, 2004). Outra explicação apresentada está relacionada com a hipótese higiênica - as crianças cada vez mais estão protegidas, graças a programas de vacinação, contra infecções que desviariam seu perfil de resposta imune para Th1. A demora do amadurecimento do sistema imune em crianças vacinadas e o predomínio do perfil Th2 no nascimento são fatores que favorecem o aparecimento de alergias (MATRICARDI & BONINI, 2000; BIAZE *et al.*, 2003; SILVA & VARGAFTIG, 2005).

2.3 PATOGÊNESE

A asma está associada à resposta imune do tipo Th2, envolvendo eosinofilia, mastocitose e elevação dos níveis de IgE desencadeada por alérgenos (SILVEIRA *et al.*, 2002). O alérgeno quando entra em contato com as células apresentadoras de antígeno, é capturado e processado, permitindo a sua apresentação para linfócitos T CD4⁺ via MHCII, levando à ativação e à diferenciação destes em linfócitos Th2 (SILVA & VARGAFTIG, 2005). A recirculação de linfócitos entre diferentes superfícies mucosas é um dos componentes mais importantes do sistema imune pois permite que as respostas locais sejam integradas em rede.

Segundo Kumar e colaboradores (2000), a seqüência de eventos que desencadeiam a asma, inicia-se com a produção de IgE pelos linfócitos B em resposta à primeira exposição ao antígeno, chamada de sensibilização. Esta produção elevada de IgE é atribuída à interação entre linfócitos T e B que resulta no amadurecimento dos linfócitos B e na sua diferenciação em células secretoras de anticorpos. Durante a diferenciação, a célula B altera a expressão da classe da cadeia pesada, deixando de ser uma célula produtora de IgM para ser secretora de IgE. A mudança de classe para IgE é dependente das citocinas IL-4 e IL-13 secretadas pelos linfócitos Th2 ativados, que se ligam a seus receptores na superfície dos linfócitos B, desencadeando vias de sinalização intracelular que culminam com a translocação para o núcleo de fatores de transcrição que se ligam ao gene codificante da região constante da cadeia pesada do isotipo IgE (UNANUE & BENACERRAF, 1986). Além desse primeiro sinal, é necessária a interação entre a proteína transmembrana CD40L na superfície dos linfócitos T ativados com o receptor CD40, molécula co-estimulatória dos linfócitos B, para promover um desvio de produção de anticorpos da classe IgM para

IgE nos linfócitos B e sua proliferação (ROITT, 1994).

Durante uma posterior exposição do organismo ao alérgeno, ocorre a ligação cruzada entre o alérgeno-IgE específico e a IgE ligada ao seu receptor Fc de alta afinidade (Fc ϵ) na superfície dos mastócitos e basófilos, ativando-os e causando liberação de mediadores químicos. Além das citocinas IL-4 e IL-13, há o aumento da produção de IL-1, IL-5, IL-8 e de TNF- α (BARNES, 2001; BIAZE *et al.*, 2003; ROMAGNANI, 2002).

Entre as múltiplas substâncias liberadas imediatamente ou secretadas logo após a ativação dos mastócitos, incluem-se a histamina, a substância de reação lenta da anafilaxia, substâncias quimiotáticas para eosinófilos e neutrófilos, proteases, heparina e fatores de ativação plaquetária. Esses fatores causam fenômenos como dilatação de vasos sanguíneos locais, atração de eosinófilos e neutrófilos para o local da reação, lesão de tecidos locais pela protease, aumento da permeabilidade capilar e perda de líquidos para os tecidos, e contração de células musculares lisas locais, que, coletivamente, causam o aumento da permeabilidade vascular, broncoconstricção, contração da musculatura lisa, aumento na produção de muco e inflamação local (PAWANKAR, 1999; SILVA & VARGAFTIG, 2005). O eosinófilo desempenha um papel central na patogenia das doenças alérgicas por ser uma potente célula efetora citotóxica. Este tipo celular possui um reservatório de proteínas básicas, assim como de mediadores lipídicos e radicais de oxigênio, com grande poder de destruição tecidual e parasitário, podendo causar lesão tecidual (LOPES *et al.*, 2006). Sua função é estimulada por mediadores lipídicos e citocinas liberadas por outras células. A figura 1 esquematiza os eventos que ocorrem tanto na fase aguda quanto na fase tardia da asma, que leva a broncoconstricção, edema e inflamação.

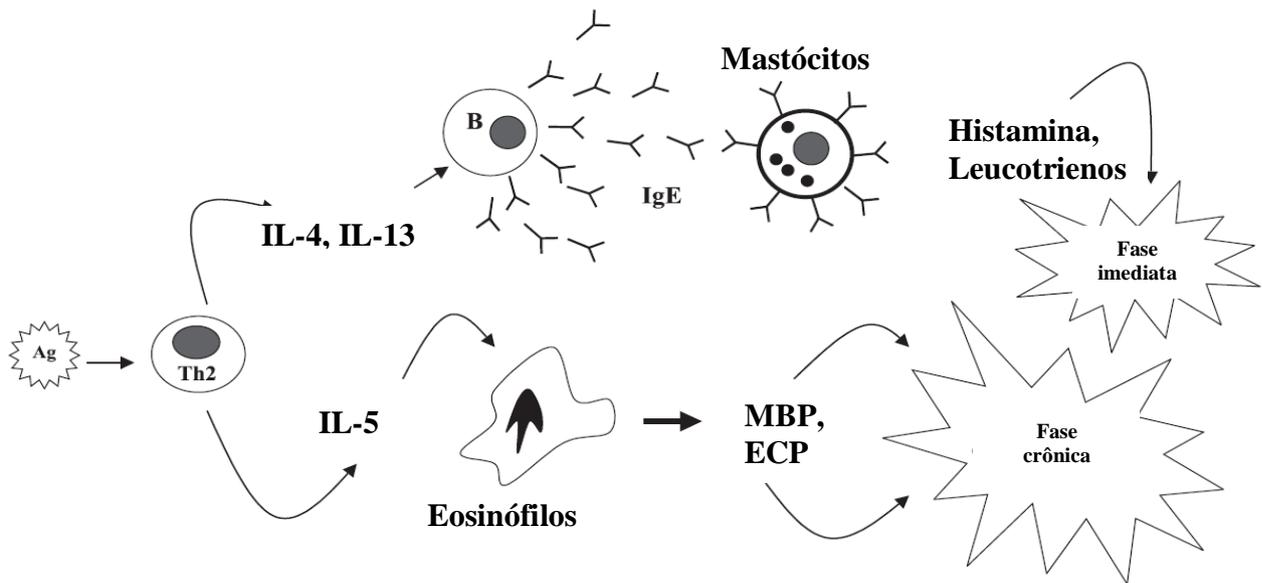


Figura 1. Esquema de ativação de linfócitos Th2 por alérgeno e desencadeamento da fase aguda e fase crônica da asma brônquica. Fonte: Modificada de Biaze *et al.*, 2003

Estudos ultraestruturais com o uso de anticorpos monoclonais revelaram que a espessura da membrana basal verdadeira está inalterada na asma, ocorrendo na verdade uma deposição de fibras colágenas, o que lhe confere a aparência de espessamento à microscopia ótica (SILVA & VARGAFTIG, 2005). Enquanto na membrana basal verdadeira os miofibroblastos secretam colágeno tipo IV, fibronectina e laminina, na asma, o colágeno subepitelial consiste predominantemente nos tipos III e V, fibronectina, mas não há laminina. Os miofibroblastos são ativados por diversos componentes da resposta inflamatória, como mastócitos, eosinófilos e macrófagos. Os principais componentes do remodelamento brônquico da asma são: alteração do depósito/degradação de componentes da matriz extracelular, neovascularização da submucosa, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, hiperplasia de glândulas mucosas e alterações do epitélio brônquico (TEMELKOVSKI *et al.*, 1998; WARD *et al.*, 2002; HOMER & ELIAS, 2005).

2.4 TRATAMENTO

De acordo com Vianna (1998), as recomendações para o tratamento da asma são baseadas em quatro componentes: uso de medidas objetivas da função pulmonar para avaliar a gravidade da asma e monitorar o curso da terapia; controle ambiental para evitar ou eliminar fatores desencadeantes de sintomas ou crises; terapia farmacológica à longo prazo, para tratar e prevenir inflamação das vias aéreas e, também, para tratar as re-

agudizações; e educação do paciente, criando uma parceria entre o paciente, a família e o médico. A maioria dos fármacos disponíveis para o tratamento da asma é dividida em agentes broncodilatadores e antiinflamatórios, descritos resumidamente abaixo.

Os agonistas β_2 , de ação prolongada, estimulam receptores do tipo β_2 -adrenérgico, que predominam nos pulmões de seres humanos, resultando em aumento do AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) intracelular, que causa o relaxamento da musculatura lisa, o aumento da frequência do batimento ciliar e a redução da viscosidade do muco (CARDOSO, 2005). Apesar dos aspectos positivos, existem alguns problemas que limitam os benefícios desses medicamentos, como a presença dos receptores β_2 em muitos tecidos, causando efeitos indesejáveis pela absorção sistêmica destes agonistas.

A teofilina, droga antiasmática mais prescrita no mundo, exerce inúmeros efeitos importantes e, entre estes, inclui-se o efeito broncodilatador, devendo seus mecanismos de ação estar relacionados ao aumento de AMPc no músculo liso brônquico e à inibição não seletiva das fosfodiesterases (CARDOSO, 2005). Este fármaco tem também efeitos antiinflamatório e imunomodulador. Entretanto, a teofilina e outras xantinas têm uma margem terapêutica estreita, a partir disso alguns efeitos indesejáveis podem aparecer, tais como, convulsão, hipertermia, dano cerebral e morte.

Por reduzir a reatividade brônquica e recuperar a integridade das vias aéreas, o tratamento a base de corticóide é o mais eficaz, atuando por múltiplos mecanismos de ação, tais como a inibição da produção de citocinas e quimiocinas, a supressão da produção de proteínas inflamatórias e de ativadores de fatores de transcrição (BARNES, 2001; BOYTON e ALTMANN, 2004). Segundo Vianna (1998), a vantagem da utilização de corticóides no tratamento da asma reside também na alta proporção da droga inalada que atinge as células alvo, comparada à proporção que atinge a circulação sistêmica. Outras características desejáveis nos corticóides são seus rápidos metabolismo e eliminação da porção que atinge a circulação sistêmica.

Embora os corticóides apresentem uma alta eficácia no tratamento das alergias, alguns efeitos moleculares e celulares adversos, como supressão adrenal, desmineralização óssea, alterações do metabolismo dos carboidratos e redução do crescimento linear de crianças continuam sendo uma fonte de preocupação com a sua utilização crônica (VIANNA, 1998). A falta de adesão ao tratamento com corticóides pelo medo do uso prolongado, pelo seu custo e por fatores ligados ao uso crônico da medicação, além da insensibilidade aos corticosteróides presente em alguns pacientes são implicados no insucesso terapêutico. Lima e colaboradores (2002), ao compararem os dados referentes ao

uso de corticóides ao aumento do índice de mortalidade, em países como o Reino Unido e Itália, evidenciaram a baixa eficácia dos antiasmáticos clássicos utilizados no tratamento sintomático dessa patologia, confirmando a urgente necessidade de novas estratégias terapêuticas a fim de se obter melhores tratamentos curativos e/ou preventivos da asma. Para tanto, a indústria farmacêutica continua buscando novas opções medicamentosas, que permitam ampliar o espectro terapêutico e superar as barreiras na adesão ao tratamento.

Uma nova classe de medicamento no tratamento das alergias são os imunomoduladores monoclonais. Aprovado para uso clínico, o omalizumabe - um anticorpo anti-IgE - atua impedindo a fixação da IgE ao receptor de alta afinidade dos mastócitos e basófilos. Os receptores de alta afinidade que não foram ocupados parecem influenciar a redução da sua própria síntese, em mecanismo ainda não esclarecido, fazendo com que, ao longo do tempo, o mastócito esteja menos disponível à degranulação mediada pela IgE (SARINHO & CRUZ, 2006). Apesar de seu uso clínico, o omalizumabe tem levantado algumas questões que merecem atenção, como a não responsividade de alguns pacientes ao tratamento, apesar da redução da IgE total livre, e a necessidade de continuação do tratamento a base de corticóide, mesmo em baixas doses (HOLGATE *et al.*, 2004; CASALE *et al.*, 2006; CHANG & SHIUNG, 2006).

