

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LAÍS COSTA AGRA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO TRITERPENO UVAOL EM MODELOS DE
INFLAMAÇÃO ALÉRGICA EM CAMUNDONGOS**

Maceió - AL

2014

LAÍS COSTA AGRA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO TRITERPENÓ UVAOL EM MODELO DE
INFLAMAÇÃO ALÉRGICA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto.

Maceió - AL

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Maria Auxiliadora G. da Cunha

A277e Agra, Laís Costa.
 Efeito anti-inflamatório do triterpeno UVAOL em modelos de
 inflamação alérgica em camundongos / Laís Costa Agra . – 2014.
 65 f. : il. tabs.

Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió,
2014.

Bibliografia: f. 57-64.

1. UVAOL . 2. Alergia. 3. Inflamação. 4. Pleurisia. 5. Eosinófilos.
6. Interleucina 5. I. Título.

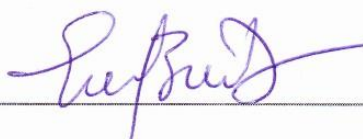
CDU: 616.25-002

Folha de Aprovação

Laís Costa Agra

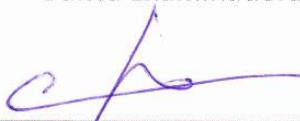
Efeito anti-inflamatório do triterpeno uvaol em modelos de inflamação alérgica em camundongos

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 28 de março de 2014.



Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto (Orientador)

Banca Examinadora



Prof.ª Dr.ª Christianne Bandeira de Melo – (UFRJ)



Prof.ª Dr.ª Salete Smaniotto – (UFAL)



Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro - (UFAL)

*Essa dissertação é dedicada, carinhosamente a
minha família, pelos ensinamentos, amizade e
amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus por me permitir vivenciar as maravilhas da vida, pela capacidade de aprender, ensinar e descobrir a cada dia. Pelas pessoas e oportunidades concedidas, pois sem a orientação, compreensão, acompanhamento e incentivo de diversas pessoas, além do apoio de várias instituições, a realização do presente trabalho não teria sido possível, e aqui quero expressar o meu sincero reconhecimento.

A minha família, Maria do Carmo, José Almir, Guilherme Agra e Matheus Agra. Por contribuírem na minha formação, personalidade e me proporcionar momentos inesquecíveis. Por chorarem comigo nos momentos de tristeza e vibrarem nas minhas conquistas. Amo vocês!

Ao meu orientador Emiliano Barreto pelos ensinamentos, amizade, oportunidades concedidas e por acreditar no meu trabalho e enriquecê-lo, serei eternamente grata. Minha especial admiração e gratidão.

A todos os membros do Laboratório de Biologia Celular, especialmente aqueles que tornam o nosso ambiente de trabalho um segundo lar, minha segunda família: Alex Wanderley, Almir Araújo, João Paulo Noé, Larissa Fernanda, Návylla Candeia, Paulo Sérgio Carvalho (Paulinho), Polliane Araújo e Tales Lyra. Meu muito obrigada especialmente aqueles que me apoiaram e tornaram possível a realização desse trabalho, Fabíola Brito, Fernanda Lima, Isabela Faria, Jamylle Nunes, Marvin Paulo e Rafael Vital. Vocês são inesquecíveis!

A todos os meus mestres, meus professores de infância, colégio, graduação e pós-graduação pelo exemplo de profissionalismo e conhecimentos transmitidos. A Universidade Federal de Alagoas, a Comissão de Ética no Uso dos Animais, ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde, pela formação e aperfeiçoamento profissional. Meus agradecimentos!

Aos meus amigos de infância, colégio, graduação e pós-graduação pelos inesquecíveis momentos de descontração, especialmente aqueles que conviveram comigo nessa etapa, Heloísa Matos, Leila Rodrigues, Tayhana Medeiros e Marvin Paulo, que serei eternamente grata. Muito obrigada por todos os momentos que passamos juntos, pelas 'ajudinhas', pelo carinho, conselhos e pela eterna amizade que construímos durante esses anos de convivência.

Ao suporte técnico-científico através do Portal Periódico da CAPES, e apoio financeiro da CAPES, CNPQ e FAPAL por contribuírem para a realização dessa pesquisa.

Por fim, a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para mais uma meta alcançada em minha vida, e que eventualmente não foram citados, minhas desculpas e agradecimentos.

RESUMO

As respostas inflamatórias de origem alérgica acometem milhares de pessoas em todo mundo, e a prevalência destas doenças na população vem aumentando a cada década. Dentre as manifestações clínicas, a asma alérgica chama a atenção por causa do grande impacto na saúde pública devido ao número de casos e óbitos registrados. Como fármacos disponíveis para a terapêutica destas doenças destacam-se os corticoides, estabilizadores de mastócitos e imunomoduladores. Porém, mesmo sendo de amplo uso pela população, ainda há limitações para estes fármacos, pois o uso prolongado causa diversos efeitos adversos. Assim, considerando as evidências de crescimento das manifestações alérgicas na população, aliado a necessidade de novas ferramentas terapêuticas eficazes e com menos efeitos adversos, a busca por fármacos de origem natural vem ganhando destaque. Dentre os produtos de origem natural os triterpenos são metabólitos secundários que representam o maior grupo de fitoquímicos em várias espécies vegetais. Preparações medicamentosas contendo estes metabólitos são utilizadas em muitos países devido aos amplos efeitos de interesse, incluindo, anti-inflamatório, analgésico, antipirético, hepatoprotetor, cardiotônico, dentre outras. Logo, considerando estas informações objetivou-se neste estudo caracterizar o potencial efeito antialérgico do uvaol em modelos de inflamação alérgica desencadeada por ovalbumina (OVA) em camundongos. Inicialmente, verificou-se que no modelo de edema de pata a resposta edematogênica induzida por OVA ou por histamina foi significativamente reduzida pelo pré-tratamento com o uvaol, por via oral 1 hora antes do estímulo. Em seguida, utilizando o mesmo protocolo de tratamento, verificou-se que no modelo de pleurisia alérgica, utilizando-se um único desafio alérgico, o uvaol inibiu significativamente o recrutamento leucocitário, em especial, os eosinófilos, 24 h após estímulo alérgico. Além disso, os níveis de IL-5 também se mostraram reduzidos no exsudato pleural. Utilizando o modelo animal de asma experimental, com três exposições ao antígeno uma vez ao dia por três dias consecutivos, constatou-se que a administração oral de uvaol 1 h antes de cada estímulo alérgico reduziu o acúmulo total de leucócitos, principalmente os eosinófilos, presente no parênquima pulmonar, bem como os níveis de IL-5 presente no tecido inflamado. Observou-se ainda que o tratamento com uvaol atenuou a produção de muco em células epiteliais brônquicas dos animais asmáticos após estímulo. Ao avaliar o lavado broncoalveolar (BAL) dos animais asmáticos tratados com uvaol notou-se uma redução significativa no número de células totais e eosinófilos, bem como uma redução nos níveis de IL-5. Porém, ao avaliar a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos leucócitos provenientes do BAL verificou-se que o tratamento com uvaol não interferiu na produção destas espécies reativas. Portanto, considerando todas as informações obtidas até o momento, demonstrou-se, pela primeira vez, que o uvaol possui potencial para tratamento de manifestações alérgicas por reduzir o recrutamento de leucocitário e geração de IL-5, mas não por interferir na geração de espécies reativas de oxigênio. Deste modo, concluiu-se que, mesmo necessitando de futuros estudos para demonstrar seu mecanismo molecular de ação, o uvaol mostra-se como uma potencial ferramenta terapêutica para tratamento das inflamações alérgicas.

Palavras-chave: Uvaol. Alergia. Inflamação. Pleurisia. Eosinófilo. Interleucina 5.

ABSTRACT

Allergic diseases affect millions of people and their prevalence has constantly increased in the world every decade. Among the clinical manifestations, the allergic asthma is considered a major public healthy problem due to its number of cases and death records. Currently, these diseases are treated either with glucocorticoids, anti-histamines, mast cell stabilizers or immunomodulators. Although these drugs exert a strong anti-allergic effects, the long-term use may lead to harmful side-effects. Thus, considering the increase of allergic manifestations in the population and the requirement for new therapeutic tools with less side-effects, the discovery of drug of natural origin have been gaining prominence. Among products from natural origin, triterpenes are secondary metabolites and represent the largest group of phytochemicals in many plant species. Pharmaceutical preparations containing this metabolites are used in several countries because of their medicinal properties, which include anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, hepatoprotective, cardiogenic effects, among others. Taking into account these information, the aim of this study was to investigate uvaol anti-allergic efficacy in experimental mouse models of allergy triggered by ovalbumin in mice. Firstly, it was found that in a model of the paw edema induced by OVA and histamine, the oral pretreatment with uvaol 1 hour prior to stimulation reduced both edema. Then, using the same treatment protocol, it was found that in the allergic pleurisy model, using a single allergic challenge, the uvaol significantly inhibited leukocyte recruitment, specially eosinophils, 24 h after allergic stimulation. Furthermore, IL-5 also presented a decreased levels in the pleural fluid. Using murine asthma models, with three exposures to the antigen daily for three consecutive days, it was found that oral administration of uvaol 1 h before each allergic stimulation reduced the accumulation of total leukocytes, mainly eosinophils present in the pulmonary parenchyma as well as IL-5 levels present in the inflamed lung tissue. Moreover, was observed that pretreatment with uvaol reduced the production of mucus after stimulus in airways of asthmatic animals. Bronchoalveolar lavage (BAL) of asthmatic animals pretreated with uvaol were evaluated and it was detected a significantly reduction in total cell number and eosinophils, as well as significantly reduced levels of IL-5. However, the pretreatment with uvaol was not able to interfere with the production of reactive oxygen species (ROS) in cells of the bronchoalveolar lavage. Therefore, considering all the data obtained so far, it was demonstrated for the first time that uvaol has a treatment potential of allergic disorders by reducing leukocyte recruitment and IL-5 levels, but not interfering in the generation of reactive oxygen species. Thus, uvaol shows up as a potential therapeutic tool for the treatment of allergic inflammation. Further studies are necessary to understand its molecular mechanism of action.

Keywords: Uvaol. Allergy. Inflammation. Pleurisy. Eosinophils. Interleukin-5.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Prevalência mundial de asma clínica.....	15
Figura 2 -	Iniciação e propagação da resposta inflamatória alérgica.....	19
Figura 3 -	As principais divisões do trato respiratório.....	21
Figura 4 -	Corte histológico de um brônquio.....	22
Figura 5 -	Bronquíolo e bronquíolos respiratórios.....	23
Figura 6 -	Detalhe do alvéolo pulmonar.....	24
Figura 7 -	Corte transversal de um pulmão de camundongo após estimulação alérgica.....	25
Figura 8 -	Exemplos das estruturas químicas das classes dos terpenoides.	31
Figura 9 -	Estrutura química do uvaol.....	32
Figura 10 -	Pletismômetro digital.....	36
Figura 11 -	Esquema ilustrativo do modelo de asma alérgica induzida por OVA.....	38
Figura 12 -	Efeito do uvaol em edema de pata alérgico induzido por OVA...	41
Figura 13 -	Efeito do pré-tratamento de uvaol em edema de pata induzido por histamina.....	42
Figura 14 -	Efeito do uvaol no recrutamento de leucócitos totais e eosinófilos no modelo de pleurisia alérgica.....	43
Figura 15 -	Efeito do uvaol sobre os níveis de IL-5 no lavado pleural de animais alérgicos em modelo de pleurisia alérgica	44

Figura 16 -	Efeito do uvaol sobre o influxo de células inflamatórias no lavado broncoalveolar de animais alérgicos em modelo de asma alérgica.....	45
Figura 17 -	Efeito do uvaol na produção de ERO de leucócitos obtidos a partir do LBA de animais alérgicos em modelo de asma alérgica.....	46
Figura 18 -	Efeito do uvaol sobre os níveis de IL-5 no LBA e tecido pulmonar de animais alérgicos em modelo de asma alérgica	47
Figura 19 -	Infiltrado inflamatório rico em eosinófilos na área peribrônquica do pulmão de camundongos asmáticos.....	48
Figura 20	Efeito do uvaol no tecido pulmonar de camundongos asmáticos.....	49
Figura 21 -	Efeito do uvaol na produção de muco no tecido pulmonar de camundongos asmáticos.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al(OH) ₃	Hidróxido de alumínio
ANOVA	Análise de variância
C-29	Carbono 29
CCL11	Eotaxina 1
CD8 ⁺	Linfócitos T citotóxicos CD8 ⁺
CH ₂ OH	Grupo hidroximetil
CH ₃	Grupo metil
CysLt1	Receptor cisteinil- -leucotrienos 1
DCFH-DA	Fluorescente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
DEX	Dexametasona
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
EDN	Neurotoxina derivada de eosinófilos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
EPX	Peroxidase eosinofílica
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FcεRI	Receptor de alta afinidade para IgE
fMLP	N-formilmetionil-leucil-fenilalanina
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina e eosina
i.n	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratorácica
IFN-γ	Interferon - γ
IgE	Imunoglobulina E
IgG1	Imunoglobulina G1
IL-2	Interleucina - 2
IL-3	Interleucina - 3
IL-4	Interleucina - 4

IL-5	Interleucina - 5
IL-5R α	Receptores α de interleucina – 5
IL-9	Interleucina - 9
IL-13	Interleucina - 13
IL-33	Interleucina - 33
ILC-2	Células imunes inatas do tipo 2
LBA	Lavado broncoalveolar
LDL	Partículas lipoprotéicas de baixa densidade
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
MBP	Proteína básica principal
MBP2	Proteína básica principal do tipo 2
NaCl	Cloreto de sódio
OVA	Ovalbumina
PAS	Ácido periódico de <i>Schiff</i>
PBS	Solução tampão de fosfato
PGD ₄	Prostaglandina D ₄
RANTES	Regulador da atividade normal da célula T expressa e secretada
RPM	Rotações por minuto
Th1	Células T <i>helper</i> 1
Th2	Células T <i>helper</i> 2
TNF - α	Fator de necrose tumoral α
TPA	12 – O- Tetradecanolforbol – 13- acetato
T _{reg}	Células T regulatórias
TRIS	Hidroximetil amino metano
TSLP	Linfopoetina estromal tímica
UV	Radiação ultravioleta
v.o.	Via oral

Obs. As abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Asma: Conceito e epidemiologia.....	15
2.2	Fisiopatologia das respostas alérgicas.....	17
2.3	Vias respiratórias.....	21
2.4	Abordagem farmacológica no tratamento da asma.....	26
2.5	Produtos naturais usados no tratamento da asma.....	28
2.6	Terpenos.....	30
2.7	Uvaol.....	32
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	Geral.....	34
3.2	Específicos.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	Reagentes, solventes e substâncias de referência.....	35
4.2	Animais.....	35
4.3	Indução do edema de pata.....	36
4.4	Indução da pleurisia alérgica.....	37
4.5	Modelo experimental de asma alérgica.....	37
4.5.1	Obtenção do Lavado Broncoalveolar	38
4.5.2	Avaliação da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células do LBA por citometria de fluxo.....	39
4.5.3	Análise histopatológica e morfométrica.....	39
4.5.4	Preparo da amostra para quantificação de citocinas no pulmão.....	40
4.5.5	Quantificação de citocinas.....	40
4.6	Análise estatística.....	40
5	RESULTADOS.....	41
5.1	Efeito do uvaol sobre o edema de pata induzido por OVA e por histamina em camundongos.....	41
5.2	Efeito do uvaol sobre a inflamação alérgica avaliada no modelo de pleurisia.....	43
5.3	Efeito do uvaol sobre a resposta inflamatória desencadeada	

	por antígeno em modelo de asma em camundongos.....	44
6	DISCUSSÃO.....	51
7	CONCLUSÃO.....	55
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença clinicamente heterogênea e com fisiopatologia complexa (HOLGATE, 2012) apresentando-se na atualidade como um grande problema de saúde pública, pois estima-se que seja responsável por cerca de 1 em cada 250 mortes no mundo (FOLLENWEIDER; LAMBERTINO, 2013). Estudos recentes revelaram que diferentes países pelo mundo possuem prevalência elevada de asma na população, incluindo Austrália (21,5%), Suécia (20,2%), Reino Unido (18,2%) e Brasil (13,0%) (TO et al., 2012). Segundo dados do Ministério da Saúde, em 2008 o Brasil apresentou uma prevalência de asma em torno de 10%, sendo esta doença a responsável pela terceira causa de internação hospitalar pelo Sistema Único de Saúde (SUS), com cerca de 300 mil hospitalizações (BRASIL, 2011).

Apesar da grande prevalência da asma, recursos financeiros destinados à prevenção e ao controle desta doença não aumentaram nos últimos anos, o que vem contribuindo para o impacto negativo na qualidade de vida da população, mesmo em países desenvolvidos (PAWANKAR et al., 2011). A farmacoterapia para este tipo de doença mostra-se essencial em controlar os sintomas e, assim, proporcionar uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes, pois possibilita o retorno as atividades cotidianas como trabalho, estudo e lazer. A principal classe de fármacos usados no controle das condições alérgicas são os glicocorticoides. Este medicamento, sob forma inalatória, tem sido estabelecido como a primeira linha de tratamento em adultos e crianças com asma persistente, porém sabe-se que o uso crônico deste fármaco pode ocasionar severos efeitos adversos, incluindo, retardo do crescimento em crianças, osteoporose e distúrbios metabólicos (BARNES, 2006). Portanto, considerando estas informações, mostra-se necessários investimentos na busca por opções terapêuticas que sejam capazes de controlar o estabelecimento e avanço da asma, bem como possuam menores efeitos adversos que os fármacos padrão. Neste contexto, as plantas e seus derivados revelam-se como um importante alvo de estudo, visto que diferentes fármacos antiasmáticos já foram obtidos de plantas com propriedades medicinais, como por exemplo, as cromonas, Intal[®] (Sanofi-Aventis) e Cromocato[®] (Neo Química) (CORRÊA; MELO; COSTA, 2008).

Diversos estudos relatam que extratos vegetais e seus constituintes podem atenuar o estabelecimento da resposta inflamatória seja por inibir o influxo de leucócitos para o sítio estimulado, ou mesmo por suprimir a produção de mediadores inflamatórios (ROGERIO; SÁ-NUNES; FACCIOLI, 2010). Atualmente são conhecidos 140.000 metabólitos secundários que apresentam uma grande diversidade de grupamentos funcionais. De acordo com a estrutura e/ou origem biogênica, os metabólitos secundários podem ser divididos em diferentes grupos, tais como: esteroides, flavonoides, terpenos, etc. (SIDDIQUI et al., 2012).