2.5 DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS A PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS

É de fundamental importância conhecer e preservar os biomas brasileiros, uma das maiores riquezas do país, que possui uma extensão territorial de 8.500.000 Km² coberta em 40% ainda da sua área por floresta nativa (GIULIETTI *et al.*, 2005). Apesar da magnitude da biodiversidade brasileira não ser conhecida em sua plenitude, Simões e colaboradores (2001) estimam a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos, o que confere ao Brasil o título de maior diversidade genética vegetal do mundo. Como as oportunidades para identificação de produtos com possível utilização econômica aumentam proporcionalmente com a diversidade das espécies, a biodiversidade do Brasil se mantém como uma fonte de matéria-prima inestimável.

A OMS define planta medicinal como qualquer planta que possua em um ou em vários de seus órgãos substâncias usadas com finalidade terapêutica, ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. O efeito terapêutico que a planta medicinal possui é responsabilidade dos princípios ativos dela extraídos e purificados. Estes princípios ativos possuem funções ecológicas

importantes para a sobrevivência da espécie, e quase todos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas (MONATANARI & BOLZANI, 2001).

O uso de plantas medicinais na terapêutica é muito antigo, e está intimamente relacionado à própria evolução da espécie humana. Para utilizarem as plantas como medicamentos, as civilizações antigas valiam-se de suas próprias experiências empíricas de acerto e erro, e da observação do uso de plantas pelos animais (OLIVEIRA *et al.*, 2006). No século XVI, os médicos eram verdadeiros botânicos, pois a maior parte dos remédios era preparada a partir de plantas medicinais, também chamadas “simples”. As faculdades de medicina tinham sempre um “jardim dos simples”, onde se ensinava os futuros médicos a conhecer e cultivar as plantas medicinais que lhes seriam necessárias para curar os doentes (BIESKI, 2005). O desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas, com base científica (MONTANARI & BOLZANI, 2001). Isso resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas conhecidas como medicinais, tais como a morfina, a quinina, a cânfora e a cocaína, ainda muito empregados no tratamento de certas doenças.

Segundo Montanari e Bolzani (2001), apesar da natureza de forma geral produzir a maioria das substâncias orgânicas conhecidas, o reino vegetal tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças. O reino vegetal é uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Alcalóides vegetais têm se mostrado especialmente efetivos quanto as suas propriedades medicinais e se encontram amplamente distribuídos em espécies de plantas tropicais. Como exemplo, temos a vincristina e a vimblastina, extraídas do *Catharanthus roseus*, efetivas no tratamento da leucemia infantil (ROSSI-BERGMANN *et al.*, 1997).

O bioma Caatinga, que na língua indígena tupi-guarani quer dizer Mata Branca, está localizado na região nordeste do Brasil, ocupando aproximadamente 12% do território nacional. Segundo dados publicados pela Base de Dados Tropicais (BDT), a área abrangida pela Caatinga, a 50 anos atrás, era de aproximadamente 1 milhão de km², restando atualmente 734.478 km². O semi-árido brasileiro abriga cerca de oito mil espécies vegetais, e destas poucas foram estudadas farmacologicamente. O estudo dessas espécies deverá permitir o seu aproveitamento de maneira racional e poderá contribuir para a obtenção de novas descobertas no campo dos produtos naturais com reflexo na valorização

sócio-econômica desta região e, conseqüentemente, do Brasil (SÁ, 2005). Aliada à pouca informação acerca das propriedades farmacológicas das espécies vegetais, há a necessidade da busca de novas substâncias imunossupressoras e imunoestimuladoras, uma vez que as drogas usadas rotineiramente no tratamento de tumores, rejeição de transplantes, doenças autoimunes e alergias possuem efeitos tóxicos colaterais indesejáveis.

Priorizando projetos que visam o desenvolvimento da ciência, tecnologia e informação, o MCT/CNPq financiou o projeto de pesquisa Instituto do Milênio do Semi-árido (IMSEAR) proposto pela Universidade Estadual de Feira de Santana que contou com a participação de 23 instituições nacionais. O IMSEAR teve como um dos principais objetivos contribuir para o conhecimento dos recursos naturais da região, especialmente flora, fauna e recursos hídricos, visando à sua conservação e utilização racional (AGECOM, 2005). Uma das suas vertentes foi o Programa de Bioprospecção que objetivou encontrar novas biomoléculas com ação em doenças de alta incidência na população através de análises fitoquímicas, farmacológicas, imunológicas e toxicológicas. Resultados preliminares de ensaios com moléculas disponibilizadas pelo IMSEAR realizados no LETI/CPqGM/FIOCRUZ demonstraram a capacidade de imunomodulação pela inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos ativados e inibição da proliferação de linfócitos ativados, o que nos levou a investigar sua atividade em modelo de asma brônquica experimental. Na figura 2 estão representadas as estruturas químicas das quatro moléculas testadas no modelo de asma brônquica experimental.

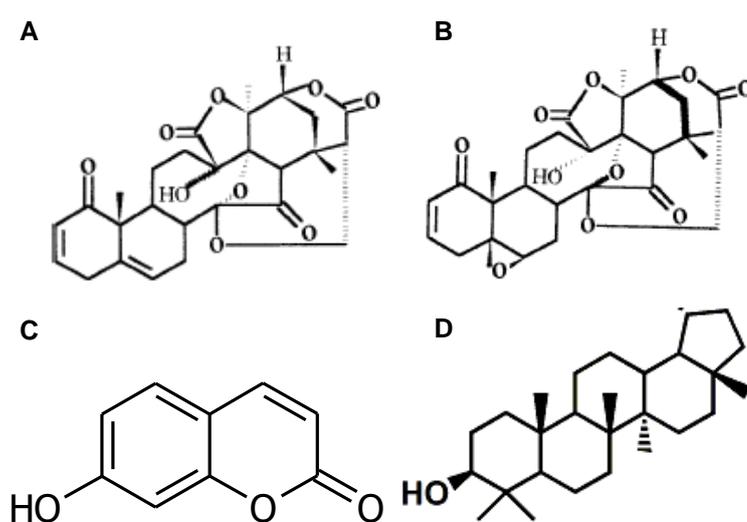


Figura 2. Estrutura química das quatro moléculas testadas em modelo de asma brônquica experimental. A) Fisolina B, B) Fisolina F, C) Umbeliferona e D) Lupeol.

420 MODELOS EXPERIMENTAIS DE ASMA BRÔNQUICA

Até pouco tempo atrás, a investigação dos mecanismos patofisiológicos na asma crônica era limitada pela falta de modelos animais satisfatórios. Além dos seres humanos, outros animais não desenvolvem asma espontaneamente. Cavalos e gatos, por exemplo, podem apenas desenvolver algumas síndromes respiratórias com alguma similaridade à asma humana. Segundo Temelkovski e colaboradores (1998), foram feitas muitas tentativas de estabelecer modelos de asma em primatas, ovelhas, coelhos, ratos e camundongos, com poucos resultados interessantes. Dentre os modelos desenvolvidos, os de primatas e ovelhas são considerados os melhores para avaliar a resposta terapêutica em humanos, mas apresentam um alto custo e são difíceis de se comprovar a usência de infecções sub-clínicas.

Os camundongos são amplamente utilizados como modelos experimentais por apresentarem uma resposta alérgica que se assemelha, em certos aspectos, à asma humana, incluindo as respostas de fase aguda e de fase tardia e a hiperresponsividade brônquica (BRAUN e TSCHERNIG, 2006; CONEJERO *et al.*, 2007). Além disso, a revolução científica e o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular possibilitaram a produção de camundongos transgênicos e nocautes e o desenvolvimento de ferramentas específicas para a experimentação em camundongos, como os anticorpos monoclonais (BRAUN e TSCHERNIG, 2006).

Vários modelos de inflamação broncopulmonar alérgica em ratos e camundongos têm sido descritos, sendo aqueles baseados em sensibilização sistêmica de proteína antigênica como a ovalbumina e subsequente desafio por inalação, de grande aceitação. Nesses modelos, o desenvolvimento de eosinofilia, da hiperreatividade aérea após o estímulo colinérgico e o aumento na produção de IL-4 e IL-5 têm sido demonstrados (ELWOOD *et al.*, 1991; GERHOLD *et al.*, 2002).

Nesse estudo foi utilizado um modelo murino de asma brônquica crônica, modificado a partir do protocolo de Das e colaboradores (1997) que mimetiza, em muitas características, a doença humana. Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c por serem geneticamente conhecidos pelo desenvolvimento de resposta predominantemente Th2, a fim de se investigar a atividade farmacológica das fisalinas B e F, da umbeliferona e do lupeol, quatro substâncias puras obtidas a partir de plantas do semi-árido brasileiro que foram previamente triadas quanto a atividades imunomoduladoras, na modulação da asma brônquica experimental.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, com 4 a 6 semanas de vida, criados e mantidos no biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, com suprimento de água e ração *ad libitum*. Todos os protocolos utilizados foram aprovados pelo comitê de ética do CPqGM – FIOCRUZ.

3.2 OBTENÇÃO DAS DROGAS

O lupeol e a umbeliferona foram gentilmente fornecidos pelo Dr. José Maria Barbosa Filho, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, da Universidade Federal da Paraíba, que obteve as mesmas a partir das espécies *Diploptropis ferruginea* e *Typha dominguensis*, respectivamente. As fisalinas B e F foram purificadas a partir da *Physalis angulata* e foram cedidas pela Dra. Terezinha Tomassini, de FarManguinhos – FIOCRUZ/RJ, obtidas conforme descrita por Soares e colaboradores (2002).

3.3 SENSIBILIZAÇÃO

Com exceção do grupo normal, todos os animais foram sensibilizados com 10 µg/animal de ovalbumina – OVA (Sigma, St. Louis, MO, USA), diluída em 2 mg/ml de hidróxido de alumínio (AlumImject; Pierce, Rockford, IL). Essa diluição foi realizada gota a gota e a solução final foi homogenizada com o auxílio de um agitador, por 30 minutos. A solução foi injetada por via subcutânea, no volume final de 100 µl/animal no tempo zero do experimento e novamente 14 dias depois.

3.4 DESAFIO

Após quatorze dias da segunda sensibilização, foi realizado o desafio dos animais por via inalatória. Os animais foram colocados dentro de uma caixa de acrílico transparente confeccionada para este fim. Esta caixa adaptada possui dois orifícios, sendo um de entrada e outro de saída, de forma a evitar o aumento da pressão interna quando na entrada de gases. No orifício de entrada foi acoplada a mangueira do aparelho inalador ultrassônico RespiraMax (NS, Brasil). Esse aparelho tem a capacidade de liberar partículas de 5 microns, tamanho de partícula ideal para a inalação. O desafio foi realizado pela inalação de uma solução salina contendo 1% OVA, por 15 minutos diários, durante seis dias consecutivos.

3.5 TRATAMENTO

Os camundongos receberam tratamento com dexametasona (30 mg/kg) ou com 60 mg/kg de fisalina B, fisalina F, umbeliferona ou lupeol por via oral, durante seis dias consecutivos, começando 24 horas antes do primeiro desafio e 2 horas antes da cada desafio. As drogas foram diluídas em solução salina contendo 10% DMSO (Sigma, St. Louis, MO, USA). Os animais do grupo salina foram tratados com o mesmo diluente usado como veículo para as drogas.

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O modelo experimental de asma brônquica desenvolvido em animais da linhagem BALB/c sensibilizados e desafiados com OVA está resumido na figura 2. Durante o desafio, os animais foram divididos nos seguintes grupos: salina, dexametasona, fisalina B, fisalina F, umbeliferona e lupeol. Para comparar resultados encontrados aos parâmetros basais, foi adicionado um grupo normal, não sensibilizado, não desafiado e nem tratado. O tratamento precedeu cada desafio, sendo os animais sacrificados entre 24 e 48 horas após o último desafio, período em que a celularidade atingia seu pico. O lavado broncoalveolar foi realizado para dosagem de citocinas e contagem de células. Após a realização do lavado, o pulmão foi coletado para análise histológica e morfométrica.

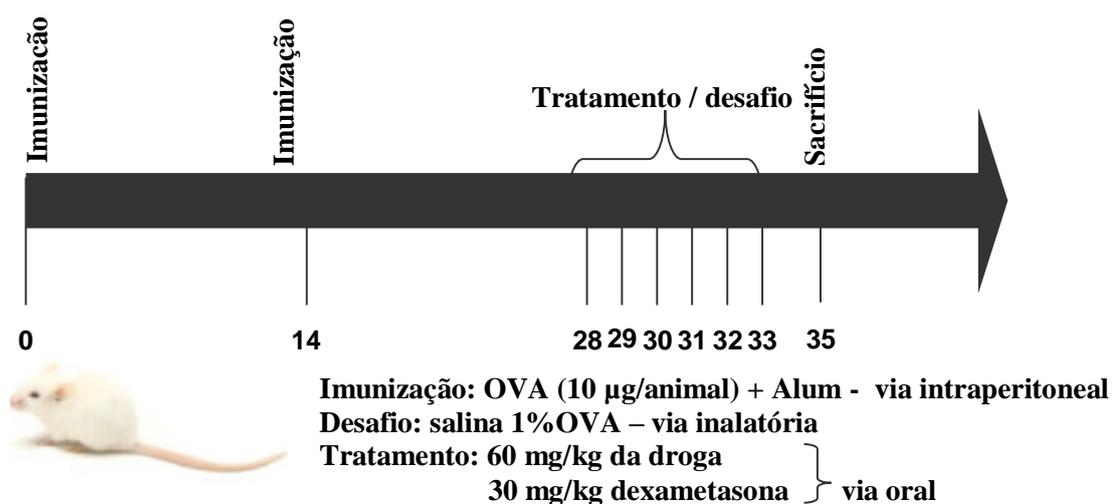


Figura 3. Delineamento experimental do teste farmacológico de moléculas de origem vegetal em modelo de asma brônquica experimental.

3.7 OBTENÇÃO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

Os camundongos foram sacrificados através da injeção letal de tiopental sódico (Cristália, São Paulo) por via intraperitoneal. Posteriormente, a pele do abdômem e tórax foi retirada para exposição da traquéia. Um volume de 1 mL de PBS gelado foi injetado na traquéia com uma agulha (25x7) e aspirado novamente, repetindo-se o mesmo processo por três vezes. O líquido recuperado foi colocado em um tubo plástico Eppendorf em banho de gelo, posteriormente centrifugado a 1500 r.p.m. por 10 minutos à 10° C para coleta de sobrenadante para quantificação de citocinas. Mais 1 ml de PBS gelado foi injetado pela traquéia para repetição da lavagem do pulmão e para a contagem de células no LBA, as células do primeiro lavado foram somadas às do segundo para quantificação.

3.8 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NO LBA

A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, sendo o valor final representado pela média dos quatro quadrantes. Para contagem diferencial de leucócitos, o LBA foi citocentrifugado e as lâminas preparadas foram coradas com panótico para observação dos tipos celulares presentes. As células foram observadas em microscópio óptico e identificadas pela sua morfologia, sendo contadas 200 células por lâmina para verificação do percentual de eosinófilos no LBA.

3.9 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

As citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 foram quantificadas no LBA pela técnica de ELISA sanduíche usando kits Duoset ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, EUA) para cada citocina. Resumidamente, placas de 96 poços (NUNC – IMMUNO PLATE Maxisorp Surface) foram sensibilizadas com 50 µL do anticorpo de captura (anticorpo monoclonal purificado anti-citocina investigada), diluído em PBS, a 4°C durante a noite. As placas foram lavadas por 3x com PBS 0,05% Tween 20 (Sigma) e foi adicionado 100 µL da solução de PBS contendo 1% de BSA (Sigma) por 1-2 horas à temperatura ambiente, a fim de bloquear sítios não específicos. As placas foram lavadas mais uma vez e foram incubadas com 50 µL das amostras/poço em duplicata e da citocina padrão em várias concentrações por 12 horas à 4° C. Após a lavagem das placas, foi adicionado o anticorpo anti-citocina biotilado e as placas foram incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente. Após as lavagens, foi adicionado 50 µL/poço de estreptoavidina diluída 1:200, por 20 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagens, a reação foi revelada com 50 µL/poço de solução reveladora contendo 10 mL de tampão

citrato-fosfato 1 M, 2 μ L de H₂O₂ e uma pastilha TMB (Sigma). O bloqueio da reação foi feito através da adição de 50 μ L/poço de ácido fosfórico 1:20. A leitura da densidade óptica foi determinada por espectrofotômetro (Spectra Max 190 - Molecular Devices, Califórnia, EUA), no comprimento de onda de 450 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1 (Molecular Devices).

3.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os pulmões foram perfundidos com paraformaldeído a 4%, através da traquéia, com ajuda de uma seringa. Com o abdômem aberto, o diafragma foi exposto e um pequeno corte foi realizado. O diafragma foi rebatido e procedeu-se à abertura do tórax paralelo ao esterno, retirando-se o pulmão cuidadosamente. Os pulmões foram então fixados em solução de paraformaldeído a 4% por 48 horas. Fragmentos de pulmão foram emblocados em parafina e os cortes histológicos foram corados por hematoxilina e eosina (H&E), para quantificação da inflamação e observação de eosinófilos no tecido, e pela técnica de ácido periódico de Schif (PAS) para quantificação de muco. Foram selecionados 5 campos microscópicos (400x) de cada animal, e as células do infiltrado inflamatório foram contadas em duas áreas de 1 mm² em cada campo, sendo sua densidade expressa como número de células inflamatórias/mm². Para a quantificação do percentual de muco presente, 5 bronquíolos de cada animal foram fotografados (200x) e o percentual da área do bronquíolo marcada por PAS foi quantificado em relação à área total da imagem. Todas as imagens foram registradas com a ajuda de uma câmera (CoolSnap cf) acoplada ao microscópio BX41 (Olympus, Tóquio, Japão). As análises foram feitas utilizando o programa Image Pro (versão 6.1; Media Cybernetics, San Diego, CA).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente com o auxílio do programa Graphpad Prism 4. Foram feitas análises usando o teste t de Student ou ANOVA seguido do pós-teste Mann-Whitney, sendo os resultados considerados significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EFICÁCIA NA INDUÇÃO DE ASMA BRÔNQUICA

Foi observado um aumento da celularidade no LBA em camundongos imunizados e desafiados com OVA em relação ao LBA de animais normais (Fig. 4A). As células encontradas no LBA dos animais normais foram predominantemente células do epitélio brônquico, poucos macrófagos e nenhum eosinófilo, enquanto que no LBA dos animais imunizados foram encontrados cerca de 5% de células epiteliais, aproximadamente 25% de linfócitos, 25% de macrófagos e 42% de eosinófilos. O aumento significativo do número de eosinófilos encontrados entre os dois grupos estudados (Fig. 4B) indica, portanto, o desencadeamento de um quadro alérgico.

Figura 4

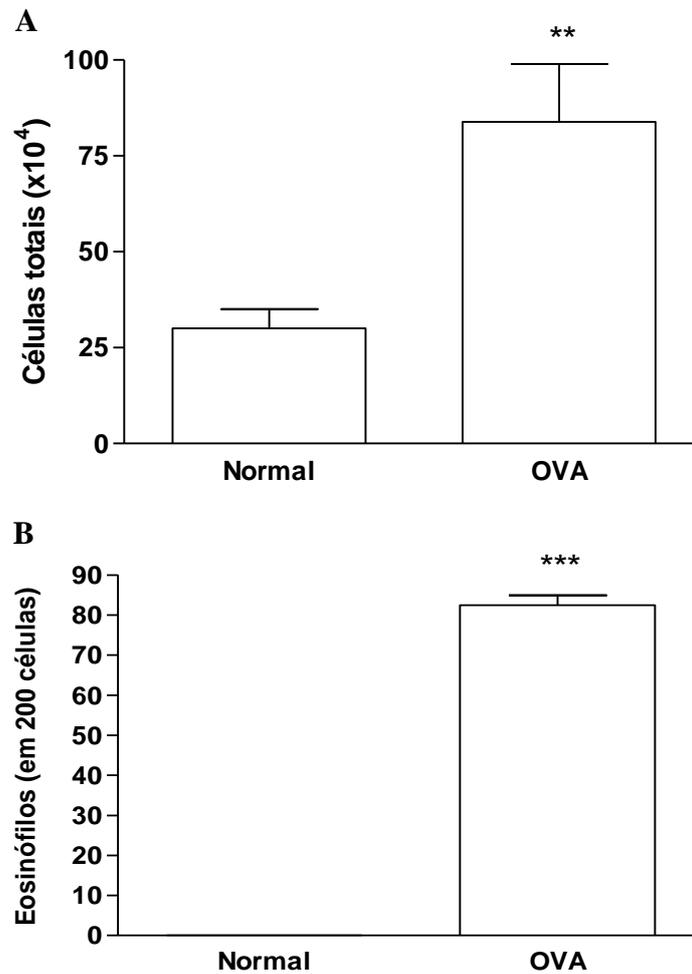


Figura 4. Indução de asma brônquica experimental. Leucócitos obtidos do LBA de camundongos da linhagem BALB/c normais ou sensibilizados e desafiados com ovalbumina foram utilizados para a quantificação de leucócitos totais (A), realizada em câmara de Neubauer, e para a quantificação de eosinófilos (B), realizada em lâminas citocentrifugadas do LBA após coloração por panótico. Os dados representam a média \pm SEM de 10 animais por grupo. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

4.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS SUBSTÂNCIAS PURAS TESTADAS NA CELULARIDADE DO LBA

Em um primeiro experimento, foram avaliados os efeitos das fisalinas B e F na asma brônquica. Um número elevado de eosinófilos foi encontrado no LBA de animais tratados com fisalinas B ou F (Fig. 5C e D), que não diferiu do número encontrado no LBA do grupo controle tratados apenas com salina (Fig.5A). A contagem total das células no LBA (figura 7A) demonstra que o tratamento com fisalina B ou F não diminuiu a celularidade no LBA em comparação ao grupo tratado apenas com o veículo. O perfil das células presentes no LBA após tratamento com fisalinas B ou F foi semelhante àquele encontrado nos animais do grupo salina, sendo observados 40-50% de eosinófilos, 30% de macrófagos, 20% de linfócitos e 5-10% de células epiteliais. Nas amostras dos animais controle (salina), foram encontrados 50-70% de células epiteliais, 20% de macrófagos e não foram detectados linfócitos. Na figura 7B podemos observar o número de eosinófilos encontrados no LBA após tratamento com as fisalinas B ou F, que não foi estatisticamente diferente do grupo tratado com o veículo. Já o tratamento com a dexametasona, droga padrão utilizada como controle positivo, causou a diminuição do número de células totais e de eosinófilos de forma significativa (Fig. 5B e 7).

Em outro experimento, foram avaliados os efeitos da umbeliferona e do lupeol no modelo de asma brônquica. Após o tratamento com estas substâncias, houve uma diminuição de eosinófilos no LBA (Fig. 6C e D). O tratamento com umbeliferona diminuiu em cerca de 40% o número total de células no LBA e, após o tratamento com lupeol, houve uma diminuição de 60% da presença de células no lavado, quando comparados ao grupo tratado com o veículo (Fig. 8A). Houve também uma redução de cerca de 85-90% no número de eosinófilos no LBA nos animais após o tratamento com o umbeliferona ou com o lupeol (Fig. 6C e D; Fig. 8B). Quando comparados ao grupo tratado com dexametasona (Fig. 6B), não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de leucócitos totais no LBA de camundongos tratados com umbeliferona (Fig. 8A), e do número de eosinófilos no LBA de camundongos tratados com lupeol (Fig. 8B).