Assim, considerando os efeitos farmacológicos de interesse bem como a possível redução de efeitos indesejados, as substâncias de origem natural mostram-se como potenciais substitutos à terapêutica utilizando compostos sintéticos (VERPOORTE, 1999). A atividade anti-inflamatória de origem alérgica de alguns triterpenoides pentacíclicos já foi relatada em modelo de asma alérgica, como por exemplo, a saikosaponina-A (PARK et al., 2002), a glicirrizina (RAM et al., 2006), a beta-escina (LINDNER et al., 2010) e o astragaloside IV (YUAN et al., 2011). E nesse contexto, considerando a busca por novos fármacos de origem vegetal com eficácia terapêutica para as alergias, selecionou-se o triterpenoide uvaol para investigar suas propriedades farmacológicas em modelos de inflamação alérgica.

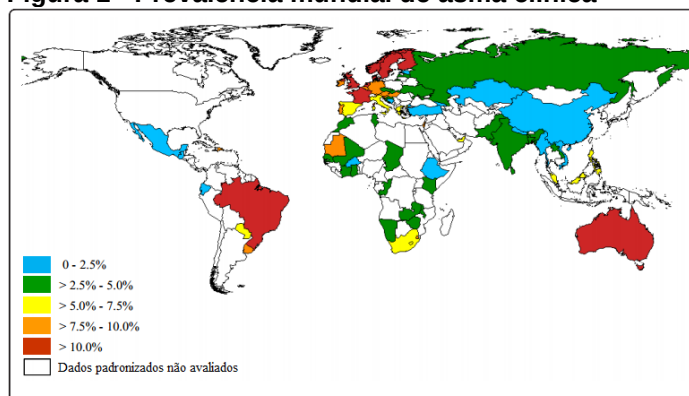
O uvaol é classificado como um triterpenoide pentacíclico, sendo encontrado em grande quantidade na folha da oliveira (*Olea europaea* L.), e, principalmente, no óleo de oliva em especial nas frações não-glicerídicas (ALLOUCHE et al., 2010). Deste triterpenoide já foram reportadas diferentes atividades farmacológicas, incluindo, efeito inibidor da produção de óxido nítrico por macrófagos (YANG et al., 2011), supressor da geração de ânions superóxidos por neutrófilos humanos (CHEN et al., 2002) e atenuador da produção de IL-6 e TNF- α por monócitos humanos (MARQUEZ-MARTIN et al., 2006). Além disso, nosso grupo demonstrou recentemente que o uvaol apresentou propriedades imunomoduladoras (MELO, 2013) e atividade cicatrizante (CARVALHO, 2013). Porém, mesmo com esta vasta gama de efeitos biológicos, ainda não há estudos capazes de conferir ao uvaol propriedades farmacológicas que sustentem seu uso como terapia alternativa para doenças inflamatórias de origem alérgica. Portanto, investigou-se o potencial efeito anti-inflamatório do triterpenoide pentacíclico uvaol em modelos de inflamação alérgica induzida por ovoalbumina em camundongos sensibilizados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Asma: conceito e epidemiologia

A asma caracteriza-se como uma doença inflamatória das vias aéreas associada à obstrução generalizada, mas variável, do fluxo de ar, sendo reversível espontaneamente ou através de intervenção farmacológica (GINA, 2011 *apud* KILEEN; SKORA, 2013). Esta doença possui um grande impacto na atualidade, pois afeta cerca de 315 milhões de pessoas em todo mundo entre adultos e crianças (TO et al., 2012), e causa 1 morte em cada 250 indivíduos asmáticos, o que torna esta doença um importante problema de saúde pública mundial (FOLLENWEIDER; LAMBERTINO, 2013). Os registros de prevalência da asma na população variam de acordo com o país (Figura 1), por exemplo, no Vietnã os registros apontam que a asma afeta 1% da população, enquanto que na Austrália há registros de 21,5% de asmáticos na população (TO et al., 2012). Nos Estados Unidos da América o número de pessoas com asma vem aumentando 2,9% a cada ano, representando um aumento de 20,3 milhões em 2001 para 25,7 milhões de pessoas em 2010, sendo 7 milhões de crianças e 18,7 milhões de adultos (FOLLENWEIDER; LAMBERTINO, 2013). O Brasil aparece como o oitavo país no mundo no que diz respeito à quantidade de pessoas que apresentam sinais e sintomas de asma, sendo Recife uma das capitais com maior prevalência desta doença (SOLÉ et al., 2001). Muito embora a mortalidade por asma pareça estar estabilizada no Brasil, os registros de mortalidade revelam que dentre as doenças respiratórias as crises asmáticas foram responsáveis por 6,5% dos óbitos, sendo os jovens adultos a parcela da população mais afetada (RIO et al., 2002).

Figura 1 - Prevalência mundial de asma clínica



Fonte: Adaptado de TO et al., 2012.

No Brasil, considerando as estatísticas do DATASUS, as complicações decorrentes da asma ocasionaram aproximadamente 660 mil internações no período de janeiro de 2008 a abril de 2011. Deste total de internações, 45,5% foram registrados no nordeste, 21,6% no sudeste, 15% no sul, 9% no norte e 10,2% no centro-oeste. Neste mesmo período, foram gastos cerca de 334 milhões de reais no tratamento desses pacientes. Porém, mesmo com todo gasto do sistema de saúde, neste período foram notificados 2.828 óbitos decorrentes da asma (BRASIL, 2011). Portanto, são necessários amplos esforços para melhorar o acesso à assistência médica e reduzir a disparidade dos resultados do impacto da asma na saúde pública.

A asma mostra-se como uma doença clinicamente heterogênea e com fisiopatologia complexa por apresentar componentes inflamatórios teciduais e de hiper-reatividade das vias aéreas. A resposta inflamatória possui participação fundamental na fisiopatologia da doença por proporcionar a liberação de mediadores pró-inflamatório e ativação de células estruturais, bem como o recrutamento leucocitário para as vias aéreas e pulmões (HOLGATE et al., 2012). A hiper-reatividade ocorre diretamente em conjunto com a inflamação das vias aéreas, sendo essa característica da contração de pequenos músculos situados ao redor das vias aéreas, o que limita a habilidade da pessoa para mover mais livremente o ar através dos pulmões (KILEEN; SKORA, 2013).

Em termos patogênicos, a asma pode ser dividida nas categorias extrínseca e intrínseca. Todas as formas de asma extrínseca envolvem o início de uma crise asmática por uma reação de hipersensibilidade do tipo II a um antígeno extrínseco que, nesse contexto, pode ser considerado um alérgeno. Já a asma intrínseca envolve desencadeadores não imunes de uma crise de asma. Seus subtipos incluem a asma não atópica, que em geral inicia-se por infecções respiratórias virais (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013).

Geralmente, a maioria da asma que ocorre na infância inicia em relação à sensibilização aos alérgenos comuns, tais como poeira doméstica, fezes de ácaros, baratas, pelos de animais, fungos e pólen (KUDO et al., 2013).

2.2 Fisiopatologia das respostas alérgicas

Em 1986, Mosmann e colaboradores propuseram que as citocinas produzidas pelos subtipos de linfócitos poderiam ser expressas por um perfil de células T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2) presentes nas respostas imunes de camundongos. Desde então, muitas respostas imunológicas foram descritas como responsáveis por expressar diferentes citocinas. Dessa forma, as células do perfil Th1 expressam IFN- γ e interleucina (IL)-2, enquanto o perfil Th2 expressam IL-4 e IL-5, sendo que estas citocinas exercem efeito inibitório e bloqueador no outro perfil ou resposta.

Diferentes estudos sustentam que a imunopatogenia da asma seja decorrente da promoção do fenótipo alérgico resultante da predominância de resposta de citocinas com perfil Th2 sobre o perfil Th1 durante o início da vida, também conhecida como hipótese de higiene (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013). Esta hipótese busca explicar a correlação entre a maior incidência de doenças alérgicas nos países desenvolvidos e o processo de industrialização/urbanização, pois supõe que nesses países a exposição precoce de crianças aos antígenos favorece a resposta de Th2 (KUDO et al., 2013; LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013). Em contraste com as respostas imunológicas com perfil Th1, as respostas imunes do tipo Th2 são induzidas por helmintos, e também podem mediar doenças inflamatórias alérgicas, incluindo asma, rinite alérgica e dermatite atópica (LICONA-LIMON et al., 2013). Logo, mesmo outros conjuntos de células, tais como células *Natural Killer*, células T CD8⁺ e células T reguladoras (T_{Reg}), também apresentam participação na patogênese da asma (LLOYD; HESSEL, 2010), as células Th2 exercem um papel central no desenvolvimento das respostas alérgicas (WOLTERINK; HENDRIKS, 2013).

A resposta imune se inicia quando o alérgeno entra em contato, pela primeira vez, com o organismo, caracterizando a fase de sensibilização. Nesta fase, quando o alérgeno penetra na mucosa respiratória, as células apresentadoras de antígeno presente no tecido irão reconhecer, processar e apresentar, via complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II), o antígeno aos linfócitos T, que irão se diferenciar em células Th2 produtoras de citocinas ativadoras de linfócitos B, responsáveis pela produção de imunoglobulina (Ig) tipo E.

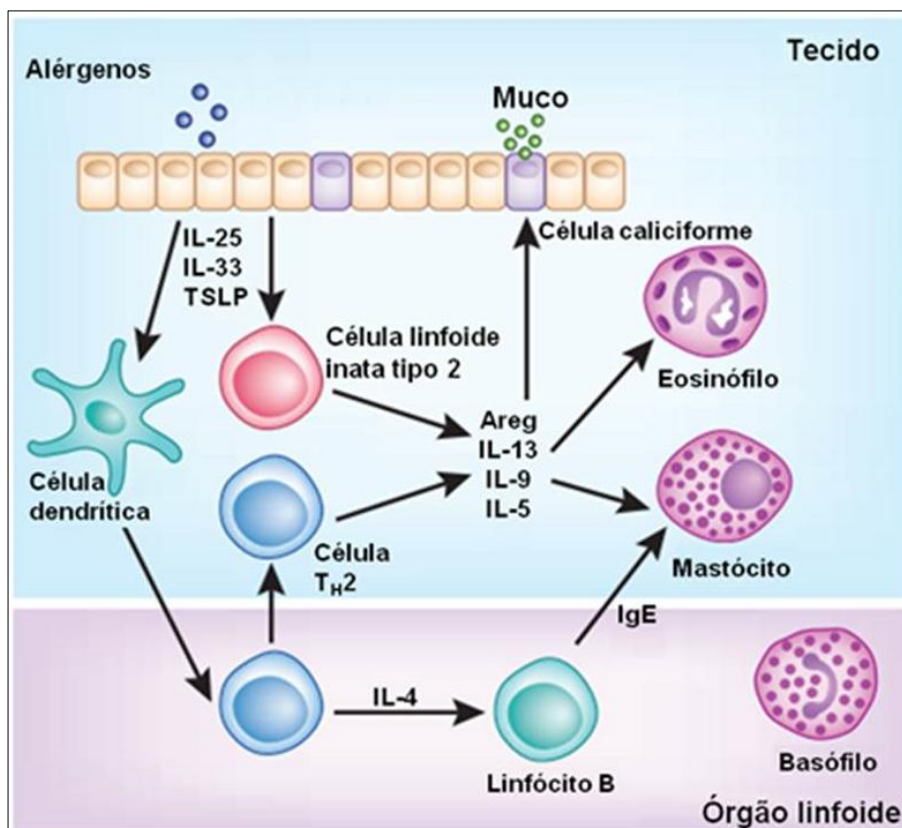
O perfil de citocinas produzidos pelas células Th2, incluindo IL-4, IL-5 e IL-13 possuem contribuição chave na fisiopatologia das alergias. A IL-4 mostra-se

responsável por induzir mudanças na classe de IgG1 para IgE em células B alérgeno-específica, enquanto a IL-5 ativa eosinófilos e a IL-13 desencadeia a produção de muco nas vias aéreas e pulmões (WOLTERINK; HENDRIKS, 2013). Em adição a esse trio de citocinas Th2, a IL-9, a IL-3 e o fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) desempenham papéis importantes, visto que regulam a diferenciação e a maturação dos mastócitos, a maturação e a sobrevivência dos eosinófilos e o recrutamento dos basófilos (HOLGATE et al., 2012) (Figura 2).

Estudos revelaram que as células efetoras da resposta alérgica, como os mastócitos, os eosinófilos e os basófilos também são importantes fontes produtoras de citocinas do perfil Th2, podendo produzir grandes quantidades de IL-5 e IL-13 (HURST et al., 2002; WALKER; BARLOW; MCKENZIE, 2013). Além dessas células, células do sistema imune, denominadas de células inatas linfoides (*innate lymphoid cells* – ILC) também possuem a capacidade de produzir citocinas do tipo Th2, como a IL-5, a IL-9 e a IL-13 em resposta a liberação de IL-25 e IL-33 (LICONA-LIMON et al., 2013). Devido a esta capacidade de produzir citocinas do tipo Th2, estas células foram denominadas de células inatas linfoides do tipo 2 (*type 2 innate lymphoid cells* – ILC2) (Figura 2).

No contexto da inflamação alérgica, a secreção de IgE pelos linfócitos B e a ativação dos mastócitos (Figura 2) por esta imunoglobulina, mostra-se como o mecanismo chave pela indução de características clássicas das reações anafiláticas. Além dos mastócitos uma variedade de células do sistema imune, incluindo os basófilos, expressam receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI) (HAMMAD et al., 2010). A expressão desses receptores também pode ser induzida em células dendríticas após exposição ao alérgeno (HAMMAD et al., 2010) e também nos eosinófilos (GOUNNI et al., 1994). Estas células efetoras medeiam a resposta alérgica liberando mediadores pró-inflamatórios após a ativação/desgranulação induzido por alérgenos reconhecidos pelas IgE (LICONA-LIMON et al., 2013).

Figura 2 – Iniciação e propagação da resposta inflamatória alérgica



Respostas Th2 são iniciadas por alérgenos ou helmintas que rompem as barreiras epiteliais e induzem a secreção de IL-25, IL-33 e linfopoetina estromal tímica (TSLP). Essas citocinas derivadas do epitélio ativam células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2) a secretarem mediadores que induzem respostas Th2. A secreção de citocinas tipo 2 por células ILC2 realimentam o epitélio para induzir a secreção de muco pelas células caliciformes e de reparação tecidual. A secreção de IL-9 e IL-5 por células ILC2 levam ao recrutamento e a ativação de mastócitos e de eosinófilos. A ativação pelas células T em órgãos linfoides amplifica a secreção de citocinas do tipo 2, e a produção de IL-4 pelas células T em órgãos linfoides, leva à produção de IgE pelas células B. Juntas, as respostas desencadeadas pela secreção de citocinas tipo 2 a partir de ambas células ILC2 e Th2, desenvolvem a inflamação alérgica e reparação tecidual. PBP: Proteína básica principal; PCE: proteína catiônica eosinofílica; PE: peroxidase eosinofílica; NDE: neurotoxina derivada de eosinófilo.

FONTE: Adaptado de LICONA-LIMON et al., 2013.

Apesar do papel dos linfócitos na patogenia da asma, o infiltrado inflamatório costuma ser rico em eosinófilos (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013). E a infiltração de eosinófilos nas vias aéreas é uma característica bastante típica da asma sendo influenciada pela presença de IL-5 nos tecidos (FOSTER et al., 1996).

Os eosinófilos são granulócitos circulantes e estão em níveis relativamente baixos no sangue, representando até 3% dos glóbulos branco (KUDO et al., 2013). Em indivíduos saudáveis os eosinófilos encontram-se no intestino, nas glândulas

mamárias, no útero, no timo, na medula óssea e no tecido adiposo (MISHRA et al., 1999). A localização dos eosinófilos nestes tecidos é, provavelmente, mediada pela eotaxina 1 (CCL11), que é uma pequena citocina quimiotática da classe CC-quimiocinas e altamente atraente para eosinófilos. Essas células, nestes tecidos, podem estar envolvidas na sua morfogênese e na manutenção da homeostase. Por exemplo, elas podem manter a integridade da barreira epitelial (FURUTA et al., 2005) e/ou a resposta imune inata no trato gastrointestinal (YOUSEFI et al., 2008). Porém, tradicionalmente os eosinófilos são considerados células efetoras com capacidades pró-inflamatória e destrutiva envolvidas na proteção de hospedeiros contra infecções parasitárias e na imunopatologia das doenças alérgicas (KITA et al., 2013).

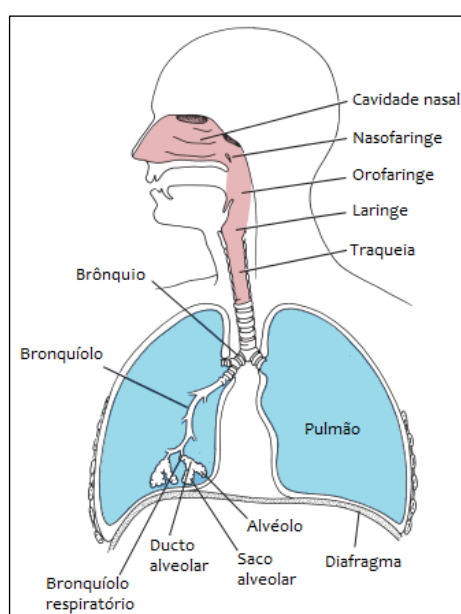
Extensos estudos foram realizados para elucidar os mecanismos pelos quais os eosinófilos liberam esses grânulos de proteínas citotóxicas e outros mediadores inflamatórios. A IL-3, IL-5 e o GM-CSF além de serem importantes fatores de crescimento e da maturação dos eosinófilos, estimulam funções efetoras dos eosinófilos humanos maduros (KITA et al., 2013). Outras citocinas Th2, tais como IL-4 e IL-13, também ativam eosinófilos (BRACKE et al., 1997) e, as citocinas derivadas do epitélio, tal como IL-33 e a linfopoetina do estroma tímico (TSLP), foram implicadas na promoção da resposta imunitária do tipo Th2. Ambas citocinas ativam funções efetoras dos eosinófilos como a adesão para as proteínas da matriz extracelular, a produção de citocinas e a sua degranulação (SAENZ et al., 2008).