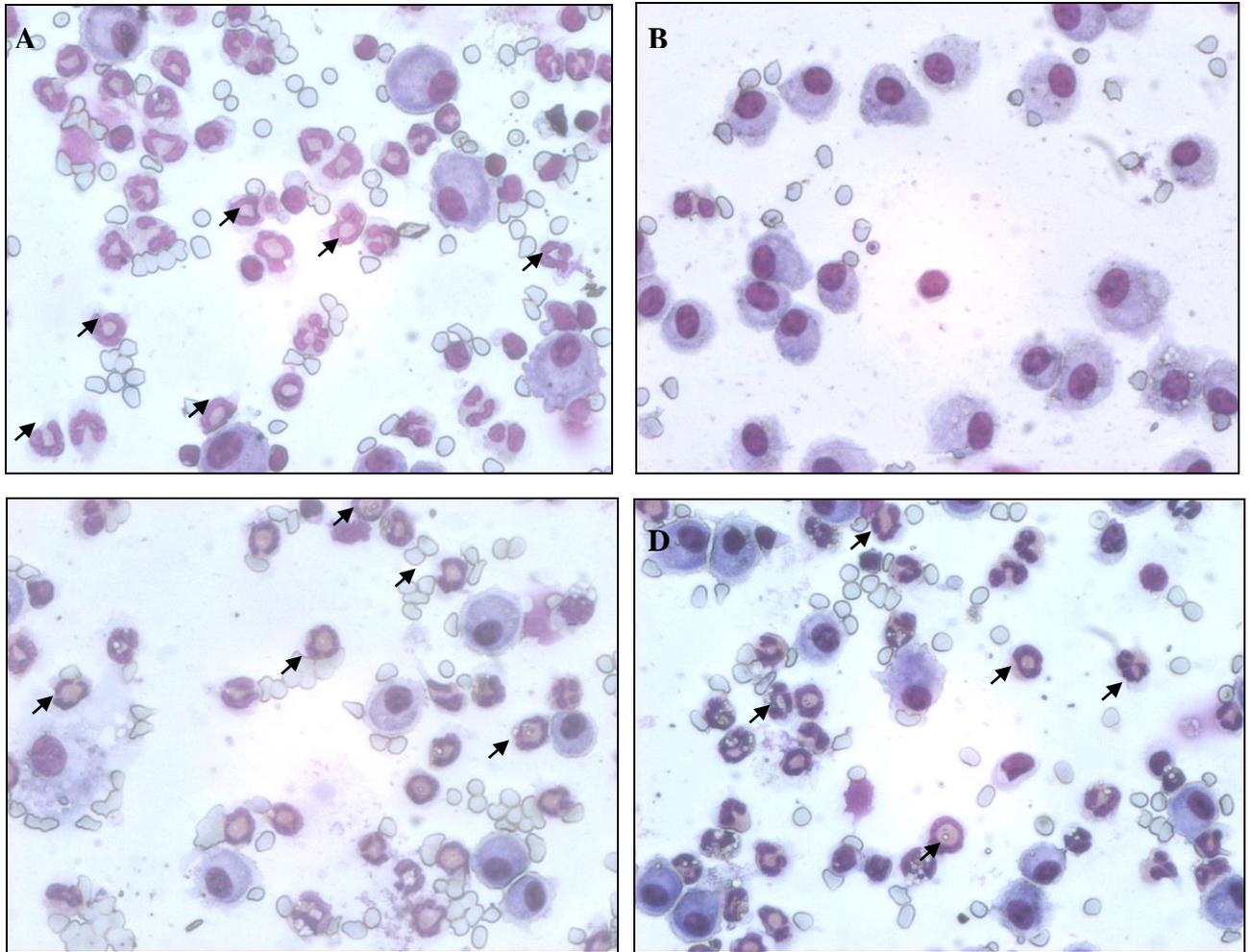
Figura 5

Figura 5. Células do LBA de camundongos asmáticos após o tratamento. As células obtidas do LBA de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de indução asma através da imunização e desafio com ovalbumina e tratados com salina (A), dexametasona (B), fisalina B (C) e fisalina F (D) foram citocentrifugadas e coradas por panótico. Aumento de 1000X. Setas indicam eosinófilos.

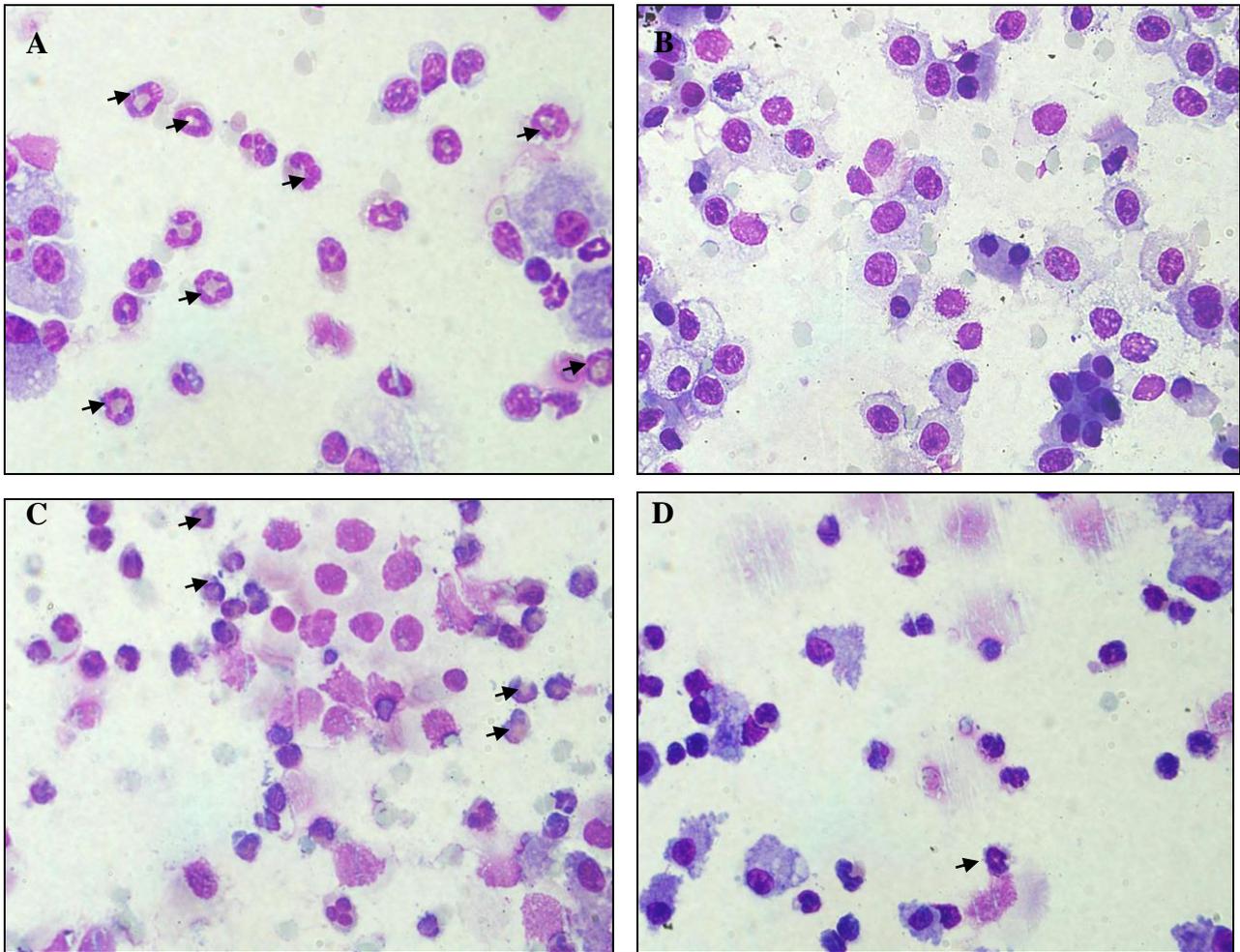
Figura 6

Figura 6. Células do LBA de camundongos asmáticos após o tratamento. As células obtidas do LBA de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de indução de asma através da imunização e desafio com ovalbumina e tratados com salina (A), dexametasona (B), umbeliferona (C) e lupeol (D) foram citocentrifugadas e coradas por panótico. Aumento de 1000X. Setas indicam eosinófilos.

Figura 7

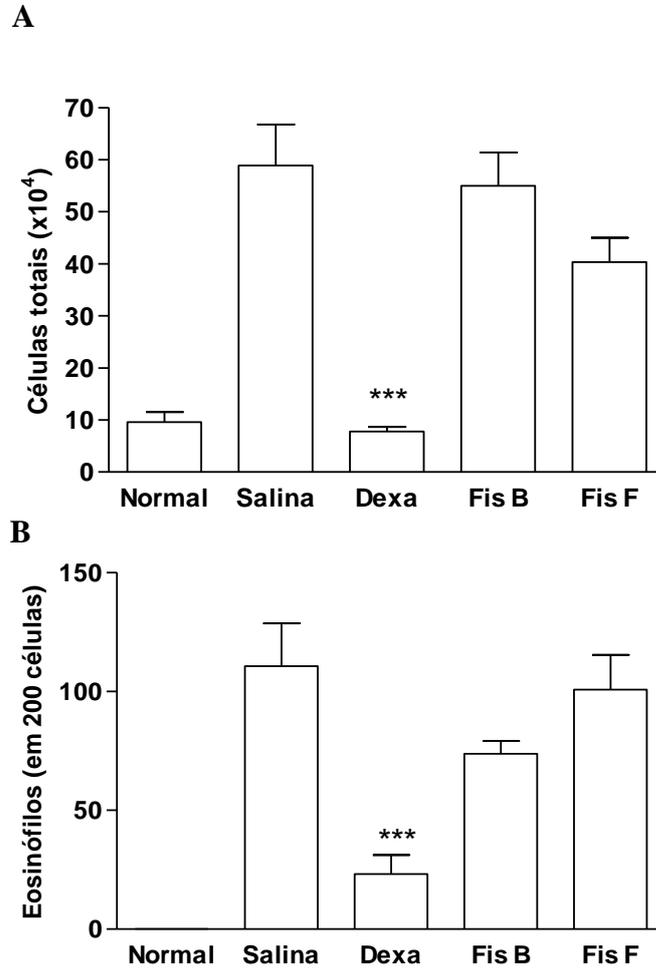


Figura 7. Quantificação da celularidade no LBA de animais asmáticos tratados com fisalinas B e F. Leucócitos obtidos do LBA de camundongos da linhagem BALB/c dos diferentes grupos controles e dos animais tratados com dexametasona (Dexa) e com fisalinas B (Fis B) e F (Fis F) foram quantificados em câmara de Neubauer (A). A quantificação de eosinófilos foi realizada em lâminas citocentrifugadas do LBA após a coloração por panótico (B). Os dados representam a média \pm SEM de 10 animais por grupo. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo tratado com salina.