Na asma a função dos eosinófilos mostra-se relacionada com a sua capacidade de liberar grânulos de proteínas tóxicas, espécies reativas de oxigênio (ERO), citocinas e mediadores lipídicos (LIU et al., 2006). O recrutamento e a inflamação eosinofílica estão envolvidos na patogênese da asma e os mediadores pró-inflamatórios derivados dos eosinófilos são grandes contribuintes para inflamação na asma, incluindo os danos em células epiteliais das vias respiratórias e a descamação, a disfunção das vias aéreas por aumento da liberação de acetilcolina pelas terminações nervosas colinérgicas, hiper-responsividade, hipersecreção de muco e o remodelamento das vias aéreas, caracterizada por fibrose e deposição de colágeno (KUDO et al., 2013).

2.3 Vias respiratórias

O aparelho respiratório é dividido em duas partes: condutora e respiratória. A zona da condução começa nas narinas e/ou boca, e inclui cavidades nasais, faringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos. A segunda parte é onde ocorrem as trocas gasosas e sequencialmente incluem bronquíolos respiratórios, ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos, constituindo o parênquima pulmonar (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013) (Figura 3).

Figura 3 – As principais regiões do trato respiratório



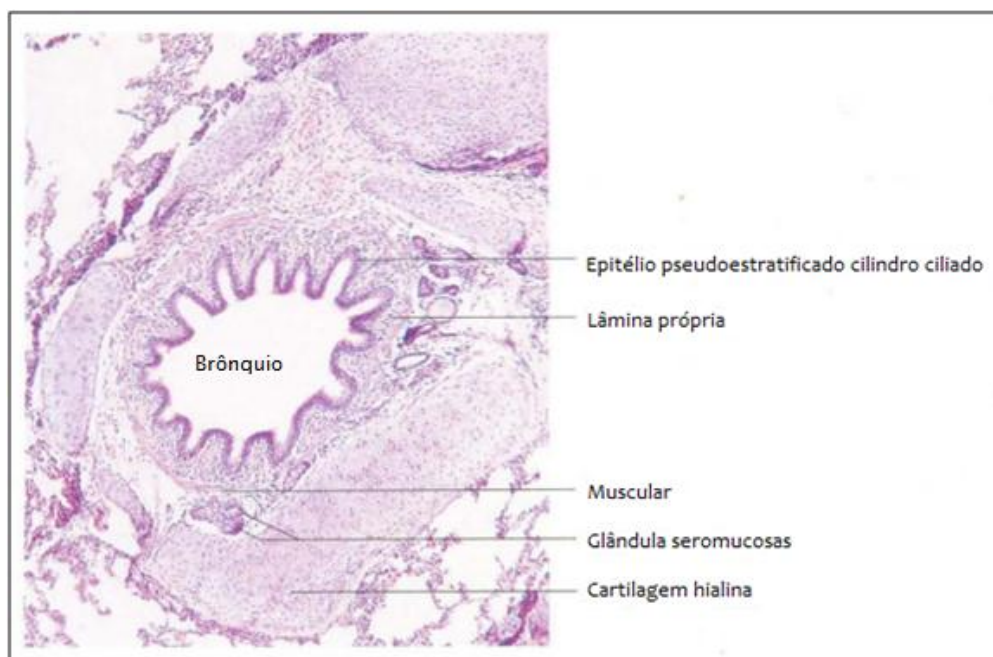
FONTE: Adaptado de ROSS; PAWLINA, 2011.

A estrutura das vias aéreas é formada por uma mucosa respiratória, que se apoia em um suporte que algumas vezes é osso e outras é cartilagem, o tecido fibroso. A mucosa possui duas partes: uma superficial, o epitélio respiratório, e outra profunda, a lâmina própria (GENESER, 1998). O epitélio respiratório é classificado como pseudoestratificado, apresentando células ciliadas, em sua maioria, mas também apresentando células caliciformes e células basais (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013). Na lâmina própria formada por tecido conjuntivo frouxo contém numerosos capilares, glândulas e tecido linfóide (GENESER, 1998).

A traqueia bifurca-se nos brônquios principais direito e esquerdo, cada um subdividindo-se em ramos de 9 a 12 vezes. Cada geração desses ramos mais

profundos torna-se sucessivamente mais curta e mais estreita. De dentro para fora, as paredes brônquicas consistem de epitélio respiratório, com menos células caliciformes que na traqueia, sobrejacentes a uma lamina própria que fica sobre faixas cruzadas de músculo liso, abrangendo a muscular da mucosa, sob a qual está uma camada submucosa com menos glândulas seromucosas que na traqueia, e revestindo cartilagem hialina, esta circundada por uma camada adventícia difusa de tecido conectivo fibroso (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013) (Figura 4).

Figura 4 – Corte histológico de um brônquio

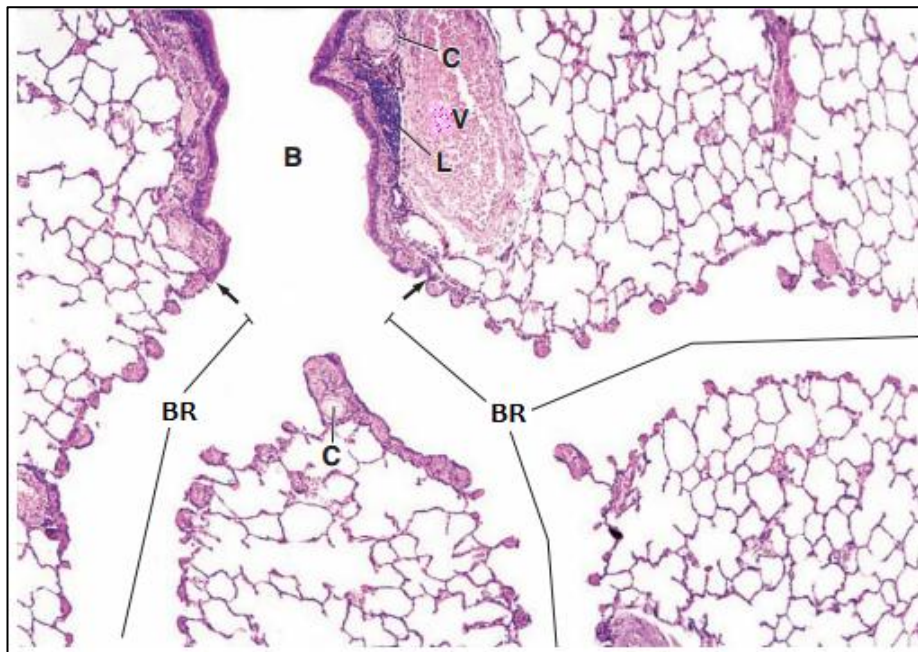


Corte transversal de um brônquio pequeno corado com hematoxilina e eosina (H&E) (aumento de x65).

FONTE: Adaptado de GENESER, 1998.

Com a diminuição do tamanho dos brônquios devido as ramificações, as placas cartilaginosas tornam-se menores e menos numerosas. As placas cartilaginosas finalmente desaparecem quando as vias aéreas atingem o diâmetro de cerca de 1 mm, quando então o ramo é designado bronquíolo (ROSS; PAWLINA, 2011). Define-se bronquíolo como uma via aérea distal desprovida de cartilagem e glândulas submucosas (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013) (Figura 5).

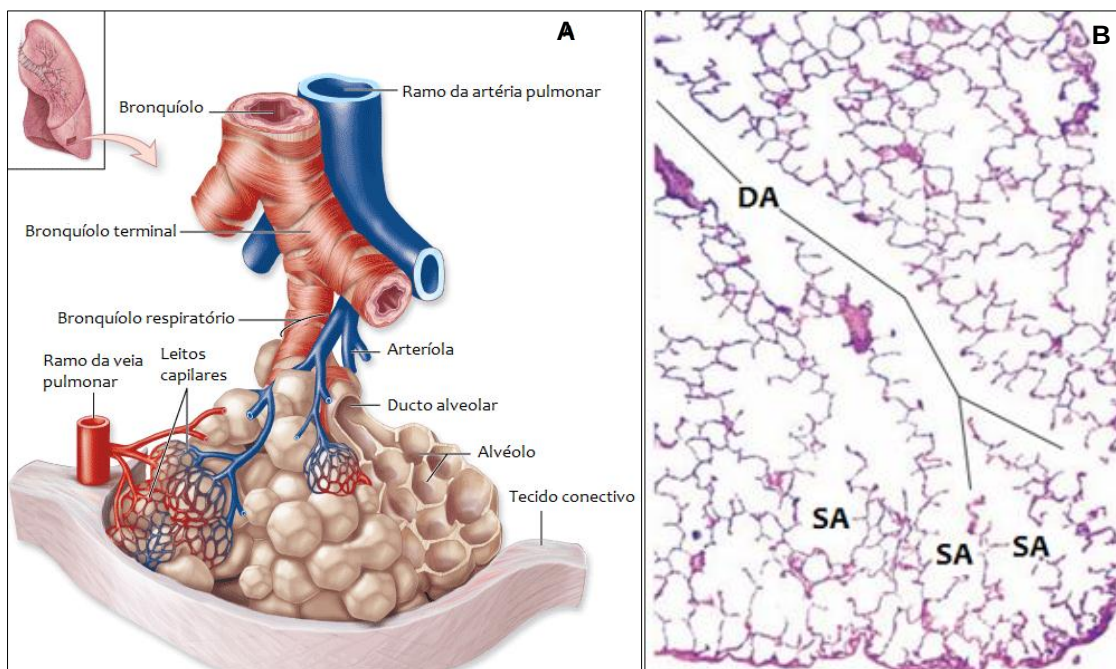
Figura 5 - Bronquíolo e bronquíolos respiratórios



Corte transversal de um pulmão corado com hematoxilina e eosina (H&E) (aumento de x75). Nota-se um curto bronquíolo terminal (B) em corte longitudinal se ramifica em dois bronquíolos respiratórios (BR). Observa-se ainda a cartilagem (C) encontrada na parede bronquiolar onde ocorre a ramificação para os BR, vasos sanguíneos (V), e nódulo linfático (L).

FONTE: Adaptado de ROSS; PAWLINA, 2011.

Em termos funcionais, tais distinções entre os bronquíolos são importantes porque o bronquíolo respiratório representa o início do parênquima pulmonar, onde ocorre pelo menos uma troca limitada de gás por difusão. A espessura do epitélio bronquiolar muda do proximal para o distal, passando de um epitélio colunar pseudoestratificado ciliado (onde a via aérea é mais larga) para um epitélio colunar simples ciliado e então para um epitélio cuboide simples ciliado (onde a via aérea é mais estreita). Embora os bronquíolos proximais contenham células caliciformes dispersas, os bronquíolos terminais e respiratórios normalmente não as contêm (MESCHER, 2010). As camadas de músculo liso entrecruzadas da muscular da mucosa, que constituem aspectos proeminentes dos brônquios superiores, também diminuem distalmente, tornando-se quase ausentes nos bronquíolos respiratórios. Os ductos alveolares surgem dos bronquíolos respiratórios distais, e sua parede geralmente parece ser constituída por duas fileiras de aberturas nos alvéolos adjacentes, separadas por pilares de músculo liso e elastina, que funcionam como delgados esfíncteres e mantêm a integridade estrutural (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013) (Figura 6).

Figura 6 – Detalhe do alvéolo pulmonar

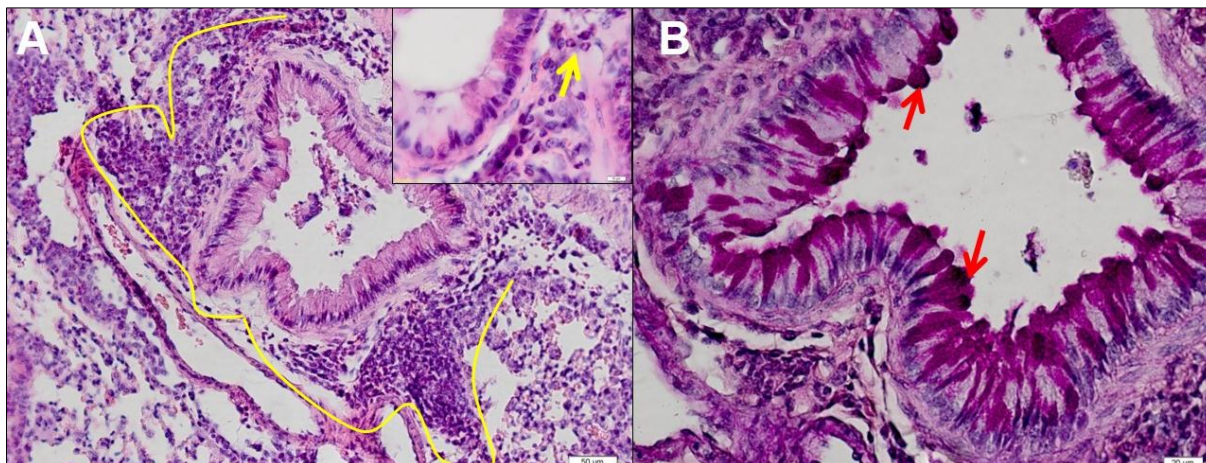
(A) Diagrama esquemático mostrando a relação dos bronquíolos com os componentes mais distais do parênquima pulmonar. (B) O componente mais distal da via respiratória é a alvéolo. Grupos de alvéolos agrupados compartilhando uma abertura comum são referidos como sacos alveolares (SA). Alvéolos que formam um tubo são referidos como ductos alveolares (DA). Coloração por hematoxilina e eosina (H&E) e aumento de x75.

FONTE: Adaptado de MESCHER, 2010 e ROSS; PAWLINA, 2011.

Os ductos e os alvéolos que os circundam são revestidos por um epitélio escamoso simples, composto de pneumócitos do tipo I, essas células são unidas uma a outras e às outras células do epitélio alveolar por junções oclusivas, além disso, suas membranas basais estão fundidas à membrana basal das células endoteliais dos capilares, ocorrendo a troca de gás mais difusa (ROSS; PAWLINA, 2011). Os pneumócitos do tipo 2 secretam surfactante, uma mistura de fosfolípidos e proteínas que reduz a tensão da superfície e promove estabilidade alveolar com baixos volumes pulmonares (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013).

O parênquima pulmonar dos pacientes asmáticos em geral, permanece relativamente intacto em indivíduos que morrem na exacerbação, os chamados *status* asmáticos. Entretanto a composição das mucosas inclui detritos celulares a partir de células epiteliais das vias respiratórias necróticas, células inflamatórias incluindo linfócitos, eosinófilos e neutrófilos, exsudato de proteína plasmática e mucina que é produzida por células caliciformes (KUDO et al., 2013) (Figura 7).

Figura 7 - Corte transversal de um pulmão de camundongo após estimulação alérgica



(A) Infiltrado leucocitário rico em eosinófilos que caracteriza a resposta inflamatória alérgica pulmonar (limitado pela linha amarela). Em detalhe no canto superior direito nota-se o grande infiltrado de eosinófilos (indicado pela seta amarela). (B) Produção de muco (indicado pela seta vermelha) e infiltrado eosinofílico.

FONTE: Elaborado pelo autor.

O epitélio das vias aéreas de um paciente asmático normalmente mostra descamação das células cilíndricas ciliadas, com células caliciformes e metaplasia de células escamosas, como um sinal de reparação do epitélio das vias aéreas e não apresenta um aumento da espessura da membrana basal sub-epitelial. No entanto, alguns estudos têm demonstrado que a verdadeira lâmina basal apresenta uma espessura normal, e o aumento aparente na espessura está relacionada com a acumulação de outros componentes da matriz extracelular sob a lâmina basal (ROCHE et al., 1989) (Figura 7).

O espessamento da parede das vias respiratórias é maior nos pacientes asmáticos do que nos indivíduos normais, e em pacientes com estado severo da doença esse espessamento é ainda maior. Esta espessura é devido a um aumento da massa da musculatura lisa das vias aéreas e das glândulas mucosas (JOHNS et al., 2000). A limitação do fluxo aéreo é também agravado pela presença de um aumento da secreção de muco e exsudado inflamatório (CHIAPPARA et al., 2001). Todos esses eventos contribuem para uma obstrução das vias aéreas ocasionando o marco clínico da doença que são episódios recorrentes de crises de tosse, falta de ar, aperto no peito e chiado (GINA, 2011 apud KILLEEN; SKORA, 2013). Assim, os resultados a partir de muitos estudos têm apoiado que o remodelamento das vias aéreas está relacionado à inflamação (KUDO et al., 2013). Apesar destes avanços

recentes, mais estudos são necessários para estabelecer uma relação causal entre o remodelamento das vias aéreas e a gravidade da asma.

2.4 Abordagem farmacológica no tratamento da asma

Embora a asma seja considerada uma doença com obstrução reversível das vias aéreas, um subgrupo de pacientes desenvolve uma obstrução persistente irreversível e progressiva. Esses pacientes recebem altas doses de corticosteroides inalados durante a fase estável da doença por no mínimo 4 semanas. Os corticoides são os medicamentos mais potentes e consistentemente eficazes para alcançar os objetivos do tratamento, como por exemplo, beclometasona e budesonida. Estes medicamentos são, por conseguinte, a terapia eleita para os pacientes com asma persistente, incluindo aqueles que têm asma geralmente bem controlada (BEL, 2013). Entretanto, a utilização de altas doses ou utilização por longo período de tempo pode causar efeitos adversos sistêmicos resultando em retardo do crescimento em crianças, osteoporose e distúrbios metabólicos (BARNES, 2006).

Outra classe de medicamentos de ação rápida são os β_2 -agonistas inalatórios, como o salmeterol e o formoterol, que são necessários para reverter a broncoconstrição e aliviar os sintomas da crise asmática (CAMPO et al., 2013). Apesar das vantagens associado ao uso desta classe de medicamentos, ensaios clínicos randomizados têm sugerido que os broncodilatadores de ação prolongada podem ser associados com um aumento do risco de exacerbações graves de asma e mortes relacionadas à asma (BIBLIOTECA NACIONAL DE MEDICINA *apud* BEL, 2013).

Antagonistas de leucotrienos são medicamentos alternativos para o controle da asma em longo prazo. Estas drogas são particularmente adequadas para pacientes que têm rinite alérgica ou que têm efeitos colaterais locais inaceitáveis ou uma inadequada resposta com a terapia de corticosteróides inalados (BEL, 2013). Nesse contexto, estes fármacos como o zileuton, um inibidor da 5-lipoxigenase, e o montelucaste e zafirlucaste, antagonistas de receptores para cisteinil- -leucotrienos (CysLt1) contribuem atenuando a inflamação das vias aéreas (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013). Ensaios clínicos randomizados comparando a terapia anti-leucotrienos com os corticoides inalatórios revelou que os efeitos terapêuticos dos antagonistas dos receptores de leucotrienos foram semelhantes aos corticoides

inalatórios (PRICE et al. 2011). No entanto, outro estudo demonstrou que a terapia com os corticoides apresentou-se mais eficaz nos parâmetros clínicos do controle da asma em relação aos anti-leucotrienos (CHAUHAN et al., 2012).