Figura 8

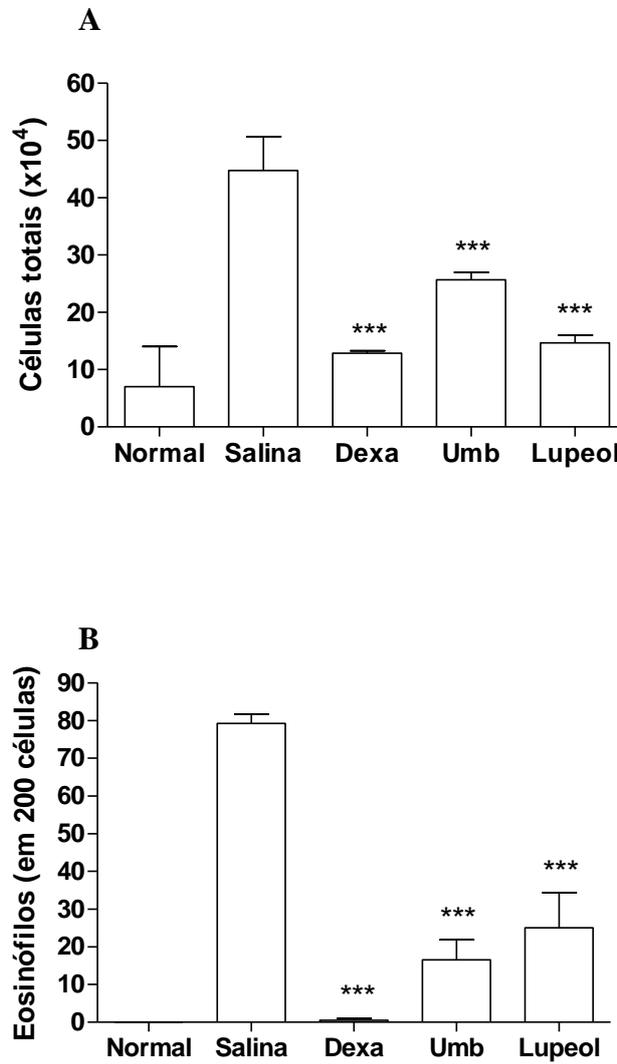


Figura 8. Quantificação da celularidade no LBA de animais asmáticos tratados com umbeliferona ou com lupeol. Leucócitos obtidos do LBA de camundongos da linhagem BALB/c dos diferentes grupos controles e dos animais tratados com dexametasona (Dexa), com umbeliferona (Umb) e lupeol foram quantificados em câmara de Neubauer (A). A quantificação de eosinófilos foi realizada em lâminas citocentrifugadas do LBA após a coloração por panótico (B). Os dados representam a média \pm SEM de 7 animais por grupo. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo tratado com salina.

4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO PULMÃO

A análise histopatológica dos pulmões dos animais do grupo tratado com salina mostrou que o desenvolvimento da asma brônquica determinou uma bronquiolite e arteriolite de intensidade média a intensa, com espessamento arteriolar de média intensidade, vasos com proliferação da túnica média, conjuntivo frouxo e íntima lesada, o epitélio brônquico composto quase que absolutamente por um padrão mononuclear e eosinofílico (Fig. 9A). Nos pulmões de camundongos tratados com a droga padrão (dexametasona), raras células inflamatórias são encontradas, e há uma regressão das alterações teciduais observadas no grupo salina (Fig. 9B). Nos grupos tratados com as fisalinas B ou F não houve regressão da inflamação nem das outras alterações encontradas no grupo controle (Fig. 9C e D). Já o tratamento com umbeliferona ou lupeol causou uma diminuição do infiltrado inflamatório, com predomínio apenas de mononucleares, sendo encontrados poucos eosinófilos e uma arterite foi menos (Fig. 9E e F).

Em lâminas coradas por PAS, foi possível observar a produção excessiva de muco nos bronquíolos dos animais tratados apenas com salina (Fig. 10A), que é diminuída com o tratamento com dexametasona (Fig. 10B). O tratamento com as fisalinas B ou F, não causou a diminuição do muco nos grupos tratados (Fig. 10C e D). Já o tratamento com umbeliferona ou lupeol levou a uma diminuição na produção de muco (Fig. 10E e F).

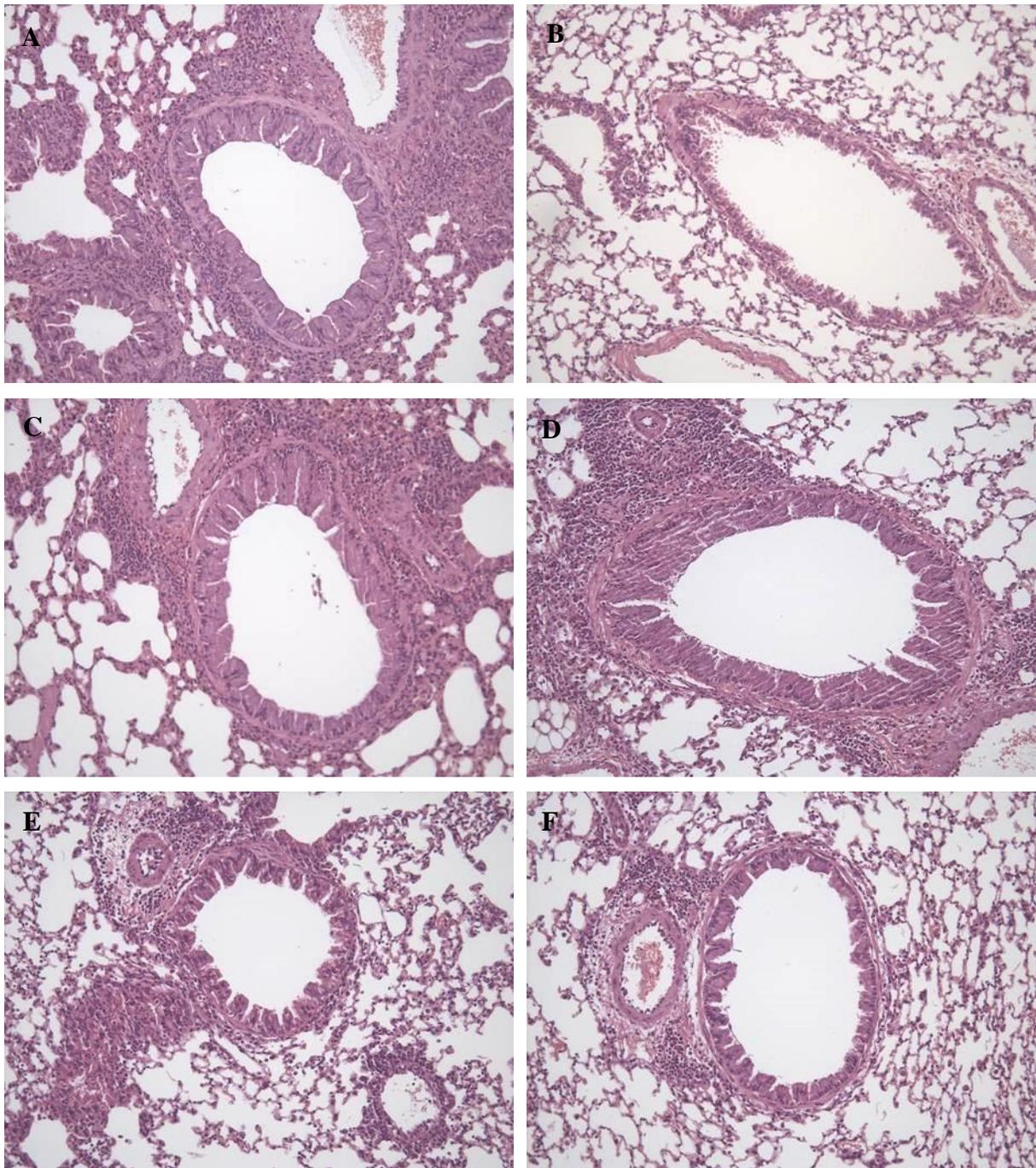
Figura 9

Figura 9: Inflamação em cortes histológicos de pulmões de animais asmáticos após diversos tratamentos. Camundongos da linhagem BALB/c imunizados e desafiados com OVA foram sacrificados para avaliação histopatológica no pulmão após tratamentos com salina (A), dexametasona (B), fisalina B (C), fisalina F (D), umbeliferona (E) e Lupeol (F). H&E, 200x.

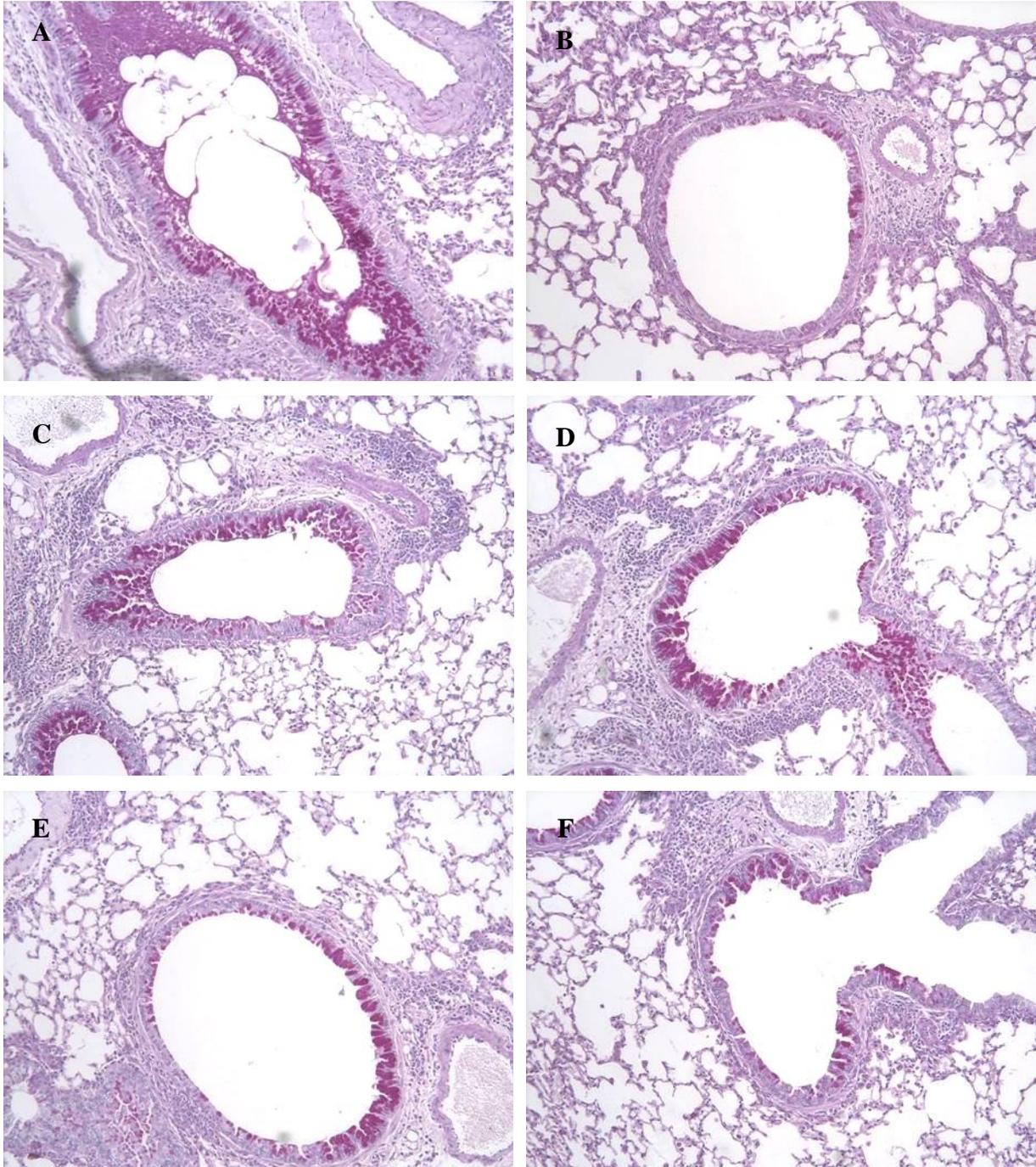
Figura 10

Figura 10: Produção de muco em cortes histológicos de pulmões de animais asmáticos submetidos aos diversos tratamentos. Camundongos da linhagem BALB/c imunizados e desafiados com OVA foram sacrificados para avaliação histopatológica no pulmão após tratamentos com salina (A), dexametasona (B), fisalina B (C), fisalina F (D), umbeliferona (E) e Lupeol (F). PAS, 200x.