Em pacientes que apresentam asma grave e recebem corticoide em longo prazo, a utilização de imunomoduladores pode ser uma opção para reduzir a dose de corticoide e seus efeitos adversos (CAMPO et al., 2013). Imunomoduladores tais como sais de ouro, metotrexato, azatioprina, ciclosporina e tacrolimus, apesar de alguns benefícios clínicos terem sido encontradas em pacientes individuais, os efeitos benéficos são esporádicos e muitas vezes associados a efeitos colaterais inaceitáveis (HOLGATE, 2012). O metotrexato é o fármaco imunomodulador mais estudado em pacientes com asma, no entanto, seus efeitos antiasmáticos só aparecem a longo prazo, além disso pode levar a alterações em testes do fígado, desconforto gastrointestinal e estomatite. Por outro lado, esses efeitos adversos são reversíveis e diminuem após a suspensão do uso. Apesar de não existirem parâmetros que podem prever quais pacientes responderão ao tratamento, a relação risco-benefício de metotrexato é superior ao dos corticoides orais em doses diárias superiores a 10 mg, administrados numa base contínua (CAMPO et al., 2013).

A ciclosporina inibe a ativação dos linfócitos T envolvidos na patogênese da asma. No entanto, sua toxicidade renal dependente da dose e seus efeitos deletérios na hipertensão limitam seu uso. Estudos com análogos deste composto, como tacrolimus e pimecrolimus, ambos que têm melhores perfis de segurança podem ser útil na asma (CAMPO et al., 2013).

A asma alérgica caracteriza-se por elevação dos níveis de IgE específicas contra um ou mais alérgenos do ar, contribuindo para a inflamação de vias aéreas e a hiper-reatividade brônquica (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013). O omalizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado, possui a propriedade de ligar-se a IgE livre circulante, prevenindo assim a sua ligação aos mastócitos, com a consequente redução na liberação de mediadores da reação alérgica. Atualmente, o omalizumabe mostra-se como único produto biológico aprovado para o tratamento da asma (CAMPO et al., 2013). É usado para tratar pacientes mais graves, com asma alérgica persistente dependente de corticosteroides (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013).

Outro dois anticorpos monoclonais humanizados, o mepolizumabe e o reslizumabe, apesar de reduzirem os níveis de eosinófilos no sangue e no escarro, quando administrados em pacientes com asma moderada, não melhorou os parâmetros clínicos da asma (HOLGATE, 2013). Outros estudos revelaram o valor positivo da associação de tratamento entre o mepolizumabe e corticosteroide em pacientes com asma grave, visto que estes apresentaram boas respostas clínicas com relação à eosinofilia presente no escarro (NAIR et al., 2009; HALDAR et al., 2009). Outra abordagem utilizando o tratamento com anticorpos utiliza anticorpos monoclonais com alvo para receptor α de IL-5 (IL-5R α) (MEDI 563, benralizumabe). Um estudo de fase 1 em pacientes com asma leve tem demonstrado uma forte redução dose-dependente de eosinófilos circulantes durando de 8-12 semanas após uma única injeção de MEDI 563 (BUSSE et al., 2010).

Apesar da grande diversidade de estratégias medicamentosas para o tratamento da asma, poucos medicamentos são atualmente utilizados na prática clínica. Um dos desafios atuais da terapia para a asma consiste no desenvolvimento de novos tratamentos que visam principalmente pacientes com doença grave, incluindo ainda os que são resistentes aos glicocorticoides. Sendo, portanto, necessário avançar na descoberta de tratamentos alternativos para a inflamação das vias aéreas.

2.5 Produtos naturais usados no tratamento da asma

As plantas desenvolveram durante a evolução vias bioquímicas secundárias que lhes permitiram sintetizar uma série de produtos químicos, muitas vezes, em resposta a estímulos ambientais específicos, tais como danos induzidos por ataques de patógeno ou privação de nutrientes (KENNEDY; WIGHTMAN, 2011). Estes metabólitos secundários podem ser exclusivos para determinadas espécies e/ou gêneros e não exercem nenhum papel nas condições metabólicas primárias das plantas, mas aumentam a capacidade de sobrevivência, superando os desafios locais, permitindo maior interação das plantas com o seu meio ambiente (HARBONE, 1993). Os metabólitos secundários são essenciais para a sobrevivência das plantas contra radiação ultravioleta e hospedeiros em geral, pois são capazes de remover radicais livres, possuem propriedades antioxidante e antiproliferativa

contra microrganismos como fungos, bactérias e vírus, além disso, muitos também exercem toxicidade contra herbívoros (KENNEDY; WIGHTMAN, 2011).

Certos metabólitos secundários de plantas apresentam funções protetoras semelhantes quando administrado em seres humanos, agindo como antioxidante ou antimicrobiano, promovendo proteção contra bactérias, vírus, fungos ou outras infecções parasitárias, podendo apresentar poderosas propriedades bioativas no corpo humano. Entretanto, alguns metabólitos são tóxicos para os seres humanos, mas em doses muito baixas podem causar efeitos favoráveis como analgésicos ou a morte de células tumorais (SIDDIQUI et al., 2012).

A busca de novos medicamentos pode ser feita através de inúmeras estratégias, especialmente pela modificação molecular de compostos ativos já existentes, síntese de novas moléculas e a bioprospecção a partir de produtos de origem natural, esta última sendo a principal fonte de protótipos que originaram as principais classes farmacológicas de compostos utilizados na medicina moderna (CORRÊA; MELO; COSTA, 2008).

A prospecção a partir de produtos naturais encontra nas espécies vegetais a principal e mais promissora fonte de novas moléculas que fazem parte da história da farmacologia como a morfina, atropina, os antineoplásicos vincristina e vimblastina, a emetina entre muitos outros e, mais recentemente compostos novos e de grande importância como o antimalárico artemisinina e o antineoplásico taxol (CORRÊA; MELO; COSTA, 2008). É importante constar ainda que a demanda de produtos de origem vegetal no mercado é alta, mas o uso das espécies vegetais nativas é complexo visto à falta de informações técnico-científicas que permitem sua seleção como matéria-prima para a produção industrial (DI CARLO et al., 1999), um exemplo promissor do uso das espécies nativas é o Acheflan[®], nome comercial do primeiro anti-inflamatório feito com base no extrato de uma planta nativa brasileira, a espécie *Cordia verbenaceae* DC., conhecida popularmente como erva-baleeira, erva-da-praia e maria-milagrosa, que é nativa da mata atlântica brasileira. Deve-se salientar que, além da enorme diversidade de espécies vegetais no bioma brasileiro, praticamente inexplorada pela ciência, existe uma diversidade química incomensurável nestas espécies vegetais. Tais compostos químicos, oriundos do metabolismo secundário e que garantem a sobrevivência da espécie, podem, obviamente, representar uma série de importantes princípios ativos úteis para o tratamento e cura de inúmeras doenças que atingem a espécie humana (DI STASI

et al., 1999). De fato, os estudos de plantas medicinais e seus metabólitos secundários como fonte de novos produtos para o tratamento de problemas alérgicos tem sido realizado de forma intensa como uma estratégia promissora para a obtenção de novos compostos terapêuticos (BIERLORY, 2004).

Neste contexto, os produtos de origem natural possuem participação importante no tratamento da asma, pois dois (matilxantinas e cromonas) fármacos usados para o tratamento desta doença tem origens no tratamento popular iniciado há 5.000 anos (BIELOGY; LUPOLI K, 1999).

Como representante da classe das metilxantinas têm-se a teofilina, que é uma xantinas metilada estruturalmente relacionadas ao ácido úrico, e encontrado no chá verde. A teofilina é utilizada na clínica para o tratamento da obstrução reversível das vias aéreas, apresentando efeitos vasodilatadores, anti-inflamatórios e imunomoduladores. As metilxantinas apresentam como mecanismo de ação a inibição das enzimas fosfodiesterases (PDE), aumentam a contratilidade do diafragma e ativam as desacetilases das histonas (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2010).

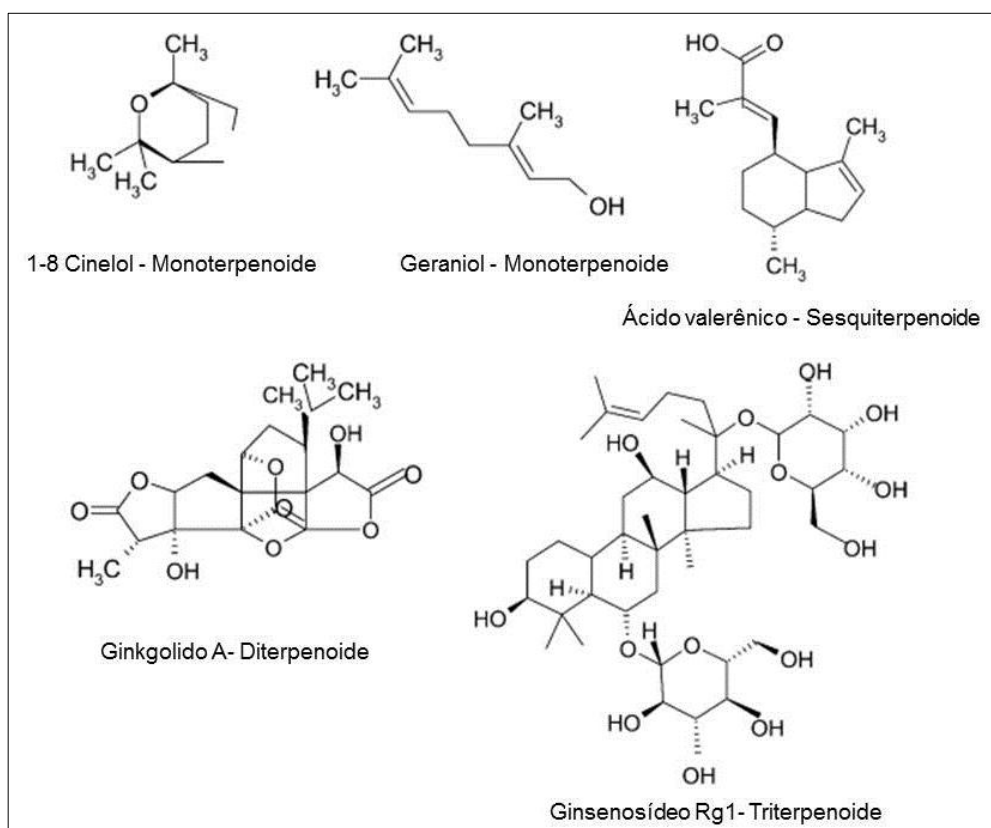
As cromonas foram isoladas a partir da planta medicinal *Amni visnaga*, que foi utilizada por muito tempo no Egito e nos países do leste do Mediterrâneo para o tratamento de doenças respiratórias. As cromonas são utilizadas na clínica por possuírem efeitos anti-inflamatórios e são capazes de diminuir a obstrução brônquica, uma vez que estabilizam os mastócitos inibindo a liberação de histamina, leucotrienos e reduzem a ativação de eosinófilos, mas seus alvos moleculares ainda não foram identificados (BARNES, 2006).

2.6 Terpenos

Os terpenóides distribuem-se amplamente na natureza e constituem o maior grupo de metabólitos secundários dos vegetais, são encontrados em todas as partes da planta, tais como as folhas, o pólen, as frutas e as sementes (MAHATO et al., 1988; MIURA et al., 1999) e já foram identificados aproximadamente 30.000 compostos (DZUBAK et al. 2006). São também denominados como isoprenóides, pois são formados por unidades de isoprenos, essas unidades são compostas por cadeias de carbono montadas a partir da fosforilação de cinco átomos de carbonos que estão, frequentemente na forma cíclica, mas ainda podem modificar sua

estrutura para produzir formas altamente bioativas (SIDDIQUI et al., 2011). Essas estruturas são ubiquamente sintetizadas por duas importantes vias, a via do mevalonato e, mais recentemente identificada, a via desoxi-d-xilulose (ROHMER, 1999). E os números dessas estruturas moleculares introduzidas servem de base para classificação desses compostos. Os terpenoides que apresentam 1 unidade é classificado como um hemiterpenoides; os monoterpenoides incorporaram duas unidades de isopreno, os sesquiterpenoides incorporaram três unidades, diterpenóides compreendem 4 unidades, os sesterpenoides incluem 5 unidades, os triterpenoides incorporaram 6 unidades, e os tetraterpenoides 8 unidades (KENNEDY; WIGHTMAN, 2011) (Figura 8). Dentre eles, os triterpenoides são divididos em duas classes principais: os compostos tetracíclicos e os pentacíclicos.

Figura 8 – Exemplos das estruturas químicas das classes dos terpenoides



FONTE: Adaptado de KENNEDY; WIGHTMAN, 2011.

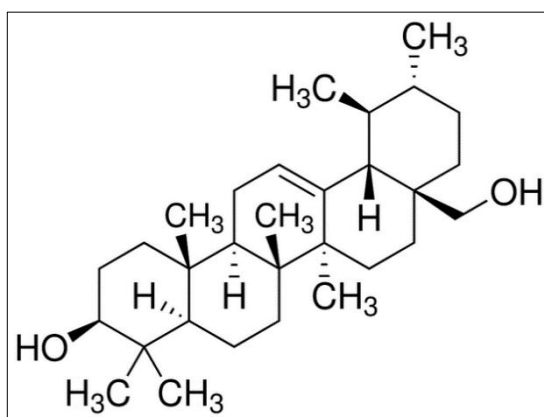
Os triterpenoides são bastante estudados por apresentarem diversas atividades biológicas, como protetora da pele humana contra radiação UV e atividade cicatrizante (SHARATH et al., 2010; LEE et al., 2012;), propriedades cardioprotetora (SOMOVA et al., 2004; MARTÍN et al., 2012), hepatoprotetor (LIU et

al., 1994), antibacteriana (MARTINS et al., 2011), leshimanicida (FILHO et al., 2009; SAUDAGAR; DUBEY, 2011), antioxidante (CHEN et al., 2002; YANG et al., 2011; ALLOUCHE et al., 2011), antitumoral (UKIYA et al., 2002; MARTÍN et al., 2009; ALLOUCHE et al., 2011), antiespasmódica (LEE et al., 2013; ALI, 2013), anti-inflamatória (MARQUEZ-MARTIN et al., 2006; YASUKAWA et al., 1996) e antialérgica (LINDNER et al., 2010).

2.7 Uvaol

O uvaol é um triterpenóide pentacíclico que contém na sua estrutura química um grupo hidroximetil (CH_2OH) em R2 e um grupo metil (CH_3) na posição C-29 (Figura 9), já foi identificado em flores das espécies de *Carthamus morifolium* Ramat. (crisântemo), *Helianthus annuus* L. (girassol), *Taraxacum platycarum* Dahlst. (dente-de-leão) (YASUKAWA et al., 1996; UKIYA et al., 2002), em folhas de *Crataegus pinnatifida* Bunge. (MIN et al., 2000), em folhas de *Diospyros kaki* Thunberg. (CHEN et al., 2002), na casca das raízes de *Morus alba* var. *multicaulis* Perronas., nas raízes de *Geum iranicum* Khatamsaz. (SHAHANI et al., 2012), além dessas espécies interessante é observado que o uvaol encontra-se presente na folha e no óleo de oliva (*Olea europaea* L.), principalmente em frações não-glicerídicas do bagaço do óleo obtido a partir de *O. europaea* L. (GUINDA et al., 2010; ALLOUCHE et al., 2010).

Figura 9 – Estrutura química do uvaol



FONTE: SIGMA ALDRICH.

Muitas propriedades farmacológicas foram atribuídas ao uvaol, incluindo atividade leishmanicida (FILHO et al., 2009; SAUDAGAR et al., 2011), antitripanossomal (TAKETA et al., 2004), antibacteriana (MARTINS et al., 2011), efeito cardioprotetor (SOMOVA et al., 2004; MARTÍN et al., 2012), hepatoprotetor (LIU et al., 1994) e atividade antitumoral com propriedades que servem como adjuvantes na quimioterapia do câncer (MARTÍN et al., 2009; MARTINS et al., 2011; ALLOUCHE et al., 2011).

Além disso, alguns estudos demonstram o potencial antioxidante do uvaol, reduzindo a produção de óxido nítrico em macrófagos RAW264 de camundongos (YANG et al., 2011), suprimindo a geração de ânion superóxido induzido por ácido araquidônico e fMLP em neutrófilos humanos (CHEN et al., 2002), e apresentando atividade antioxidante relacionada em partículas lipoprotéicas de baixa densidade (LDL) de humanos (ALLOUCHE et al., 2010; ANDRIKOPOULOS et al. 2002). Além disso o uvaol inibe a produção de IL-6 e TNF- α em células mononucleares do sangue periférico de humanos estimulados pelo mitógeno fitohemaglutinina (MARQUEZ-MARTIN et al., 2006) e inibe o edema de orelha induzido por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) em camundongos (YASUKAWA et al., 1996). Essa capacidade antioxidante, imunomoduladora e anti-edematogênica sugerem que este triterpenoide pode apresentar um potencial efeito anti-inflamatório em modelos experimentais de doenças inflamatórias alérgicas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar o efeito do triterpeno uvaol em modelos experimentais de inflamação alérgica induzida por ovalbumina em camundongos sensibilizados.

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito do tratamento com uvaol:
 - ✓ no edema de pata induzido por ovoalbumina e por histamina em animais sensibilizados.
 - ✓ no modelo de pleurisia induzido por antígeno.
 - ✓ na resposta inflamatória desencadeada por ovalbumina na asma alérgica experimental.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes, solventes e substâncias de referência

O uvaol (UV) ($\leq 95\%$ of purity—HPLC), a ovalbumina (OVA), o 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), a solução tampão de fosfato (phosphate buffered saline - PBS), o coquetel inibidor de protease, o Tween-20, a eosina, a hematoxilina, o ácido periódico de Schiff (periodic acid-Schiff PAS) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, EUA), o hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{HO})_3$) da Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA), a dexametasona (DEXA) (Decadron[®]) da Teuto-Brasileiro (Goiânia, GO, BRA), a prometazina (Pamergan[®]) da Cristália (Itapira, SP, BRA) a xilazina (Anasedan[®]) e cetamina (Dopalen[®]) da Ceva (Paulínia, SP, BRA), o ácido etileno diamino tetracético (ethylenediamine tetraacetic acid - EDTA) e sulfóxido de demetilo (dimethyl sulfoxide - DMSO) da Synth (Diadema, SP, BRA) e May-Grunwald-Giems foi adquirido da Merck (São Paulo, SP, BRA). Todas as substâncias foram dissolvidas em solução salina estéril (cloreto de sódio (NaCl) 0,9%). O uvaol foi dissolvido em 2% de DMSO. As substâncias foram dissolvidas em cada concentração específica seguida de uma administração de volumes constantes de 10 $\mu\text{l/g}$ de acordo com o peso médio dos animais. Os animais do grupo controle foram tratados com o veículo (0,2% de DMSO) seguindo a mesma administração de volume. Os animais em jejum de 12 horas recebiam o pré-tratamento por via oral (v.o.) sempre 60 min antes do estímulo inflamatório com ovalbumina (OVA). Todos os outros produtos químicos foram de grau analítico e obtidos a partir de fornecedores comerciais normalizados.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, pesando entre 25-30 g, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Os animais foram mantidos em gaiolas sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada à base de ração tipo *pellets* (Presence - Purina[®]) com acesso à água *ad libitum*, com ventilação e temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) constantes e controladas, e ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Alagoas (Licença nº 9244/2011-45).

4.3 Indução do edema de pata

Grupo de seis animais recebiam uma imunização sistêmica através de uma administração subcutânea de OVA (50 µg/animal) e Al(OH)₃ (5 mg/animal) diluído em solução de TRIS 0,01M; HCl 1N e 2,9 g NaCl no volume final de 200 µl nos dias 0 e 7. Quatorze dias após a primeira sensibilização, os animais receberam na região intra-plantar (ipl.) uma injeção com OVA (3 µg/pata) em um volume final de 50 µl. Em outro grupo experimental, o edema foi induzido pela injeção local de histamina (100 µg/ pata). Após diferentes tempos do estímulo (15, 30, 45, 60, 90, 120 minutos e 24 horas) o volume da pata foi mensurado com auxílio do equipamento plestímometro digital (LE 7500 - PanLab[®]) (Figura 10). Neste equipamento, a pata do camundongo foi imersa até a junção tíbio-tárcica em uma das cubetas, e o volume deslocado para a segunda cubeta, proporcional ao volume da pata imersa, foi medido com auxílio de um sensor eletrônico de pressão e registrado. O aumento do volume (µL) da pata foi mensurado pela subtração do volume da pata estimulada com a pata controle. Os animais foram pré-tratados com uvaol (100, 200 e 500 µmol/kg) e os animais do grupo controle positivo foram pré-tratados com prometazina (17,5 µmol/kg).

Figura 10 – Pletismômetro digital.



FONTE: Panlab – HARVARD APPARATUS.

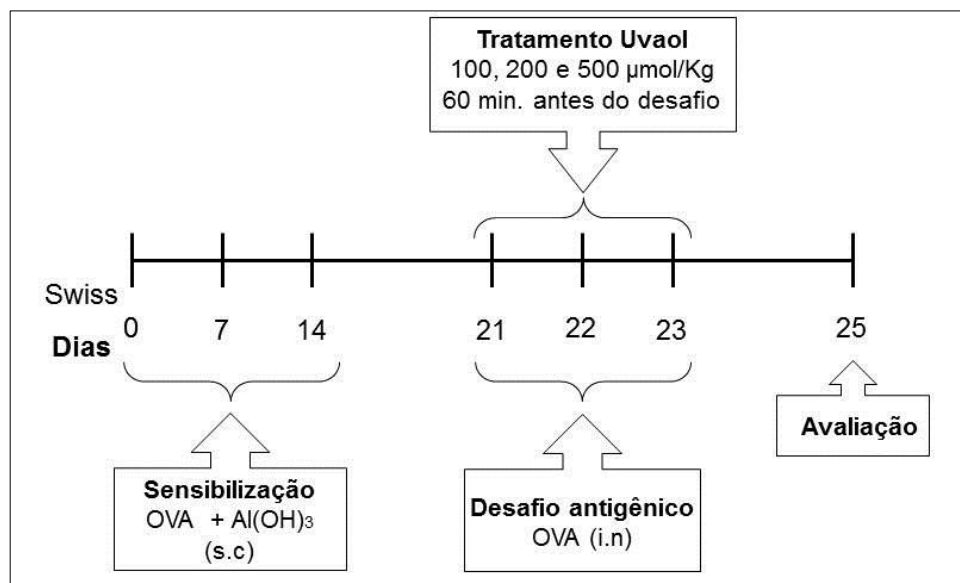
4.4 Indução da pleurisia alérgica

Grupo de seis animais recebiam uma imunização sistêmica através de uma administração subcutânea de OVA (50 µg/animal) e Al(OH)₃ (5 mg/animal) diluído em solução de TRIS 0,01M; HCl 1N e 2,9 g NaCl no volume final de 200 µl nos dias 0 e 7. Quatorze dias após a primeira sensibilização, os animais recebiam uma injeção intratorácica (i.t.) com OVA (12,5 µg/cavidade). As análises do efluente pleural ocorreram nos tempos 24 h após o estímulo antigênico. Para isso, os animais foram eutanasiados e suas cavidades torácicas foram lavadas com uma micropipeta contendo 1 mL de EDTA 10 mM em PBS através de uma pequena incisão realizada no diafragma. Em seguida, o lavado pleural foi diluído na solução de Turk (1:100) e a contagem de leucócitos totais foi realizada em câmara de “Neubauer” por microscopia óptica (x20) (BX41, OLYMPUS). Após a contagem dos leucócitos totais, o lavado pleural foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a 5 °C. O *pellet* formado após a centrifugação foi utilizado para a contagem diferencial dos leucócitos através de citoesfregaços, corado pelo método instantâneo de Panótico. A contagem diferencial das células foi realizada por microscopia óptica (BX41, OLYMPUS) de imersão (x100). Os animais foram pré-tratados com uvaol (100, 200 e 500 µmol/kg) e os animais do grupo controle positivo foram pré-tratados com dexametasona (10 µmol/kg).

4.5 Modelo experimental de asma alérgica

Grupo de seis animais recebiam uma imunização sistêmica através de uma administração subcutânea de OVA (50 µg/animal) e Al(OH)₃ (5 mg/animal) diluído em solução de TRIS 0,01M; HCl 1N e 2,9 g NaCl no volume final de 200 µl nos dias 0, 7 e 14 (Adaptado de CONRAD et al., 2009). Nos dias 21, 22 e 23, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p) de xilazina (5 mg/kg) e cetamina (35 mg/kg) para a realização dos desafios antigênicos através da administração intranasal (i.n) de OVA (25 µg/25 µl). O grupo controle foi desafiado com o mesmo volume de solução salina. Os animais, em jejum, em seus respectivos grupos receberam o pré-tratamento com uvaol (100, 200 e 500 µmol/kg; v.o.), dexametasona (10 µmol/kg; i.p.) ou veículo (0,2% DMSO; v.o.), 60 min. antes de cada desafio antigênico (Figura 11).

Figura 11 – Esquema ilustrativo do modelo de asma alérgica induzida por OVA



FONTE: Elaborado pelo autor.

4.5.1 Obtenção do Lavado Broncoalveolar

Os animais foram eutanasiados 48 horas após o último desafio antigênico e foi realizado o lavado broncoalveolar (LBA) através da exposição da traqueia e inserção de uma cânula de polietileno conectada a uma seringa de 1 ml. O pulmão foi lavado duas vezes com EDTA 10 mM em PBS obtendo um volume final de 1 ml e o líquido recolhido foi centrifugado a 1500 rpm (rotações por minuto) por 10 minutos a 5 °C. O sobrenadante foi recolhido, aliquotado e armazenado em freezer de ultrabaixa temperatura -80 °C para posterior quantificação de citocinas. As células concentradas no tubo foram ressuspensas em PBS e diluídas na solução de Turk (1:100) para a contagem de leucócitos totais em câmara de “Neubauer” por microscopia óptica (x20) (BX4, OLYMPUS). Uma amostra de 100 µl dessas células foi utilizada para o preparo de citoesfregaços, as lâminas foram posteriormente coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa para a contagem diferencial das células baseado nos critérios normais de morfologia, classificando como eosinófilos, neutrófilos ou mononucleares com o auxílio um microscópio óptico com a objetiva de x100 (BX41, OLYMPUS).

4.5.2 Avaliação da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células do LBA por citometria de fluxo

A formação de ERO intracelulares foi detectada utilizando-se a sonda fluorescente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich®), que é de-esterificada e oxidada dentro das células, convertendo-se em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF).

As células provenientes do LBA foram incubadas com DCFH-DA a 5 μ M, diluído em PBS, durante 30 minutos, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após esse período, as células foram levadas imediatamente ao citômetro de fluxo (BD FACS Canto™ II) e a leitura foi realizada no canal FL1, sendo a intensidade da fluorescência proveniente do DCF detectada no comprimento de onda de 488 nm. Os resultados foram expressos na forma de *dotplots* e histogramas, sendo avaliadas a porcentagem de células totais produtoras de ERO e a intensidade de fluorescência, através do programa WinMDI 2.9.

4.5.3 Análise histopatológica e morfométrica

Após a eutanásia dos animais o pulmão foi perfundido via ventrículo direito com solução salina contendo EDTA 10 mM e fixado com solução neutra tamponada de formol a 10%. Os pulmões foram desidratados por concentrações crescentes de etanol, clarificados por xilol, e incluídos em parafina. Em seguida, material parafinado foi levado ao micrótomo e realizado cortes de 5 μ m. Os cortes em seguida foram desparafinados por xilol, reidratados por concentrações decrescentes de etanol e submetidos a colorações para avaliação estrutural (Hematoxilina-Eosina) e produção de muco (Ácido Periódico de Schiff).

Fotomicrografias de 10 campos aleatórios por lâmina foram realizadas usando câmera digital (DP25, OLYMPUS) adaptada ao microscópio (20x) (BX41 OLYMPUS) para analisar as alterações histológicas presentes de inflamação peribrônquica. As análises foram descritas de forma semi-quantitativa com os seguintes critérios: 0, normal; 1, poucas células; 2, um anel de células inflamatórias com profundidade de 1 célula; 3, um anel de células inflamatórias com profundidade de 2-4 células; 4, um anel de células inflamatórias com profundidade maior que 4 células como descrito por Myou e colaboradores (2003).

Para avaliar os níveis da produção de muco no pulmão, fotomicrografias de 10 campos aleatórios por lâmina foram realizadas usando câmera digital (DP25, OLYMPUS) adaptada ao microscópio (40x) (BX41 OLYMPUS). A análise quantitativa das imagens foi realizada através do programa ImageJ[®] 1.47 (*National Institutes of Health* (NIH) - EUA). Realizou a determinação do percentual de produção de muco através do reconhecimento da cor relativa às estruturas de interesse (muco) e cálculo da densidade de área, que foi definida pelo quociente entre a área ocupada pela quantidade de muco produzido pelas células epiteliais brônquicas e a área total do campo analisado.

4.5.4 Preparo da amostra para quantificação de citocina no pulmão

Para quantificação de citocina no pulmão, o lobo direito de cada animal foi homogenizado com uma solução de PBS suplementado com 0,05% Tween-20 e 1% de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich[®]) no volume final proporcional de 1 ml para cada 100 mg de tecido (Adaptado de PETERSON et al., 2012). Após a homogeneização do tecido, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi aliquoteado e armazenado em *freezer* de ultrabaixa temperatura -80 °C para posterior quantificação de citocinas.

4.5.5 Quantificação de citocina

Para quantificação da citocina IL-5 presente no lavado broncoalveolar, no lavado pleural e no tecido pulmonar foram utilizados kits de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* - ELISA Ready-Set-Go![®] kit - eBioscience). As microplacas com as respectivas amostras foram levadas ao leitor de microplacas seguindo as instruções do protocolo do comerciante.

4.6 Análise estatística

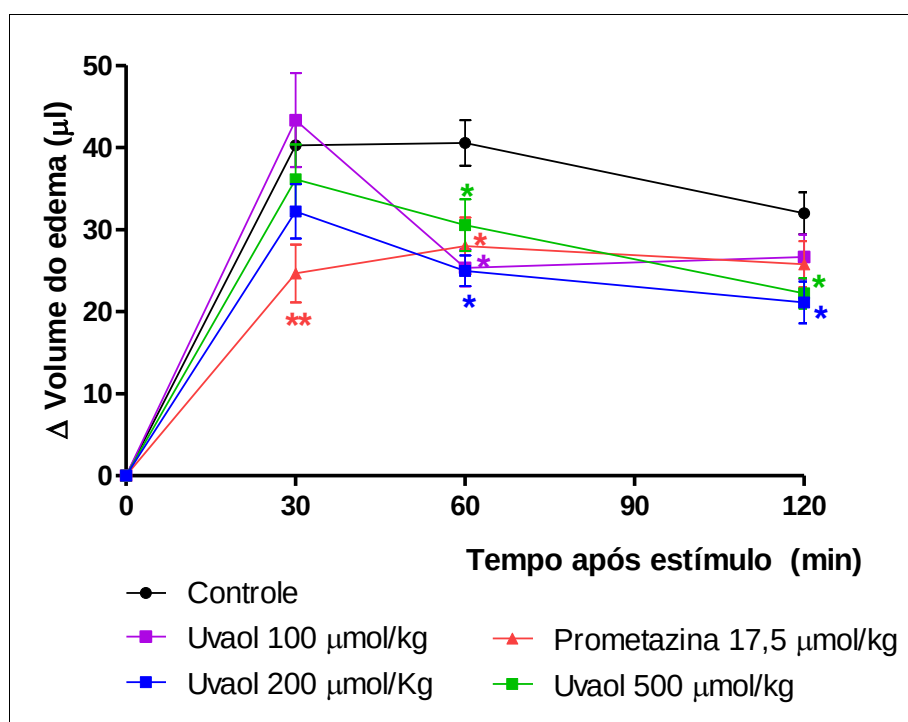
Todos os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Comparação estatística entre os grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Newman–Keuls *multiple comparison test*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando os valores de $p < 0,05$ usando o programa *GraphPad Prism*[®] 5.0 (Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do uvaol sobre o edema de pata induzido por OVA e por histamina em camundongos

A Figura 12 mostra o edema de pata formado após o estímulo com OVA nos períodos de 30, 60, 90 e 120 minutos. O tratamento com uvaol não foi capaz de reduzir significativamente a formação do edema 30 min. após o estímulo quando comparado com o grupo controle. Porém, todas as doses de uvaol (100, 200 e 500 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.) reduziram significativamente o volume do edema 60 min. após o estímulo quando comparado com o grupo controle. Essa redução foi mantida nos grupos tratados com uvaol nas doses de 200 e 500 $\mu\text{mol/kg}$ 120 min. após o estímulo. A prometazina (17,5 $\mu\text{mol/kg}$, i.p), um antagonista do receptor histamínico, foi capaz de bloquear a formação do edema nos tempos de 30 e 60 minutos após estímulo.

Figura 12-Efeito do uvaol em edema de pata alérgico induzido por OVA

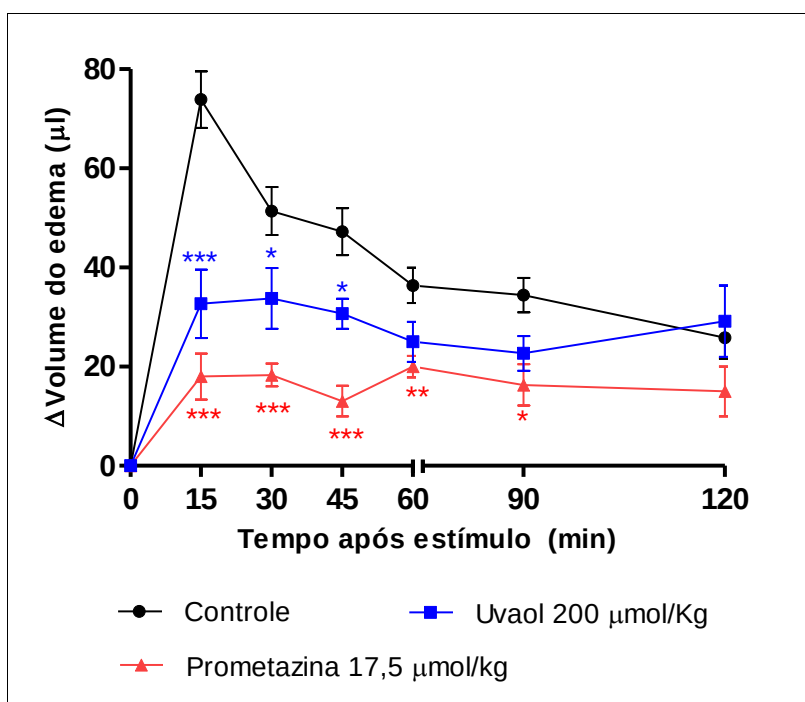


Avaliação da formação do edema em 30, 60 e 120 minutos após o estímulo na pata com OVA. Os pontos representam média $\pm$ E.P.M. de 6 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ denota diferença estatística quando comparado ao grupo controle (linha preta).

FONTE: Elaborado pelo autor.

Para este experimento, os animais foram tratados previamente com uvaol (200 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.) e após 60 min. foram estimulados com histamina na pata (100 $\mu\text{g/pata}$). Como mostrado na Figura 13, a injeção de histamina induziu um intenso edema em 15 min que foi reduzindo gradativamente até o tempo de 120 minutos.

Figura 13 - Efeito do pré-tratamento de uvaol em edema de pata induzido por histamina



Avaliação da formação do edema 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após o estímulo na pata com OVA. Os pontos representam média $\pm$ E.P.M. de 6 animais. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ comparado com o grupo controle e analisado por *One-way ANOVA* seguido por *Newman-Keuls-multiple comparison test*.