4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO PULMÃO

Poucas células inflamatórias e raros eosinófilos foram encontrados nos pulmões de camundongos normais, assim como no grupo tratado com dexametasona. Os pulmões dos animais do grupo tratado apenas com salina apresentaram numerosos eosinófilos no epitélio brônquico. Resultados semelhantes foram encontrados nos animais tratados com as fisalinas B ou F, que mantiveram o mesmo padrão de inflamação do grupo salina, com apenas um pequeno decréscimo de 15% do número de células inflamatórias/mm² (Fig. 11A). Os animais tratados com a fisalina B ou F, assim como aqueles tratados apenas com o veículo, apresentaram um alto percentual de mucopolissacarídeo nos bronquíolos do que aqueles tratados com dexametasona (Fig. 12A).

O tratamento com umbeliferona ou lupeol, no entanto, causou a diminuição do número de células inflamatórias no pulmão, em concordância com a redução observada no LBA (Fig. 11B). Foi observada também uma redução da produção de muco nos bronquíolos de animais que foram tratados com umbeliferona ou lupeol em relação ao grupo controle tratado com salina (Fig. 12B). No entanto, a redução causada por estas duas substâncias foi inferior à causada pela dexametasona em ambos os parâmetros (Fig. 11B e Fig. 12B).

Figura 11

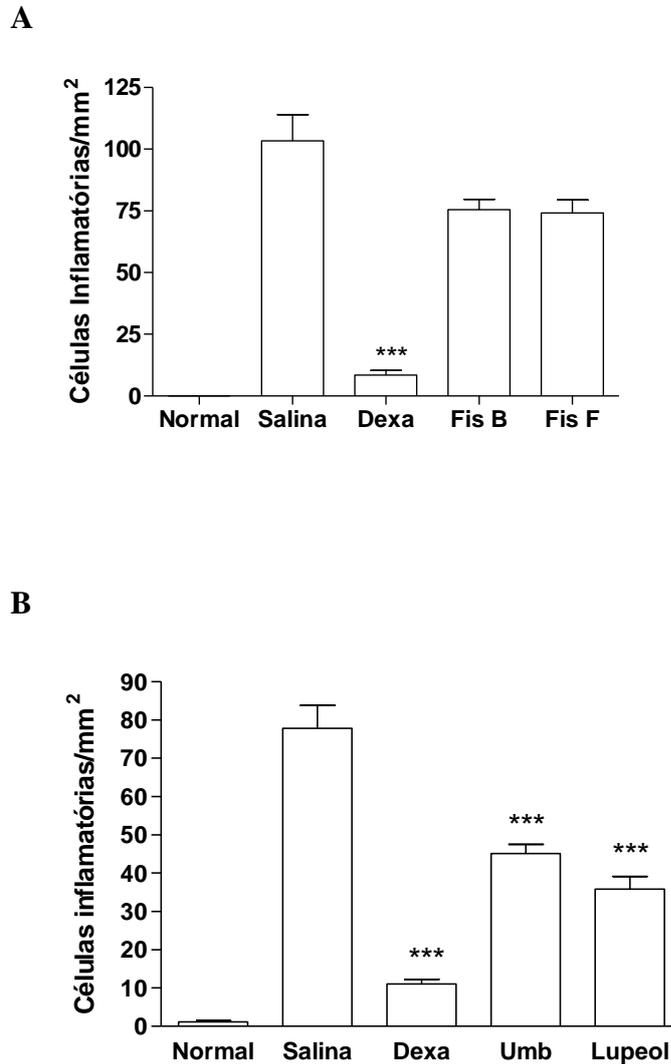


Figura 11: Infiltrado inflamatório no pulmão dos animais dos diferentes grupos experimentais. Camundongos da linhagem BALB/c asmáticos tratados com salina, com dexametasona (Dexa) ou com as drogas testadas e camundongos normais foram sacrificados para avaliação histopatológica do pulmão. A) Tratamento com fisalinas B (Fis B) ou F (Fis F). B) Tratamento com umbeliferona (Umb) ou lupeol. O número de células inflamatórias foi quantificado em lâminas coradas por H&E. Os dados representam a média \pm SEM de 7 animais por grupo. *** p <0,001 em relação ao grupo tratado com salina.

Figura 12

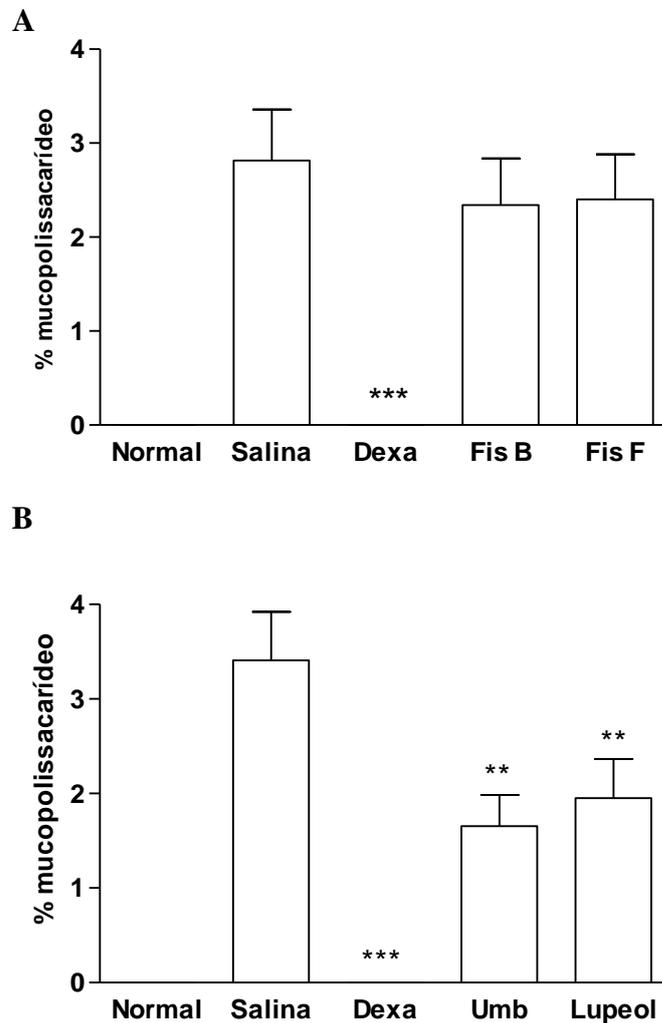


Figura 12: Produção de muco nos bronquíolos dos animais dos diferentes grupos experimentais. Camundongos da linhagem BALB/c asmáticos tratados com salina, com dexametasona (Dexa) ou com as drogas testadas e camundongos normais foram sacrificados para avaliação histopatológica do pulmão em lâminas coradas por PAS. A) Tratamento com fisalinas (Fis B) ou F (Fis F). B) Tratamento com umbeliferona (Umb) ou lupeol. Os dados representam a média \pm SEM de 7 animais por grupo. *** p <0,001 e ** P <0,01 em relação ao grupo tratado com salina.

4.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO LBA.

A produção das citocinas Th2 que têm um papel importante no processo asmático foi avaliada no LBA dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos. em camundongos asmáticos tratados apenas com salina, os níveis destas três citocinas encontravam-se significativamente elevados em relação aos níveis basais avaliados em animais normais, enquanto que o tratamento com dexametasona causou a diminuição destas (Fig 12 e 13). O tratamento com as fisalinas B ou F não causou a diminuição da produção de IL-4 e IL-13 no LBA em relação aos animais tratados apenas com o veículo (Fig. 13A e B). Já o tratamento com umbeliferona e lupeol causou a diminuição significativa de IL-4, IL-5 e IL-13, resultado comparável ao encontrado após tratamento com dexametasona (Fig. 14A-C).

Figura 13

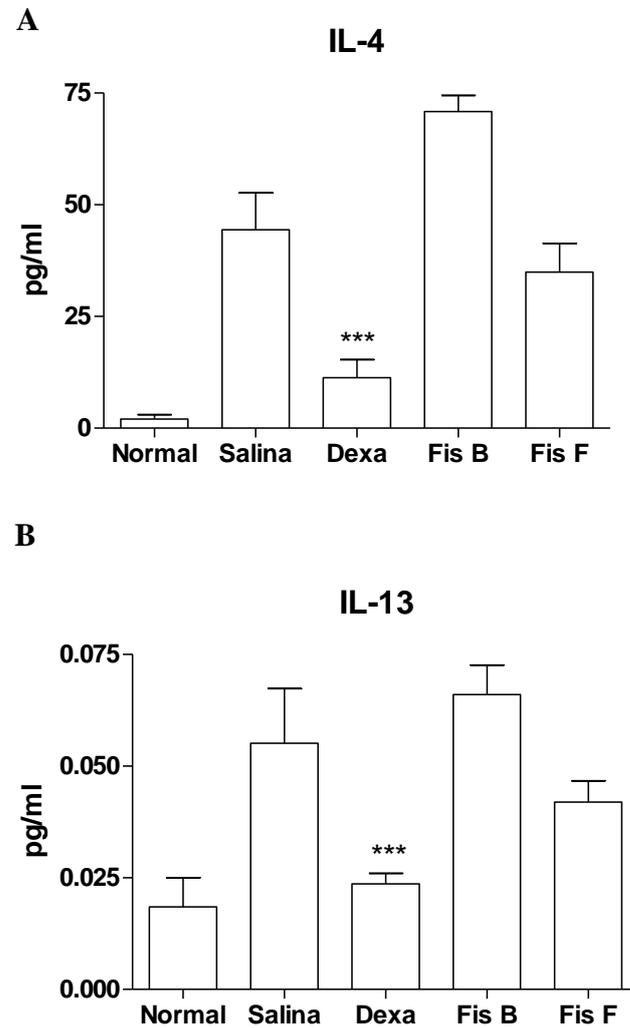
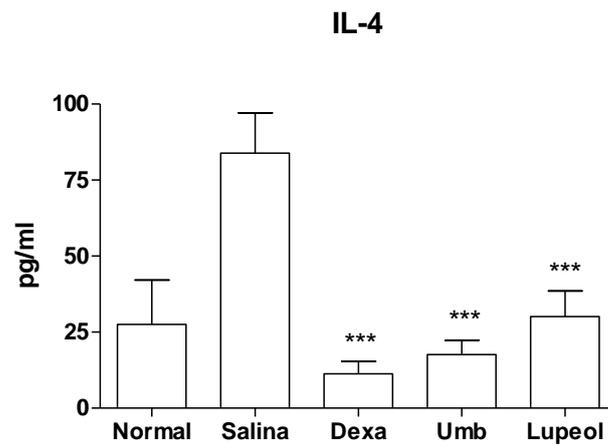


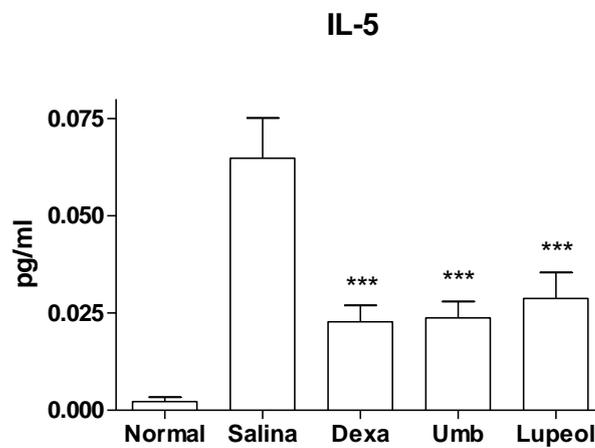
Figura 13: Concentração de citocinas no LBA de camundongos asmáticos tratados com fisalinas B e F. O LBA de camundongos da linhagem BALB/c foi obtido após o sacrifício dos animais para as dosagens de IL-4 (A) e IL-13 (B), por ELISA. Os dados representam a média±SEM de 10 animais por grupo. ***p<0,001 em relação ao grupo tratado com salina.