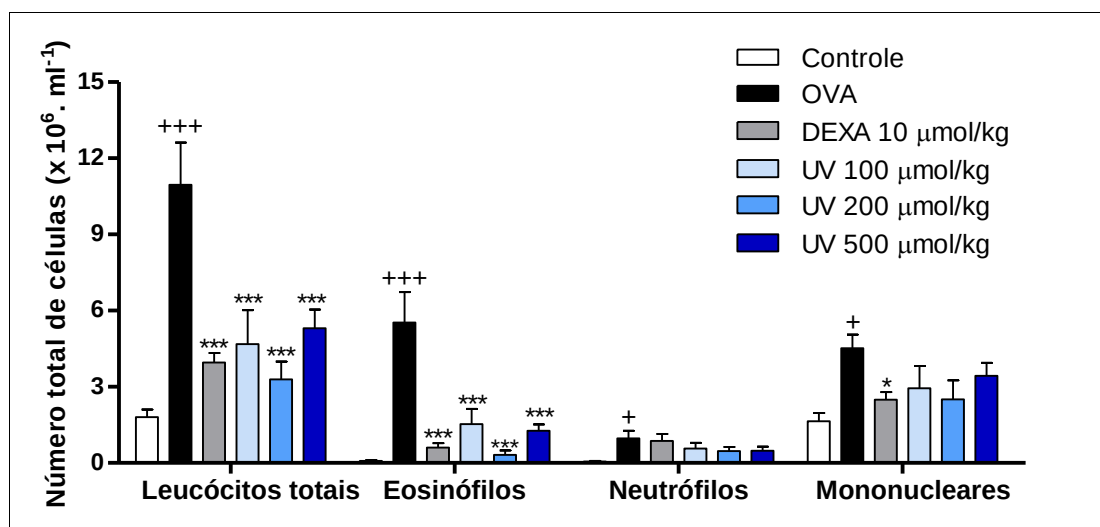
FONTE: Elaborado pelo autor.

Quando os animais foram pré-tratados com uvaol (200 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.) notou-se uma redução significativa na formação do edema nos tempos de 15, 30 e 45 min., sendo esta redução de 55,8%, 34,5% e 35%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle. A prometazina (17,5 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) foi capaz de bloquear a formação do edema até o tempo de 90 minutos.

5.2 Efeito do uvaol sobre a inflamação alérgica avaliada no modelo de pleurisia

Após 24h do estímulo i.t. com OVA em camundongos previamente sensibilizados, observou-se um aumento significativo no total de leucócitos recrutados para a cavidade pleural no grupo OVA quando comparado com o grupo controle (Figura 14), especialmente eosinófilos no grupo OVA quando comparado com o grupo controle como apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Efeito do uvaol no recrutamento de leucócitos no modelo de pleurisia alérgica



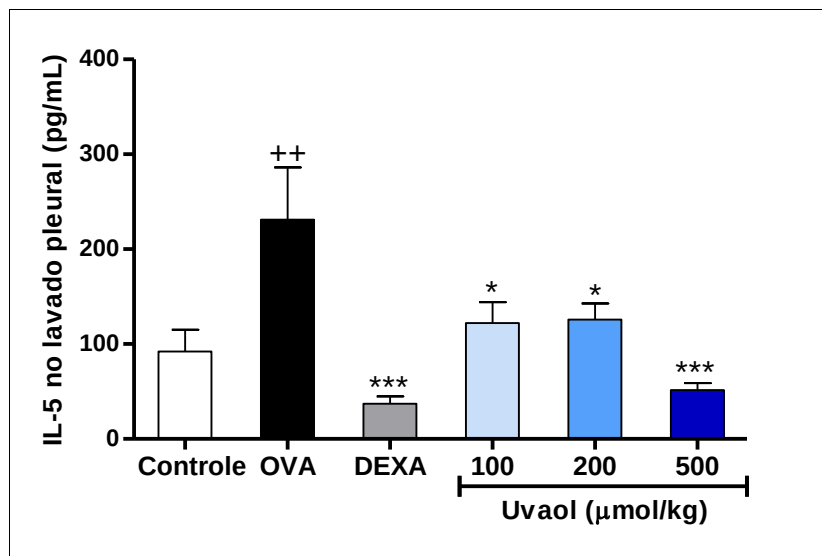
Após 24 h do estímulo antigênico i.t. o número de células presentes no lavado pleural em camundongos alérgicos foi avaliado. Dados apresentados por média $\pm$ E.P.M. de 6 animais. $+++p < 0,001$, $+p < 0,05$ comparados com o grupo controle. $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVA e analisado por One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls-multiple comparison test.

FONTE: Elaborado pelo autor.

A administração de uvaol (100, 200 e 500 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.) 60 min. antes do estímulo antigênico reduziu significativamente o influxo de leucócitos totais para a cavidade pleural (Figura 14), tal como a dexametasona (10 $\mu\text{mol/kg}$, i.p) que reduziu o influxo de leucócitos totais e os eosinófilos 24 horas após o desafio antigênico.

Como observado na Figura 15, o desafio antigênico também foi capaz de aumentar significativamente os níveis de IL-5 no lavado pleural de animais sensibilizados 24h após o desafio i.t. O pré-tratamento oral com uvaol realizado em camundongos em todas as doses reduziu os níveis da citocina. Um resultado similar foi observado após o pré-tratamento com dexametasona.

Figura 15 – Efeito do uvaol sobre os níveis de IL-5 no lavado pleural de animais alérgicos em modelo de pleurisia alérgica



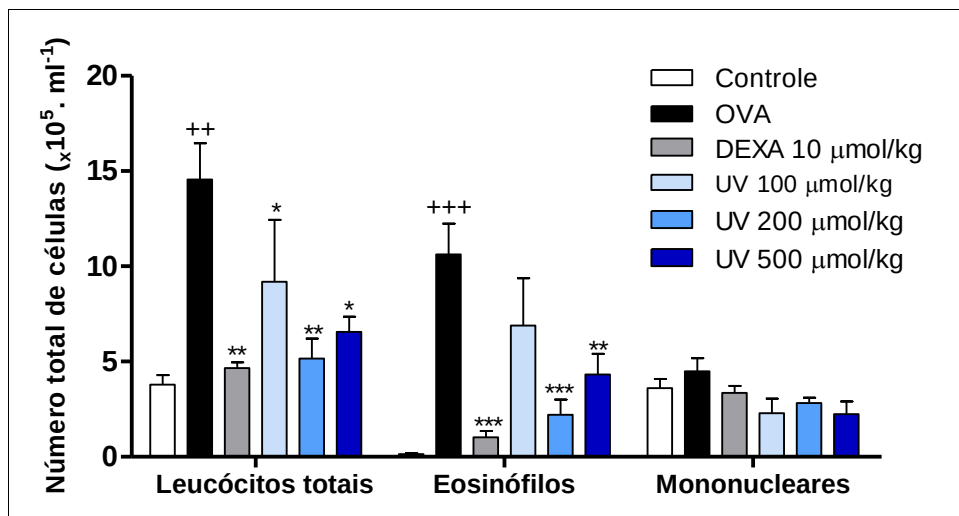
Após 24 h do estímulo antigênico i.t. os níveis de IL-5 presente no lavado pleural em camundongos alérgicos foi avaliado. Dados apresentados por média $\pm$ E.P.M. de 6 animais. ++ $p < 0,01$ comparados com o grupo controle. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVA e analisado por One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls-multiple comparison test.

FONTE: Elaborado pelo autor

5.3 Efeito do uvaol sobre a resposta inflamatória desencadeada por antígeno no modelo de asma em camundongos

O desafio intranasal com OVA, por três dias consecutivos, em camundongos previamente sensibilizados aumentou significativamente o número de leucócitos totais no lavado broncoalveolar, quando comparado com o grupo controle, 48 h após o último desafio sendo esse aumento caracterizado principalmente por eosinófilos e (Figura 16). O pré-tratamento realizado com uvaol (100, 200 e 500 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.) reduziu o número de leucócitos totais, bem como o número de eosinófilos, nos grupos tratados nas concentrações de 200 e 500 $\mu\text{mol/kg}$ (Figura 16). Um resultado similar foi observado após o pré-tratamento com dexametasona que reduziu o influxo de leucócitos totais e eosinófilos, 48 h após o último desafio.

Figura 16 – Efeito do uvaol sobre o influxo de células inflamatórias no lavado broncoalveolar de animais alérgicos em modelo de asma alérgica

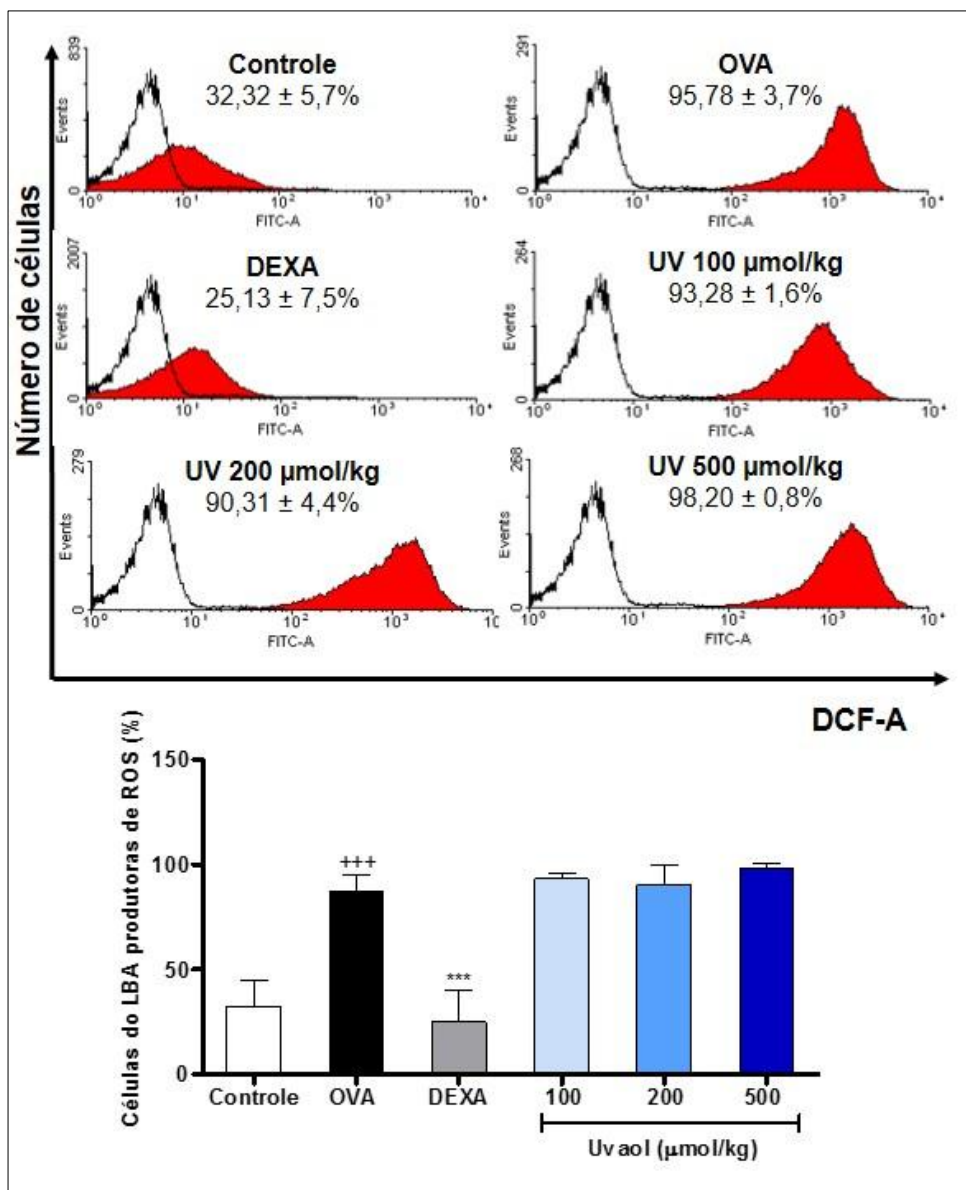


Camundongos alérgicos tratados com uvaol foram estimulados com OVA, e após 48 h do último desafio antigênico o número de células presentes no lavado broncoalveolar foi avaliado. Dados apresentados por média $\pm$ E.P.M. de 6 animais. +++ $p \leq 0,001$, ++ $p \leq 0,01$ comparados com o respectivo grupo controle. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ quando comparado ao respectivo grupo OVA e analisado por One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls-multiple comparison test.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Como apresentado na Figura 17 o desafio antigênico também aumentou significativamente a produção de ERO no lavado broncoalveolar (de $32,32 \pm 5,66$ % para $95,78 \pm 3,70$ % células produtoras de ERO) quando comparado com o grupo controle. Entretanto, o pré-tratamento com uvaol (100, 200 e 500 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.) não foi capaz de interferir na produção de ERO por estes leucócitos após estímulo alérgico. Porém, o pré-tratamento com dexametasona inibiu significativamente o conteúdo de ERO nos leucócitos presentes no LBA de animais asmáticos após estímulo alérgico.

Figura 17 – Efeito do uvaol na produção de ERO por leucócitos obtidos a partir do LBA de animais alérgicos em modelo de asma alérgica



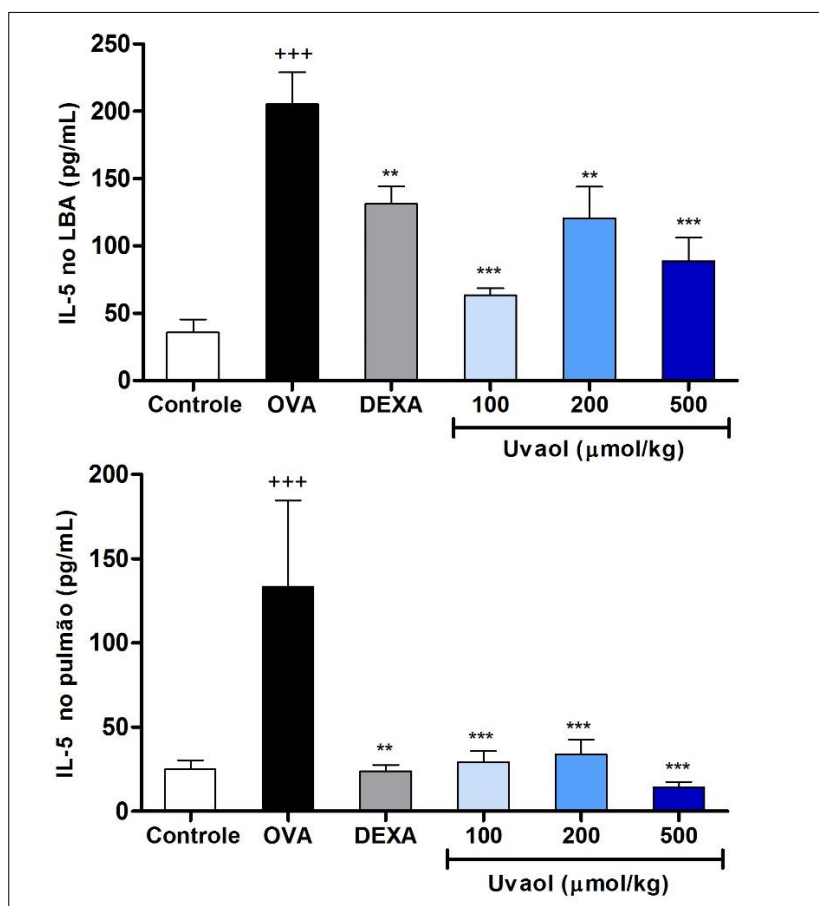
Camundongos asmáticos tratados com uvaol foram estimulados com OVA, e após 48 h do último desafio antigênico o conteúdo ERO foi mensurado nos leucócitos recuperados no LBA. Histogramas representativos dos grupos são apresentados (parte superior). Dados apresentados por média ± E.P.M. de 6 animais. +++ p < 0,001 comparado com o respectivo grupo controle. ***p < 0,001 quando comparado ao respectivo grupo OVA e analisado por *One-way ANOVA* seguido por *Newman-Keuls-multiple comparison test*.

FONTE: Elaborado pelo autor.

De maneira semelhante, o desafio antigênico também aumentou significativamente os níveis de IL-5 no lavado broncoalveolar quando comparado com o grupo controle e no tecido pulmonar. E o pré-tratamento com uvaol (100, 200 e 500 μmol/kg, v.o.) reduziu de maneira significativa os níveis de IL-5 no LBA e no

tecido pulmonar. Assim como o pré-tratamento com dexametasona reduziu de maneira significativa os níveis de IL-5 no LBA no tecido pulmonar (Figura 18).

Figura 18 - Efeito do uvaol sobre os níveis de IL-5 no LBA e no tecido pulmonar de animais alérgicos em modelo de asma alérgica



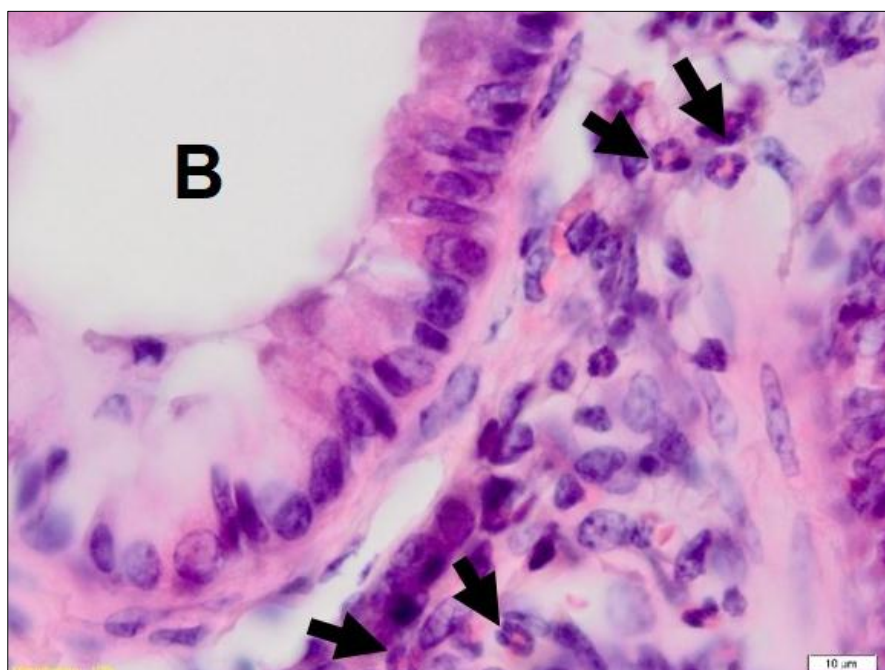
Após 24 h do estímulo antigênico i.t. os níveis de IL-5 presente no lavado broncoalveolar (LBA) (gráfico superior) e tecido pulmonar (gráfico inferior) em camundongos alérgicos foi avaliado. Dados apresentados por média $\pm$ E.P.M. de 6 animais. $++p < 0,01$ comparados com o grupo controle. $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$ quando comparado ao grupo OVA e analisado por One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls-multiple comparison test.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Os pulmões dos animais foram coletados 48 horas após o último desafio e foi realizado cortes histológicos e corados com H.E. e P.A.S. Através da coloração de H.E observou que os pulmões dos animais previamente sensibilizados e estimulado com OVA desenvolveram mudanças morfológicas, como a presença de infiltrados celulares inflamatórios rico em eosinófilos (Figura 19) em áreas perivasculares e peribrônquicas quando comparado com os pulmões dos animais do grupo controle,

que apresentaram uma estrutura tecidual livre de células inflamatórias na região peribrônquica (Figura 20). As análises semi-quantitativas revelam que o pré-tratamento realizado com uvaol reduziu significativamente o infiltrado de células inflamatórias no tecido pulmonar em áreas peribrônquicas após o estímulo antigênico em comparação ao grupo OVA, como apresentado na Figura 20.

Figura 19 – Infiltrado inflamatório rico em eosinófilos na área peribrônquica do pulmão de camundongos asmáticos

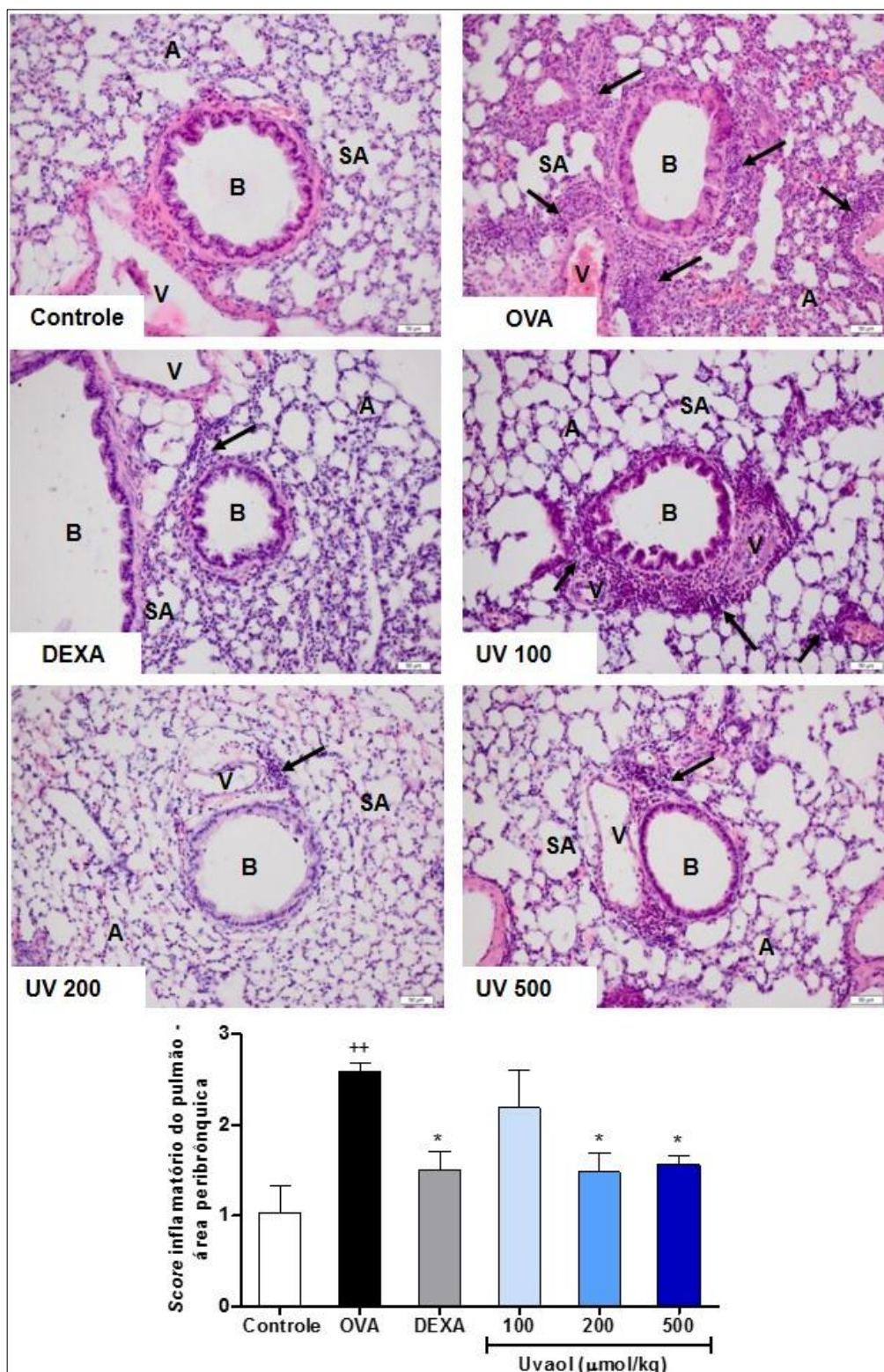


Fotomicrografia representativa do infiltrado inflamatório observado nos cortes histológicos corados com H.E. de camundongos asmáticos (x1000). Setas pretas indicam os eosinófilos. B – bronquíolo.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Para avaliar a repercussão do pré-tratamento com uvaol na superprodução de muco por hiperplasia das células caliciformes foi utilizado a coloração por PAS, uma vez que esta coloração revela a presença de mucopolissacarídeos no tecido (rosa magenta) (Figura 20). O grupo OVA apresentou um aumento nas células produtoras de muco na região dos bronquíolos quando comparado com o grupo controle. Entretanto, o pré-tratamento com uvaol (100, 200 e 500 µmol/kg, v.o.) reduziu significativamente a produção de muco no tecido pulmonar. De maneira semelhante, o pré-tratamento com dexametasona foi capaz de reduzir uma hiperprodução de muco, assim como o infiltrado inflamatório celular nas regiões perivasculares e peribrônquicas do tecido pulmonar.

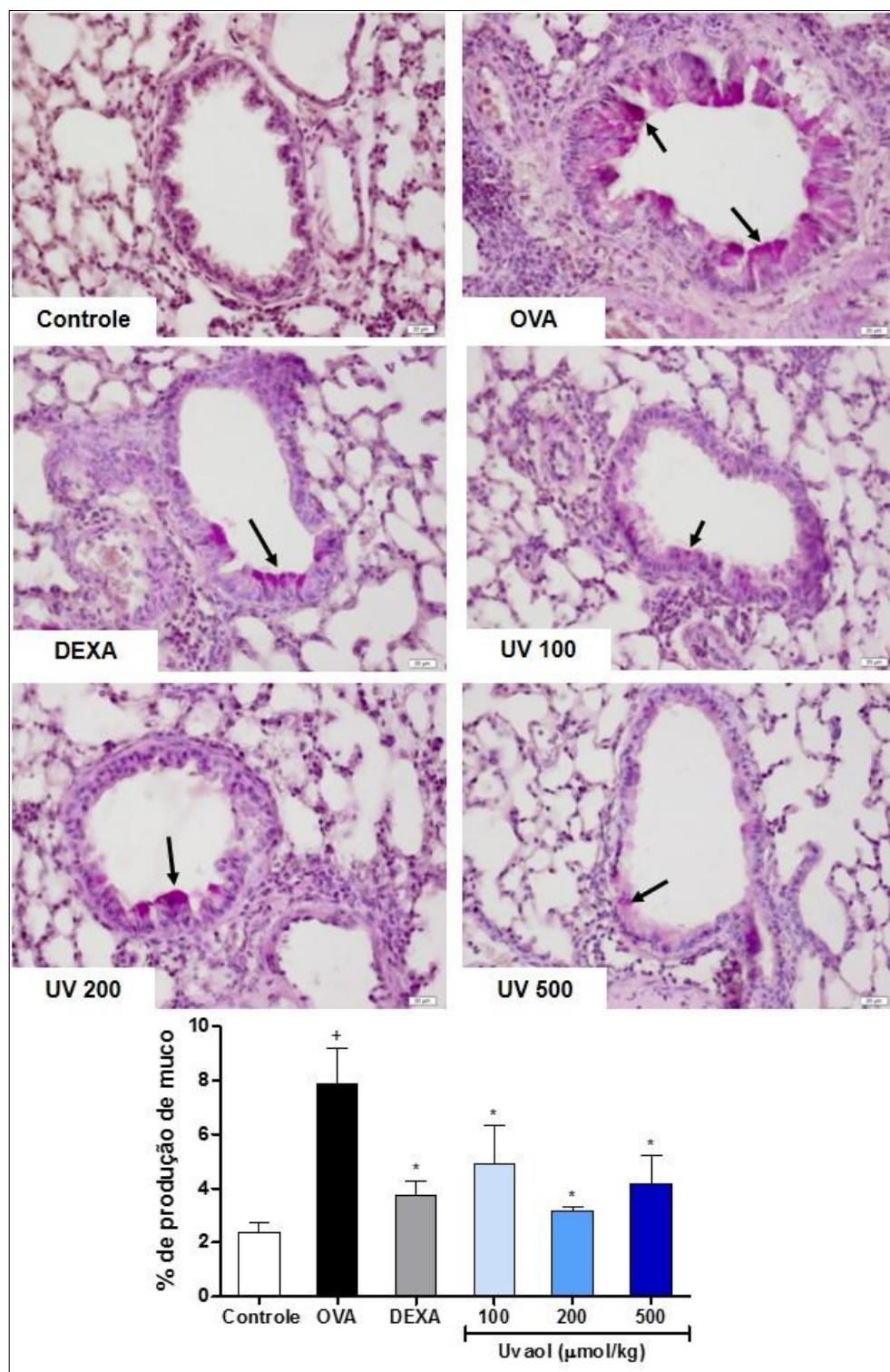
Figura 20 - Efeito do uvaol no tecido pulmonar de camundongos asmáticos



Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do pulmão corados com H.E. (x200). Setas pretas indicam o infiltrado celular inflamatório. B- bronquíolo; SA – Saco alveolar; A – alvéolo; V – vaso sanguíneo. Dados apresentados por média $\pm$ E.P.M. de 4 animais. ++p < 0,01 comparado com o respectivo grupo controle. *p < 0,05 quando comparado ao respectivo grupo OVA e analisado por *One-way ANOVA* seguido por *Newman-Keuls-multiple comparison test*.

FONTE: Elaborado pelo autor.

Figura 21 - Efeito do uvaol na produção de muco no tecido pulmonar de camundongos asmáticos



Fotomicrografia representativas dos cortes histológicos do pulmão corados com P.A.S. (x400). Setas pretas indicam o muco produzido no epitélio bronquiolar corado de rosa magenta. Dados apresentados por média $\pm$ E.P.M. de 4 animais. +p < 0,05 comparado com o respectivo grupo controle. *p < 0,05 quando comparado ao respectivo grupo OVA e analisado por One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls-multiple comparison test.

FONTE: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Este estudo buscou caracterizar o efeito anti-inflamatório do triterpeno uvaol utilizando diferentes modelos experimentais de inflamação alérgica. Inicialmente, com o objetivo de determinar o efeito do uvaol na formação do edema alérgico, animais sensibilizados receberam injeção intraplantar com OVA, e após diferentes intervalos tempo o edema formado foi avaliado. Verificou-se que o efeito do uvaol, no modelo de edema de pata alérgico, reduziu a resposta edematogênica desencadeada após o desafio antigênico. Sabendo que a histamina possui papel chave nas respostas iniciais após estímulo alérgico, buscamos avaliar a interferência do uvaol em reações edematogênicas desencadeada por este mediador. Considerando o importante papel da histamina como um dos principais mediadores inflamatórios envolvidos nas reações alérgicas agudas, avaliou nesse estudo a possível interferência do uvaol no edema induzido pela histamina. Com isso, observou-se que o pré-tratamento com uvaol também suprimiu a formação do edema induzido por histamina, sugerindo que o pré-tratamento oral com uvaol pode estar interferindo com a ação da histamina no tecido. Em sintonia com este resultado, Yasukawa e colaboradores (1996) utilizando o modelo de edema de orelha não alérgico, induzido por TPA (12 – O- Tetradecanolforbol – 13- acetato), demonstrou que o tratamento com uvaol também induziu uma resposta anti-edematogênica, reforçando o potencial anti-anafilático deste triterpeno (YASUKAWA et al., 1996).

Além da atividade anti-edematogênica do uvaol, foi também avaliada a capacidade deste terpeno de interferir no recrutamento leucocitário para o sítio da inflamação no modelo de pleurisia alérgica. Decorridos 14 dias de sensibilização os camundongos foram estimulados com OVA no espaço torácico. Neste modelo, a cavidade pleural recebe o estímulo antigênico e as células residentes (mesotélio, macrófagos, mastócitos, entre outras) secretam diferentes mediadores pró-inflamatórios, incluindo aqueles responsáveis pelo recrutamento de polimorfonucleares (ISSEKUTZ et al., 1995). Durante as primeiras horas do processo inflamatório alérgico, ocorre o extravasamento pleural rico em células inflamatórias, contendo inicialmente neutrófilos, eosinófilos, seguida por fagócitos mononucleares e linfócitos (ANTONY, 2003).

Mediadores liberados no sítio da inflamação auxiliam no recrutamento de eosinófilos para o espaço pleural em tempos mais tardios, tais células são capazes de liberar mediadores inflamatórios e amplificar os danos teciduais nas reações alérgicas. Os resultados revelam que o tratamento com uvaol reduziu esse recrutamento leucocitário, principalmente o influxo de eosinófilos, assim como a quantidade de IL-5 presente no lavado pleural dos animais desafiados antígenoicamente. A IL-5 mostra-se como uma citocina característica do processo inflamatório alérgico, responsável por desencadear a diferenciação terminal, proliferação, migração e ativação de eosinófilos (LINDNER et al., 2010; LUCETTI et al., 2010), mostrando-se então, como um importante alvo na terapêutica contra a alergia.

Uma vez que foi observada redução da quantidade de leucócitos, em especial eosinófilos, presentes na cavidade pleural no modelo de pleurisia alérgica, outro modelo de inflamação alérgica utilizado, foi o modelo experimental de asma alérgica. A resposta inflamatória pulmonar desse modelo induzido com OVA em camundongos reproduz um significativo aumento no total de IgE e mudanças histológicas nas vias aéreas (KUCHAREWICZ; BODZENTA-ŁUKASZYK; BUCZKO, 2008), que são alguns principais aspectos característicos da asma em humanos, incluindo sensibilização ao antígeno mediada por IgE, broncoconstrição aguda, aumento da resistência de vias aéreas, produção de citocinas, linfócitos Th2 e eosinofilia, entre outros (GUALDI et al., 2010).

A asma alérgica é uma doença inflamatória crônica e definida por inflamação das vias aéreas associada com hiper-responsividade e uma hipersecreção de muco em resposta a um estímulo antigênico (MEDOFF et al., 2008) e citocinas inflamatórias Th-2 como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 apresentam-se elevadas nos tecidos pulmonares de humanos asmáticos (ZIMMERMANN et al., 2003) e em animais (ZOZKY et al., 2008). Nesse estudo foi demonstrado que o uvaol reduziu o recrutamento eosinofílico e os níveis de IL-5 presente no lavado broncoalveolar e no tecido pulmonar de camundongos no modelo de asma alérgica induzida por OVA.

Estudos realizados com extrato rico em triterpenoides isolado de *Ganoderma tsugae*, uma planta medicinal chinesa, demonstraram que a suplementação alimentar com este extrato pode aliviar a hiper-responsividade das vias aéreas através da redução dos níveis de IL-4, eotaxina e IL-5 presentes no lavado broncoalveolar, diminuindo assim o infiltrado eosinofílico nas vias aéreas em modelo

de asma alérgica em camundongos (CHEN; LIN, 2007). Esses resultados sugerem que os triterpenóides possuem uma aplicação terapêutica em asma alérgica. Portanto, provavelmente muitos metabólitos secundários encontrados nas plantas sejam os responsáveis pelas atividades anti-asmáticas (CHICHIOCO-HERNANDEZ; PAGUIGAN, 2010). E atualmente muitos estudos vêm comprovando que os triterpenoides pentacíclicos possuem efeitos terapêuticos em asma alérgica, estruturas como ácido ursólico (KIM et al., 2013; LEE et al., 2010), ácido astilbico (YUK et al., 2011), ácido oleanólico, ácido betulínico (LEE et al., 2010), beta-escina (LINDNER et al., 2010), lupeol (VASCONCELOS et al., 2008) e celastrol (KIM et al., 2009) apresentam efeitos anti-asmáticos em modelos animais de asma alérgica induzida por OVA. Todas essas substâncias reduziram o número de eosinófilos e os níveis de IL-5 das vias aéreas.

A redução do recrutamento eosinofílico para o tecido pulmonar causada pelo tratamento com uvaol é, portanto, essencial para minimizar os danos no tecido e/ou melhorar a recuperação do tecido, visto que os eosinófilos são capazes de liberar várias proteínas citotóxicas, como proteína básica maior, fator ativador de plaquetas e leucotrienos, que são responsáveis pelos danos característicos causados no epitélio das vias aéreas em asma alérgica (BUSSE; LEMANSKE, 2001).

Uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) também é responsável por causar dano tecidual no pulmão, pois ERO são capazes de provocar distúrbios na membrana celular. Além disso, estudos recentes têm mostrado que as respostas inflamatórias são acionadas via produção de ERO na asma alérgica (LEE et al., 2012). E considerando que a geração de ERO por células efetoras da inflamação possui contribuição na amplificação/perpetuação da resposta inflamatória, quantificou o conteúdo de ERO existente nos leucócitos obtidos do LBA após estimulação antigênica para avaliar um possível efeito do uvaol no metabolismo oxidativo dos leucócitos. Assim, verificou-se que o uvaol não interferiu na produção de ERO em células do lavado broncoalveolar. Esses dados claramente indicam que uvaol apresenta uma atividade anti-inflamatória nas vias aéreas em modelo de doença inflamatória pulmonar, porém não é através de uma ação antioxidante.

Visto que o uvaol possui a capacidade de diminuir significativamente o infiltrado celular em regiões peribrônquicas do pulmão, avaliou a interferência dessa substância na hiperprodução de muco, pois sabe-se que outra característica

importante no remodelamento das vias aéreas em decorrência da asma é a hiperplasia das células caliciformes e hiperprodução de muco. Essas características contribuem substancialmente para o número elevado de morbidade e mortalidade gerado pela doença (YUAN et al., 2011). E através da quantificação da hiperprodução de muco através de cortes histológicos corados com PAS, observou-se que o uvaol reduziu significativamente a produção de muco. Alguns triterpenoides pentacíclicos como o lupeol (VASCONCELOS et al., 2008), o ácido astilbico (YUK et al., 2011), o celastrol (KIM et al., 2009), a beta escina (LINDNER et al., 2010) e o ácido ursólico (KIM et al., 2013) apresentaram efeito semelhante ao uvaol, inibindo efetivamente o recrutamento eosinofílico e a superprodução de muco no pulmão.