Figura 14

A



B



C

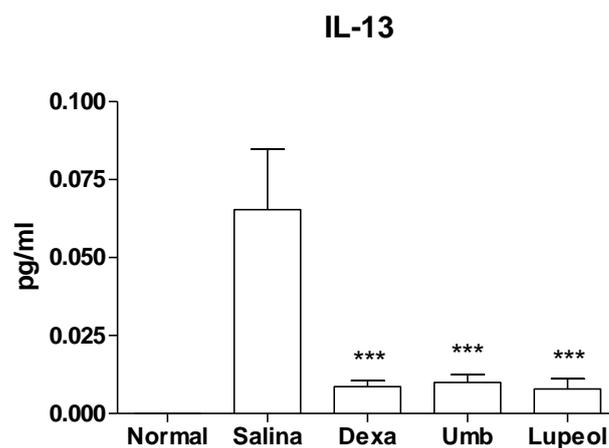


Figura 14: Concentração de citocinas no LBA de camundongos asmáticos tratados com umbeliferona ou lupeol. O LBA de camundongos da linhagem BALB/c foi obtido após o sacrifício dos animais para as dosagens de IL-4 (A), IL-5 (B) e IL-13 (C), por ELISA. Os dados representam a média±SEM de 7 animais por grupo. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo tratado com salina.

5 DISCUSSÃO

O uso de camundongos como modelo experimental é amplo e vem crescendo na investigação da regulação imunológica da asma e da rinite alérgica (KUMAR *et al.*, 2000; MALM-ERJEFÄLT *et al.*, 2005). Existem certos antígenos e vias de apresentação de antígenos ao sistema imune que favorecem a produção de IgE. Os antígenos que evocam seletivamente as células Th2 e estimulam a produção de IgE são conhecidos como alérgenos (JANEWAY *et al.*, 2002). Neste trabalho foi utilizada a ovalbumina como proteína antigênica em concordância com diversos outros trabalhos, sendo utilizado o hidróxido de alumínio como adjuvante para potencializar a resposta Th2 (KLEIN *et al.*, 2001; MALM-ERJEFÄLT *et al.*, 2001; GERHOLD *et al.*, 2002). Esse protocolo de sensibilização causou um aumento do número de eosinófilos no pulmão quando comparado a animais não sensibilizados. Segundo Das e colaboradores (1997), esse aumento pode ser causado pela produção de IL-5 por linfócitos Th2 ativado durante a sensibilização e o desafio. Foi reproduzido o modelo murino de asma brônquica crônica que mimetiza, em muitas características, a doença humana, com a presença de eosinofilia, a produção de IL-4, IL-5 e IL-13, a presença de um grande infiltrado inflamatório no pulmão e a elevação na produção de mucopolissacarídeo pelas glândulas produtoras de muco. Portanto é um modelo adequado para avaliação de drogas que podem ser utilizadas, ou servir de molde para o desenvolvimento de novas drogas, nessa patologia.

Entre as espécies da flora tropical e subtropical encontramos a *Physalis angulata*, usada popularmente por sua ação antiinflamatória no tratamento de reumatismo e febre, e também por sua atividade antiparasitária contra espécies dos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Plasmodium*, contra o vírus da hepatite e como agente anti-neoplásico (FREIBURGHAUS *et al.*, 1996; TOMASSINI *et al.*, 2000; CHOI & HWANG, 2003; ANKRAH *et al.*, 2003; MAGALHÃES *et al.*, 2006). Já foi demonstrada também a atividade imunomoduladora das fisalinas isoladas desta espécie, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo eficazes em suprimir a atividade de macrófagos ativado por LPS e IFN- γ , prevenindo também a mortalidade induzida por injeção letal de LPS e a rejeição de transplante alogênico (SOARES *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2006).

A manutenção da produção elevada de IL-4 e IL-13 em camundongos asmáticos tratados com as fisalinas B ou F e a presença de um grande percentual de eosinófilos no LBA destes animais evidenciam a falta de ação dessas substâncias no processo inflamatório nessa patologia. Na dose de 2 mg/animal/dia, as fisalinas B e F não

diminuíram o acúmulo de eosinófilos no pulmão e de células inflamatórias na lâmina própria das vias aéreas, bem como não apresentaram efeito na produção de muco nos bronquíolos. No trabalho de Soares e colaboradores (2006), foi observada a inibição da rejeição de transplante corações alogênicos por administração de fisalinas em dose inferior (1 mg/animal/dia). Além da via oral, foi testado o esquema de tratamento por via intraperitoneal (dados não mostrados), que também não modificou o quadro asmático. A dexametasona se liga a um receptor citoplasmático que é um fator de transcrição de genes que regulam respostas inflamatórias. Ao utilizar um antagonista do receptor de glicocorticóides (RU486), Soares e colaboradores (2003; 2006), não observaram o bloqueio da ação das fisalinas. Resultados preliminares sugerem que elas se ligam ao receptor de vitamina D, outro hormônio esteróide com ação imunomoduladora. É possível que as fisalinas não apresentem os mesmos efeitos observados nos animais tratados com dexametasona por ativarem receptores distintos. De fato, a vitamina D não apresenta efeito terapêutico em modelo de asma (WITTKE *et al.*, 2007).

A procura de medicamentos de origem vegetal tem conduzido a um renovado interesse farmacêutico pelas cumarinas, pelo fato dessas substâncias mostrarem atividade farmacológica potente e relevante e serem de baixa toxicidade para mamíferos (SIMÕES *et al.*, 2001). As cumarinas constituem uma classe química presente em diferentes partes das plantas tanto nas raízes como nas flores e frutos, e estão distribuídas em diferentes famílias de Angiospermae (RIBEIRO & KAPLAN, 2002). A esses compostos atribui-se uma grande variedade de atividades biológicas, tais como a antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória, antiespasmódica, antitumoral e antioxidante, as quais podem estar relacionadas com a inibição da atividade, por exemplo, de enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico, e com a sua atividade inibitória de espécies reativas de oxigênio (ROS) (HOULT & PAYÁ, 1996). As cumarinas são utilizadas por sua ação inibidora de edema tecidual, através da redução da concentração de proteínas no tecido, como no linfodema (CASLEY-SMITH, 1993), sendo, em combinação com o flavonóide troxerutina, a base do medicamento Venalot®, indicado para tratamento de varizes, edema e hemorróida.

Ramanitrahasimbola e colaboradores (2005), ao estudarem a atividade farmacológica da *Phymatodes scolopendria*, planta amplamente utilizada em Madagascar no combate de doenças respiratórias, isolaram a 1,2 benzopirona como seu principal composto ativo, que apresenta uma potente atividade broncodilatadora. A cumarina (1,2-benzopirona) apresenta baixa biodisponibilidade em humanos, podendo ser considerada

uma pró-droga, ativa quando biotransformada pelo citocromo P450 no fígado em umbeliferona (7-hidroxycumarina) (HOULT & PAYÁ, 1996). Foi relatado o efeito terapêutico da umbeliferona no controle glicêmico e lipídico e como antioxidante em modelo de diabetes induzido por streptozotocina em ratos (RAMESH & PUGALENDI, 2006; RAMESH *et al.*, 2007). Nossos resultados complementam esses achados, demonstrando que, além de atividade broncodilatadora, a umbeliferona apresenta atividade antiasmática por diminuir o infiltrado inflamatório nos bronquíolos, o padrão de eosinofilia tanto no pulmão quanto no LBA e também por modular a produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, envolvidas na manutenção do quadro alérgico e que possivelmente participam da atividade broncodilatadora descrita por Ramanitrahasimbola e colaboradores (2005).

Outra molécula avaliada foi o lupeol, que faz parte da classe das saponinas e apresenta várias propriedades biológicas, destacando-se a sua ação sobre as membranas celulares, alterando sua permeabilidade. Relacionadas com essa ação, estão às atividades hemolíticas, moluscicida, anti-helmíntica, antiinflamatória e antiviral (SIMÕES *et al.*, 2001). O lupeol foi extraído da espécie *D. ferruginea* encontrada no nordeste do Brasil, conhecida como sucupira-preta e usada na medicina popular para tratar reumatismo, artrite e diabete (ALMEIDA *et al.*, 2004). O lupeol apresentou atividade antiinflamatória em modelo experimental de artrite e foi capaz de suprimir a geração de superóxidos induzidos por ácido araquidônico em neutrófilos humanos (GEETHA & VARALAKSHMI, 2001; SUNITHA *et al.*, 2001; YAMASHITA & VARALAKSHMI, 2002), devendo, portanto, ser a principal molécula ativa na sucupira preta que proporciona seus efeitos medicinais.

Em trabalho recente, Sudhahar e colaboradores (2007) observaram um efeito protetor do lupeol em corações de ratos hipercolesterolêmicos. Os autores creditam esse efeito protetor à ação do lupeol em limitar a oxidação dos lipídeos e proteínas de membrana, e com isso proteger as bombas de íons ATPases da inibição mediada pela hipercolesterolemia. Geetha e Varalakshmi (2001) apontam a atividade do lupeol como outra que não a diminuição da produção de prostaglandinas pela inibição da PG sintetase, já que este não foi capaz de diminuir o número de contorções por dor causada pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos, assim como também não apresentou atividade antipirética.

O lupeol, assim como a umbeliferona, melhorou o quadro de asma brônquica instaurado após imunização e posterior desafio com OVA, diminuindo a celularidade no LBA e a eosinofilia, a produção de citocinas pró-inflamatórias, a bronquiolite e a produção de muco nos bronquíolos quando comparamos aos animais tratados com salina. A inibição

do quadro inflamatório após a utilização de dexametasona em modelo de asma é bem descrita na literatura, sendo capaz de diminuir a migração de leucócitos para o pulmão, em especial de eosinófilos, assim também como o infiltrado inflamatório no pulmão (JUNGSUWADEE, *et al.* 2004; DORSCHIED, *et al.* 2003).

A morte celular programada, reconhecida através do quadro morfológico de apoptose, é um mecanismo central de regulação de populações celulares em organismos multicelulares, que, no sistema imunológico, permite a resolução dos processos inflamatórios, o controle fino da expansão clonal e a prevenção da auto-imunidade. Eosinófilos e neutrófilos participam do infiltrado inflamatório em muitas doenças, incluindo a alergia e a asma, e a sua diminuição tecidual é regulada em parte pela indução de apoptose. Os mecanismos que controlam a morte de eosinófilos por apoptose são críticos na patofisiologia das doenças inflamatórias, já que eles são responsáveis pela liberação de vários mediadores que coletivamente levam ao dano tecidual, como PAF, tromboxanos, proteínas básicas e ROS. Moléculas de adesão celular como o ICAM-3 são capazes de induzir a apoptose por ativação da cascata de caspase, causando regressão do quadro inflamatório (VARGA *et al.*, 2002; KESSEL *et al.*, 2006). Sabendo que a dexametasona apresenta atividade em induzir apoptose de eosinófilos, sugere-se um dos possíveis mecanismos de ação do lupeol por indução de apoptose de eosinófilos, apoiado por Saleem e colaboradores (2005) ao descreverem a participação do lupeol na sinalização mediada por FAS e na ativação das caspases *in vitro* em células de câncer de próstata.

Há a necessidade de investigação dos mecanismos de ação da umbeliferona e do lupeol, seja por indução de apoptose, inibição de enzimas ou inibição da produção de espécies reativas de oxigênio, para apontar alvos terapêuticos que possam guiar o desenvolvimento de novos fármacos que intervenham na patologia da asma.

6 CONCLUSÕES

- As fisalinas B e F não mostraram atividade antiinflamatória no modelo de asma brônquica;
- A umbeliferona e o lupeol apresentaram efeito antiasmático por diminuir a inflamação, modular a produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuir a produção de muco nos pulmões;
- A investigação da atividade da umbeliferona e do lupeol na melhora da função respiratória, assim como estudos mais detalhados sobre os mecanismos de ação destas moléculas, devem ser realizados.

7 REFERÊNCIAS

AGECOM. Agência Geral de Comunicação Social do estado da Bahia. Disponível em: <http://www.agecom.ba.gov.br/exibe_noticia.asp?cod_noticia=16000>. Acesso em: 02 jul. 2007.