Em conjunto, os dados apresentados aqui revelam o uvaol como um promissor princípio ativo com potencial terapêutico para doenças inflamatórias alérgicas, apresentando uma atividade anti-inflamatória, principalmente nas vias aéreas em modelo de doença complexo como a asma alérgica, devido a sua capacidade de interferir na produção de IL-5 no tecido pulmonar e não através de uma via inflamatória mediada pela produção de espécies reativas de oxigênio.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o uvaol:

- Apresenta efeito antiedematogênico induzindo uma inibição do edema de pata formado tanto por antígeno (OVA) quanto por histamina.
- Inibe o recrutamento de leucócitos totais e eosinófilos para a cavidade torácica no modelo de pleurisia alérgica, assim como para o tecido pulmonar no modelo de asma alérgica. No tecido pulmonar, o uvaol reduz a produção de muco.
- Atenua a produção da citocina pró-inflamatória IL-5 no modelo de pleurisia alérgica e no modelo de asma alérgica, tanto no lavado broncoalveolar quanto no tecido pulmonar. Entretanto, não interfere na produção de espécies reativas de oxigênio.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIKOPOULOS, N. K. et al. Inhibitory Activity of Minor Polyphenolic and Nonpolyphenolic Constituents of Olive Oil Agai In Vitro Low-Density Lipoprotein Oxidation. *Journal of medicinal food*, v 5, n. 1, p. 1-7, 2002.

ANTONY, V. B. Immunological mechanisms in pleural disease. *European Respiratory Journal*, v. 21, p. 539-544, 2003.

ALI, N. Brine shrimp cytotoxicity of crude methanol extract and antispasmodic activity of α -amyrin acetate from *Tylophora hirsuta* wall. *BMC Complement Altern Med.*, v. 13, p. 1-7, 2013.

ALLOUCHE, Y. et al. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 2885-2890, 2010.

_____. Antioxidant, Antiproliferative, and Pro-apoptotic Capacities of Pentacyclic Triterpenes Found in the Skin of Olives on MCF-7 Human Breast Cancer Cells and Their Effects on DNA Damage. *J. Agric. Food Chem.*, v. 59, p.121–130, 2011.

BARNES, P. J. Corticosteroids: The drugs to beat. *European Journal of Pharmacology*, v. 533, p. 2-14, 2006.

BEL, E. H. Clinical phenotypes of asthma. *Curr Opin Pulm Med*. v.10, p. 44-50, 2004.

_____. Mild Asthma. *The New England Journal of Medicine*, v. 369, p. 549-557, 2013.

BIERLORY, L. Complementary and alternative interventions in asthma, allergy and immunology. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, v.93, p. 545-554, 2004.

BIELORY, L; LUPOLI, K. Review article: herbal interventions in asthma and allergy. *J Asthma*, v. 36, p. 1-65, 1999.

BRACKE, M. et al. Differential effects of the T helper cell type 2-derived cytokines IL-4 and IL-5 on ligand binding to IgG and IgA receptors expressed by human eosinophils. *J Immunol* , v. 159, p. 1459–1465, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS nº 709, de 17 de dezembro de 2010. Diário oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 dez 2010. Seção 1, p. 99.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S; PARKER, K. L. Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11ª Edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010.

BUSSE, W. W. et al. Safety profile, pharmacokinetics, and biologic activity of MEDI-563, an anti-IL-5 receptor α antibody, in a phase I study of subjects with mild asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 125, p. 1237–1244, 2010.

BUSSE, W. W.; LEMANSKE J. R., R.F., Asthma. *N. Engl. J. Med.*, v. 344, p. 350–362, 2001.

CAMPO, P. Phenotypes and Endotypes of Uncontrolled Severe Asthma: New Treatments. *J Investig Allergol Clin Immunol*; v. 23, n. 2, p. 76-88, 2013.

CARVALHO, P. S. M. Influência do triterpeno pentacíclico uvaol sobre cicatrização de feridas cutâneas em camundongos. 2013. Dissertação (Mestre em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2013.

CHAUHAN, B. F. et al. Intermittent versus daily inhaled corticosteroids for persistent asthma in children and adults. *Cochrane Database Syst.*, v. 12, CD009611, 2012.

CHEN, G. et al. Effect of five triterpenoid compounds isolated from leaves of *Diospyros kaki* on stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation in human polymorphonuclear leukocytes. *Clinica Chimica Acta*, v.320, p. 11-16, 2002.

CHEN, M. L.; LIN, B. F. Effects of Triterpenoid-Rich Extracts of *Ganoderma tsugae* on Airway Hyperreactivity and Th2 Responses in vivo. *Int Arch Allergy Immunol*; v. 143, p. 21–30, 2007.

CHICHIOCO-HERNANDEZ, C. L.; PAGUIGAN, N. D. Phytochemical profile of selected Philippine plants used to treat asthma. *Phcog. J.*, v. 2, n. 8, p. 198-202, 2010.

CHIAPPARA, G. et al. Airway remodelling in the pathogenesis of asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, v. 1, p. 85–93, 2001.

CONRAD, M. L. et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clinical & Experimental Allergy*, v. 39, p. 1246–1254, 2009.

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

DI CARLO, G et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, v.65, n.4, p. 337-353, 1999.

DI STASI et al., Studies on anti-allergic constituents in the leaves and stems of *Anchietia salutaris*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 47, p. 890-893, 1999.

DZUBAK, P. et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports*, v. 23, p. 394–411, 2006.

FILHO, A. A. S. et al. In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Fitoterapia*, v. 80, p. 478–482, 2009.

FOLLENWEIDER, L. M.; LAMBERTINO, A. Epidemiology of Asthma in the United States. *Nurs Clin N Am*, v. 48, p. 1-10, 2013.

FOSTER, P.S. et al. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.*, v. 183, p. 195–201, 1996.

FURUTA, G. T. et al. Eosinophils alter colonic epithelial barrier function: role for major basic protein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 289, p. G890–G897, 2005.

GUALDI, L. P. et al. Modelos murinos para pesquisas em asma: uma análise crítica atualizada. *Scientia Medica*, v. 20, p. 236-242, 2010.

GENESER, F. Atlas color de histología. 1. ed. Madri: Medica Panamericana, 1998.

GOUNNI, A.S. et al. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature*, v. 367, p. 183–186, 1994.

GUINDA, A. et al. Pentacyclic Triterpenoids from Olive Fruit and Leaf. *J. Agric. Food Chem.*, v. 58, p. 9685–9691, 2010.

HALDAR, P. et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N. Engl. J. Med.*, v. 360, p. 973–984, 2009.

HAMMAD, H. et al. Inflammatory dendritic cells—not basophils—are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J. Exp. Med.*, v. 207, p. 2097–2111, 2010.

HARBORNE, J. R. *Introduction to ecological biochemistry*. 4. ed. London: Elsevier; 1993.

HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature medicine*. v.18, n. 5, p. 673-683, 2012.

HURST, S. D. et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J. Immunol.*, p. 443–453, 2002.

ISSEKUTZ, A. C. et al. CD11/CD18-independent transendothelial migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes: involvement of distinct and unique mechanisms. *J Leukoc Biol.*, v. 57, p.553-561, 1995.

JOHNS, D. P. et al. Airway distensibility in healthy and asthmatic subjects: effect of lung volume history. *J. Appl. Physiol.*, v. 88, p. 1413–1420, 2000.

KENNEDY, D. O.; WIGHTMAN, E. L. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. *American Society for Nutrition. Adv. Nutr.*, v. 2, p. 32–50, 2011.

KILLEEN, K; SKORA, E. Pathophysiology, Diagnosis, and Clinical Assessment of Asthma in the Adult. *Nurs Clin N Am*, v. 48, p. 11-23, 2013.

KITA, H. Eosinophils: Multifunctional and Distinctive Properties. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 161 (suplemento 2), p. 3-9, 2013.

KIM, D. Y. et al. Celastrol suppresses allergen-induced airway inflammation in a mouse allergic asthma model, *European Journal of Pharmacology*, v. 612, p. 98–105, 2009.

KIM, S. H. et al. Ursolic acid, a potential PPAR γ agonist, suppresses ovalbumin-induced airway inflammation and Penh by down-regulating IL-5, IL-13, and IL-17 in a mouse model of allergic asthma. *European Journal of Pharmacology*, v. 70, p. 131–143, 2013.

KUCHAREWICZ, I.; BODZENTA-ŁUKASZYK, A.; BUCZKO, W. Experimental asthma in rats. *Pharmacol. Reports*, v. 60, p. 783-788, 2008.

KUDO, M. et al. *Pathology of asthma. Frontiers in Microbiology*, v.4, n. 263, p. 1-16, 2013.

LECHNER, A.J.; MATUSCHAK, G. M.; BRINK, D. S. *Pulmões: uma Abordagem Integrada à Doença*. 1. ed. Porto Alegre: Mcgraw Hill, 2013.

LEE, C. W. Study of Skin AntiAgeing and AntiInflammatory Effects of Dihydroquercetin, Natural Triterpenoids, and Their Synthetic Derivatives. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, v. 38, n. 3, p. 328–334, 2012.

LEE, J. Y. et al. Effects of Hydroxy Pentacyclic Triterpene Acids from *Forsythia viridissima* on Asthmatic Responses to Ovalbumin Challenge in Conscious Guinea Pigs, *Biol. Pharm. Bull.*, v. 33, n. 2, p. 230—237, 2010.

LEE, K. K. et al. Antispasmodic effect of shakuyakukanzoto extract on experimental muscle cramps in vivo: role of the active constituents of Glycyrrhizae radix. *J Ethnopharmacol.*, v. 145, p. 286-293, 2013.

LICONA-LIMÓN, P. et al. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nature Immunology*, v. 14, n. 6, p. 536-542, 2013.

LINDNER, I. et al. Beta-escina in has potent anti-allergic efficacy and reduces allergic airway inflammation. *BMC Immunology*, v. 11, n. 24, p. 1-10, 2010.

LIU, J. et al. The effect s of 10 triterpenoids compounds on experimental liver injury in mice. *Fundamental and applied toxicology*, v.22, p-34-40, 1994.

LIU, L. Y. et al. Human airway and peripheral blood eosinophils enhance Th1 and Th2 cytokine secretion. *Allergy*, v. 61, p. 589–597, 2006.

LLOYD, C. M.; HESSEL, E.M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol.*, v. 10, p. 838-848, 2010.

LUCETTI, D. L. et al. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. *Journal of Inflammation*, v. 7, n. 60, p. 1-11, 2010.

MAHATO, S B; SARKAR, S. K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponons. *Phytochemistry*, v. 27, p. 3037-3067, 1988.

MARQUEZ-MARTIN, A.; LA PUERTA, R.; FERNANDEZ-ARCHE, A. Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine*, v. 36, p. 211- 217, 2006.

MARTÍN, R. et al. DIOL Triterpenes Block Profibrotic Effects of Angiotensin II and Protect from Cardiac Hypertrophy. *PLoS ONE*, v. 7, p. 1-14, 2012.

_____. Natural Triterpenic Diols Promote Apoptosis in Astrocytoma Cells through ROS-Mediated Mitochondrial Depolarization and JNK Activation. *PLoS ONE*, v. 4, p. 1-14, 2009.

MARTINS, A. et al. Antibacterial properties of compounds isolated from *Carpobrotus edulis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 37, p. 438–444, 2011.

MEDOFF, B. D. et al. T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 26, p. 205–232, 2008.

MELO, R. R. S. Avaliação da atividade imunomodulatória do triterpeno pentacíclico uvaol. 2013. Dissertação (Mestre em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2013.

MESCHER, A. L. Junqueira's Basic Histology, 12. ed. Estados Unidos: McGraw-Hill, 2010.

MIN, B. S. et al. Cytotoxic Triterpenes from *Crataegus pinnatifida*. *Arch Pharm Res.*, v. 23, n. 2, p. 155-158, 2000.

MIURA, N. et al. Protective Effects of Triterpene Compounds Against the Cytotoxicity of Cadmium in HepG2 Cells. *Molecular Pharmacology*, v.56, p.1324–1328, set.1999.

MISHRA, A. et al. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *J. Clin. Invest.*, v. 103, p.1719–1727, 1999.

MOSMANN, V. R. et al. Two types of murine helper T cell clone: I. Definition according to profiles of lymphokines activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*, v. 7, p. 2348-2356, 1986.

MYOU, S. et al. Blockade of Inflammation and Airway Hyperresponsiveness in Immune-sensitized Mice by Dominant-Negative Phosphoinositide 3-Kinase–TAT. *J. Exp. Med.*, v. 198, p. 1573–1582, 2003.

NAIR, P. et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputumeosinophilia. *N. Engl. J. Med.*, v. 360, p. 985–993, 2009.

PANLAB – HARVARD APPARATUS. 1 fotografia, color. Disponível em: <<http://www.panlab.com/javascript/popup4.php?produto=PLETHYSMOMETER&tipo=hard&id=1&rotulo=PLETHYSMOMETER&imagen=/panlabWeb/Hardware/PLETHYSMOMETER/LPLETHYSMOMETER120>>. Acesso em: 07 dez. 2011.

PARK et al. Effect of saikosaponin-A, a triterpenoid glycoside, isolated from *Bupleurum falcatum* on experimental allergic asthma. *Phytother. Res.*, v.16, p. 359–363, 2002.

PAWANKAR, R. et al. WAO White Book on Allergy 2011-2012: Executive Summary. [S.l.: s.n.], Cop. 2011.

PETERSON, S. et al. Increased expression of CC chemokine ligand 18 in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J. Allergy Clin Immunol*, p. 119-127.e9, 2012.

PRICE, D. et al. Leukotriene antagonists as first-line or add-on asthma-controller therapy. *N Engl J Med*, v. 364, p. 1695-1707, 2011.

RAM, A. et al. Glycyrrhizin alleviates experimental allergic asthma in mice. *International Immunopharmacology*, v. 6, p.1468–1477, 2006.

RIO, E. B. M. et al. Mortalidade por asma no Município de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 36, p. 146-154, 2002.

ROCHE, W. R. et al. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*, v. 1, p. 520–524, 1989.

ROGERIO, A.P.; SÁ-NUNES, A.; FACCIOLI, L.H. The activity of medicinal plants and secondary metabolites on eosinophilic inflammation. *Pharmacological Research*, v. 62, p. 298 – 307, 2010.

ROHMER, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep.*, v.16, p. 565–574, 1999.

ROSS, M. H; PAWLINA, W. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins-Wolters Kluwer business, 2011.

SAENZ, S. A. et al. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev.*, v. 226, p. 172–190, 2008.

SAUDAGAR, P.; DUBEY, V. K. Cloning, expression, characterization and inhibition studies on trypanothione synthetase, a drug target enzyme, from *Leishmania donovani*. *Biol. Chem.*, v. 392, p. 1113–1122, 2011.

SHAHANI, S. et al. Anti-Helicobacter pylori Activity of the Methanolic Extract of Geum iranicum and its Main Compounds. *Z. Naturforsch.*, v. 67 c, p. 172 – 180, 2012.

SHARATH, B. G. et al Wound Healing and Protease Inhibition Activity of Bacoside-A, Isolated from *Bacopa monnieri* Wettst. R. *Phytotherapy research phytothe.* v. 24, p. 1217–1222, 2010.

SIDDIQUI, M. S. et al. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. *FEMS Yeast Res.*, v. 12, p. 144–170, 2012.

SIGMA-ALDRICH. 1 fotografia, p&b. Disponível em:
<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/u6628?lang=pt®ion=BR>>.
Acesso em: 12 de jan. 2014.

SOLÉ, D., et al. Study of asthma and allergies in childhoods (ISAAC): prevalence of asthma and asthma-related symptoms among Brazilian schoolchildren. *J Investig Allergol Clin Immunol*, v. 11, p. 123-128, 2001.

SOMOVA, L. I. et al. Cardiogenic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol. *Phytomedicine*, v. 11, p. 121–129, 2004.

TAKETA, A. T. C. et al. Triterpenoids from Brazilian *Illex* Species and Their in Vitro Antitrypanosomal Activity. *J. Nat. Prod.*, v. 67, p. 1697-1700, 2004.

TO, T. et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*, v. 12, p. 3-8, 2012.

UKIYA, M. et al. Constituents of Compositae plants III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers. *Cancer Letters*, v. 177, p. 7-12, 2002.

VASCONCELOS, J. F. et al. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. *International Immunopharmacology*, v. 8, p. 1216-122, 2008.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discov Today*, v. 3, p. 232–228, 1999.

WALKER, J. A., BARLOW, J. L., MCKENZIE, A. N. Innate lymphoid cells – how did we miss them? *Nat Rev Immunol.*, v. 13, p. 75–87, 2013.

WOLTERINK, R. G., J. K; HENDRIKS, R.W. Type 2 Innate Lymphocytes in Allergic Airway Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep*, v. 13, p. 271-280, 2013.

YANG, Z. G. Inhibitory Effects of Constituents from *Morus alba* var. *multicaulis* on Differentiation of 3T3-L1 Cells and Nitric Oxide Production in RAW264.7 Cells. *Molecules*, v.16, p. 6010-6022, 2011.

YASUKAWA, K. et al. Inhibitory Effect of Di- and Trihydroxy Triterpenes from the flowers of compositae on 12-O-Tetradecanolyphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 19, n. 10, p. 1329-1331, 1996.

YOUSEFI, S. et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med*, v. 14, p. 949–953, 2008.

YUAN, X. et al. Effects of Astragaloside IV on IFN-Gamma Level and Prolonged Airway Dysfunction in a Murine Model of Chronic Asthma. *Planta Med*; v. 77, p. 328–333, 2011.

YUK, J. E. et al. Effects of astilbic acid on airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of allergic asthma. *International Immunopharmacology*, v. 11, p. 266–273, 2011.

ZIMMERMANN, N. et al. 2003. Chemokines in asthma: Cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v. 111, p. 227–242, 2003.

ZOZKY, G. R. et al. Ovalbumin-sensitized mice are good models for airway hyperresponsiveness but not acute physiological responses to allergen inhalation. *Clin. Exp. Allergy*, v. 38, p.829–838, 2008.