ALMEIDA, J.R.G.da S. et al. **The assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra and X-ray crystallographic analysis of furanoflavan isolated from *Diplotropis ferruginea* Benth. Instituto do Milênio do semi-árido: biodiversidade, bioprospecção e conservação de recursos naturais.** UFPA, 2004.

ANKRAH, N.A.; et al. Evaluation of efficacy and safety of a herbal medicine used for the treatment of malaria. **Phyther. Res.**, v. 17, n. 6, p. 697–701, 2003.

BARNES, P.J. Corticosteroids, IgE, and atopy. **J. Clin. Invest.**, v. 107, p. 265-266, 2001.

BIAZE, M. E. L; et al. T cell activation, from atopy to asthma: more a paradox than a paradigm. **Allergy**, v. 58, p. 844–853, 2003.

BIESKI, I.G.C. **Plantas medicinais e aromáticas no Sistema Único de Saúde da região sul de Cuiabá-MT.** 2005. 92f. Monografia (Pós-graduação *Lato Sensu*)- Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

BOYTON, R.J.; ALTMANN, D.M. Asthma: new developments in cytokine regulation. **Clin. Exp. Immunol.**, 136:13-14. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde/ Cenepi/Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 2 jun. 2003.

BRAUN, A.; TSCHERNIG, T. Animal models of asthma: Innovative methods of lung research and new pharmacological targets. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 57, Supl.2, p. 3-4, 2006.

CAMPOS, H. S. O Impacto da Asma e Seu Tratamento. Disponível em: <<http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2027/paginas/materia%208-27.html>>. Acesso em: 27 jun. 2005.

CARDOSO, A.P. Farmacologia dos broncodilatadores. In: **Asma um grande desafio.** São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

CASALE, T.B.; et al. Immune Tolerance Network Group. Omalizumab pretreatment decreases acute reactions after rush immunotherapy for ragweed-induced seasonal allergic rhinitis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 117, p. 134-140, 2006.

CASLEY-SMITH J. R.; et al. Treatment of filarial lymphoedema and elephantiasis with 5,6 benzo-0tpyrone (coumarin). **Br. Med. J.**, v. 307, p. 1037-1041, 1993.

- CHANG, T.W.; SHIUNG, Y. Anti-IgE as a mast cell-stabilizing therapeutic agent. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 117, p. 1203-1212, 2006.
- CHOI, E.M.; HWANG, J.K. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of Piper cubeba, Physalis angulata and Rosa hybrida. **J. Ethnopharmacol.**, v. 89, n. 1, p. 171–175, 2003.
- CONEJERO, L.; et al. Pollen-induced airway inflammation, hyper-responsiveness and apoptosis in a murine model of allergy. **Clin. Exp. Allergy**, v. 37, p. 331–338, 2007.
- COCKCROFT, D.W.; DAVIS, B.E. Mechanisms of airway hyperresponsiveness. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 118, p. 551-559, 2006.
- DAS, A.M.; et al. A novel murine model of allergic inflammation to study the effect of dexamethasone on eosinophil recruitment. **Br. J. Pharmacol.**, v. 121, p. 97-104, 1997.
- DORSCHIED, D.R.; Corticosteroid-induced apoptosis in mouse airway epithelium: Effect in normal airway and after allergen-induced airway inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, p. 360-366, 2003.
- ELWOOD, W.; et al. Characterization of allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation in actively sensitized Brown-Norway rats. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 88, p. 951-960, 1991.
- FREIBURGHAUS, et al. Evaluation of African medicinal plants for their in vitro trypanocidal activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 55, n. 1 p. 1– 1, dec. 1996.
- GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 77-80, 2001.
- GERHOLD, K.; et al. Endotoxins prevent murine IgE production, Th2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 110, p. 110-116, 2002.
- GINA. **Estratégia Global para o Manejo e a Prevenção da Asma**. Publicado em janeiro de 1995 e revisado em 2003.
- GIULIETTI, A.M. et al., **Sistema de Informação Sobre Biodiversidade/ Biotecnologia para o Desenvolvimento Sustentável Plano Nacional de Botânica, BDT, 2005.**
- HEBERT, W.J.; WILKINSON, P.C.; STOTT, D.I. **The dictionary of immunology**. London: Academic Press Limited, 1995. 173p.
- HOLGATE, S.T.; et al. Efficacy and safety of a recombinant anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab) in severe allergic asthma. **Clin. Exp. Allergy**, v. 34, p. 632–638, 2004.
- HOMER, R.J.; ELIAS, J.A. Airway remodeling in asthma: therapeutic implications of mechanisms. **Physiology**, v. 20, p. 28-35, 2005.

INSTITUTO DO MILÊNIO DO SEMI-ÁRIDO. Disponível em:
<<http://www.imsear.org.br/>>. Acesso em: 27 jun. 2005.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. **Gen. Pharmacol.**, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

INTERNATIONAL Study of Asthma and Allergy in Childhood (ISSAC). **Eur. Respir. J.**, v. 12, p. 315-335, 1998.

JANEWAY, C.A.; et al. **Immunobiology** – The immune system in health and disease. 5. ed. Garland publishing. 2002.

JUNGSUWADEE, P.; et al. Inhaled dexamethasone differentially attenuates disease relapse and established allergic asthma in mice. **Clin. Immunol.**, v. 110, p. 13-21, 2004.

KESSEL, J.M.; et al. Ligation of intercellular adhesion molecule 3 induces apoptosis of human blood eosinophils and neutrophils. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 118, p. 831-836, oct. 2006.

KLEIN, A.; et al. Stem cell factor-induced leukotriene B4 production cooperates with eotaxin to mediate the recruitment of eosinophils during allergic pleurisy in mice. **J. Immunol.**, v. 167, p. 524-531, 2001.

KUMAR, R.K.; et al. Airway inflammation in a murine model of chronic asthma: evidence for a focal humoral immune response. **Clin. Exp. Allergy.**, v. 30, p. 1486-1492, 2000.

LIMA, L.M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Agentes antiasmáticos modernos: antagonistas de receptores de leucotrienos cisteínicos. **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 825-834, 2002.

LOPES, C.; et al. Allergy School Hannover 2006: “Allergy, from diagnosis to treatment”. **Rev Port Imunoalergol.**, v. 14, n. 4, p. 355-364, 2006.

MAGALHAES, H.I.; et al. In-vitro and in-vivo antitumour activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 58, n. 2, p. 235-241, 2006.

MALM-ERJEFÄLT, M.; PERSSON, C.G.A.; ERJEFALT, J.S. Degranulation status of airway tissue eosinophils in mouse models of allergic airway inflammation. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 24, p. 352-359, 2001.

MALM-ERJEFÄLT, M.; et al. Circulating eosinophils in asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis lack morphological signs of degranulation. **Clin. Exp. Allergy**, v. 35, p. 1334-1340, 2005.

MATRICARDI, P.M.; BONINI, S. Mimicking microbial 'education' of the immune system: a strategy to revert the epidemic trend of atopy and allergic asthma? **Respir. Res.**, v. 1, p. 129-132, 2000.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; et al. Changes in Pulmonary Function and Parasite Burden in Rats Infected with *Strongyloides venezuelensis* Concomitant with Induction of Allergic Airway Inflammation. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 5, p. 2607-2614, 2003.

OLIVEIRA, M.J.R.; SIMÕES, M.J.S.; SASSI, C.R.R. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 39-41, 2006.

PAWANKAR, R. Mast cell function modulating IgE-mediated allergy. **Allergol. Int.**, v. 48, p. 171-182, 1999.

PORTH, C.M. **Fisiopatologia**. 6a. edição. Guanabara Koogan, 2004.

RAMANITRAHASIMBOLA, D.; et al. Bronchodilator activity of *Phymatodes scolopendria* (Burm.) Ching and its bioactive constituent. **J. Ethnopharmacol.**, v. 102, p. 400-407, 2005.

RAMESH, B.; PUGALENDI, K.V. Antihyperglycaemic effect of Umbelliferone in STZ-diabetic rats. **J. Med. Food.**, v. 9, p. 562-566, 2006.

RAMESH, B.; VISWANATHAN, P.; PUGALENDI, K.V. Protective effect of Umbelliferone on membranous fatty acid composition in streptozotocin-induced diabetic rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 566, p. 231-239, 2007.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REED, C.E. The natural history of asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 118, p. 543-548, 2006.

RIBEIRO, C.V.C.; KAPLAN, M.A.C. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em angiospermae. **Quim. Nova**, v. 25, n. 4, p. 533-538, 2002.

ROITT, I. **Essential Immunology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1994. 448p.

ROMAGNANI, S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. **Mol. Immunol.**, v. 38, p. 881-885, 2002.

ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S.; MORAES, V.L.G. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. **J. Braz. Ass. Advanc. Sc.**, v. 49, p. 395-401, 1997.

RUSSO, M.; MARIANO, M.; JANCAR, S. A new murine model of persistent lung eosinophilic inflammation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, Suppl. II, p. 215-218, 1997.

SÁ, M.S. **Avaliação inicial de atividades imunomoduladoras de extratos de peles e glândulas parotóides de anuros do semi-árido brasileiro**. 2005. 77f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)- Faculdade de Medicina. Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SALLEM, M.; et al. A novel dietary triterpene lupeol induces Fas-mediated apoptotic death of androgen-sensitive prostate cancer cells and inhibits tumor growth in a xenograft model. **Cancer Res.**, v. 65, n. 23, p. 11203-11213, 2005.

SANTO, A.H. Mortalidade relacionada à asma, Brasil, 2000: um estudo usando causas múltiplas de morte. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 41-52, jan. 2006.

SARINHO, E.; CRUZ, A.A. Anti-IgE monoclonal antibody for the treatment of asthma and other manifestations related to allergic diseases. **J. Pediatr.**, v. 82, n. 5, Supl. 2006.

SILVA, J.R.L.; VARGAFTIG, BB. **Imunopatologia da asma e da rinosinusite. In: Asma um grande desafio**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

SILVEIRA, M.R.; et al. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 6263-6272, nov. 2002.

SIMÕES, C.M.O.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: UFSC, 2001.

SOARES, M.B.P.; et al. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 459, p. 107– 112, 2003.

SOARES, M.B.P.; et al. Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. **Int. Immunopharmacol.**, v. 6, p. 408– 414. 2006.

SUDHAHAR, V; et al. Protective effect of lupeol and its ester on cardiac abnormalities in experimental hypercholesterolemia. **Vascular Pharmacol.**, v. 46, p. 412–418, 2007.

SUNITHA, S.; NAGARAJ, M.; VARALAKSHMI, P. Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium- induced hepatotoxicity in rats. **Fitoterapia**, v. 72, p. 516–523, 2001.

TEMELKOVSKI, J.; et al. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolized allergen. **Thorax**, v. 53, p. 849-856, 1998.

TOMASSINI, T.C.B.; et al. Gênero *Physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. **Quím. Nova**. v. 23, n. 1 jan./feb. 2000.

UNANUE, E.R.; BENACERRAF, B. **Imunologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1986.

VARGA, S.M.; et al. Sensitive detection and quantitation of mouse eosinophils in tissues using an enzymatic eosinophil peroxidase assay: its use to rapidly measure pulmonary eosinophilia during experimental respiratory syncytial virus infection of mice. **J. Immunol. Methods**, v. 262, p.111-120, 2002.

VIANNA, E.O. Asma brônquica: o presente e o futuro. In: SIMPÓSIO DE DOENÇAS PULMONARES, 31, 1998, Ribeirão Preto. São Paulo, 1998. p. 229-240, abr./jun. cap.5.

WARD, C.; et al. Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. **Thorax**, v. 57, p. 309-316, 2002.

WHO. World Health Organization fact sheet no. 206. Revised January 2000. Disponível em: <<http://www.who.int/fs/en/fact206.html>>. Acesso em: 8 abr. 2003.

WITTKE, A.; et al. Vitamin D receptor expression by the lung micro-environment is required for maximal induction of lung inflammation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 460, p. 306-313, 2007.

YAMASHITA, K.; et al. Effect of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. **Clin. Chim. Acta**, v. 325, p. 91-96, 2002.