

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS**  
**BIOATIVOS**

**LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA**

**ESTUDO DOS MECANISMOS IMUNOMODULADORES DO ALCALOIDE**  
**SINTÉTICO MHTP NA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICA**  
**COMBINADAS (CARAS) EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA**

**JOÃO PESSOA – PB**  
**2020**

**LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA**

**ESTUDO DOS MECANISMOS IMUNOMODULADORES DO ALCALOIDE  
SINTÉTICO MHTP NA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICA  
COMBINADAS (CARAS) EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de **DOUTORA EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS.**

Área de concentração: **Farmacologia**

**Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam**

**JOÃO PESSOA – PB**

**2020**

### **Catálogo na publicação Seção de Catalogação e Classificação**

F383ee Ferreira, Laércia Karla Diega Paiva.

Estudo dos mecanismos imunomoduladores do alcaloide sintético MHTP na Síndrome da Asma e Rinite Alérgica Combinadas (CARAS) experimental induzida por ovalbumina

/ Laércia Karla Diega Paiva Ferreira. - João Pessoa, 2020.

142 f. : il.

Orientação: Marcia Regina Piuvezam.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Alcaloide sintético MHTP. 2. Asma. 3. Rinite. 4. CARAS. 5. Imunomodulação. I. Piuvezam, Marcia Regina. II. Título.

UFPB/BC

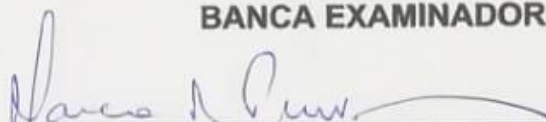
LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA

**ESTUDO DOS MECANISMOS IMUNOMODULADORES DO ALCALOIDE  
SINTÉTICO MHTP NA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICA  
COMBINADAS (CARAS) EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA**

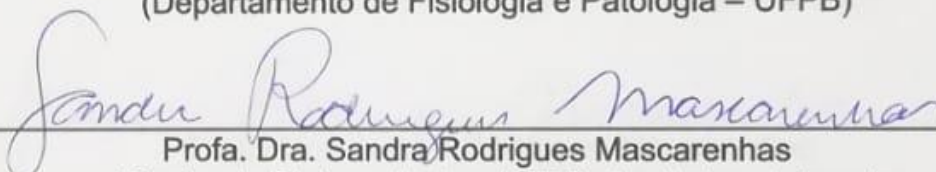
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de **DOUTORA EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**.

Tese de Doutorado aprovada em 17/02/2020

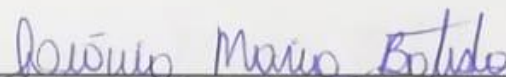
**BANCA EXAMINADORA**



Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam (**Orientadora**)  
(Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB)



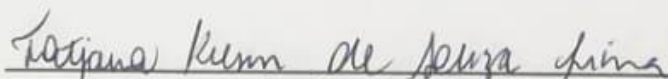
Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas  
(Centro de Biotecnologia – UFPB. Avaliadora Interna)



Profa. Dra. Leônia Maria Batista  
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB. Avaliadora Interna)



Profa. Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo  
(Fundação Oswald Cruz – PE. Avaliadora Externa)



Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima  
(Centro de Biotecnologia – UFPB. Avaliadora Externa)

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral  
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB. Suplente Interna)

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins  
(Departamento de Biologia Molecular – UFPB. Suplente Externa)

*A **Deus** por ser o autor de minha vida; a  
melhor parte de mim, meu esposo **Luís Romero  
Barbosa**; e a minha irmã sempre companheira  
**Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira***

*Eu dedico!*

## **AGRADECIMENTOS**

**A trindade soberana e perfeita: Deus pai, Jesus Cristo filho e Espírito Santo.** Viver nossa identidade é viver feliz e sou feliz em saber minha identidade em Ti, Senhor. Louvo e agradeço a Ti, por cada pessoa que colocaste em minha vida, cada trabalho a mim confiado, cada experiência adquirida e em tudo e por tudo te dou graças, pois Teu é o Reino, a Glória e o Louvor para Sempre. E tenho certeza que "...todas as coisas cooperam para o bem daqueles que te amam..." (Rm 8:28). Sou grata por mais um ciclo está se concluindo e outro se iniciando, e sei que em todo o tempo estarás comigo, pois sei que para tudo há um tempo determinado.

**Ao meu esposo, Luís Romero Barbosa,** sou uma mulher muito abençoada por ter você ao meu lado, meu companheiro. Poderia aqui descrever todas as suas qualidades e todos os momentos em que nosso companheirismo foi colocado a prova, no entanto, o que mais importa é a convicção que você foi a minha melhor escolha e que nossa família é propósito de Deus. Agradeço a Deus por está te capacitando cada vez mais no exercício do sacerdócio do lar e venho trabalhando muito na tal "mulher virtuosa". Não posso deixar de registrar que o período cotutela na Alemanha foi essencial para a solidificação de nossos laços, aprendemos a ouvir, amar e respeitar mais um ao outro, entendemos que companheirismo é muito maior que a distância João Pessoa-Berlim, e tive a oportunidade de conhecer um pouco o mundo ao seu lado (Alemanha, França, Itália, Espanha, Portugal, Polônia, Hungria), e em cada lugar que íamos, estava tranquila por ter a certeza que ao seu lado nada podia fracassar, afinal, o casamento é uma viagem extraordinária por lugares desconhecidos e toda experiência compartilhada é essencial para nosso crescimento pessoal. Obrigada por todo apoio em minha profissão, em meus artigos e em minhas escolhas, você é o homem da minha vida.

**Aos meus pais, Luiz Carlos de Souza Ferreira e Clélia Paiva da Veiga,** por serem a minha força motriz, por nunca desistirem de mim, por todas as renúncias profissionais e pessoais, hoje, mais que nunca, tenho orgulho e sou honrada em tê-los como minha base. Meu amor por vocês é inexplicável e chega uma hora que o cuidado e responsabilidade de pai/mãe para filho se inverte e está chegando esse tempo conosco. Só peço a Deus que tenhamos muitos anos e ciclos juntos, pois o que sou hoje é o fruto de tudo que vocês semearam em minha educação. Amo muito

os dois. **A minha avó, Maria Alves de Souza Ferreira**, antes era “veia” e hoje é “mary”, minha vizinha obrigada por ser o alicerce de nossa família, uma única avó com amor multiplicado por quatro, sempre foi assim, mesmo que seu jeito único de amar, e nossa relação única de amor seja muitas vezes incompreendida por todos. Eu a amo muito e tenho admiração enorme pelo que a senhora sempre foi e representa em nossa família.

**A minha irmã, Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira**, confesso que foi o agradecimento mais difícil que fiz. Além de compartilhar os pais e a família, compartilhamos a profissão e venho me orgulhando com a mulher que você está se tornando. Seria muito fácil escrever uma tese sobre nosso relacionamento e como ele evoluiu, passamos de irmãs de gerações diferentes, que mal brincávamos juntas, porque sempre terminava em briga, e eu sempre apanhava da irmã quatro anos mais nova que eu, para colaboradoras inseparáveis de bancada. Sinto muito orgulho da pesquisadora que você está se tornando e, logo mais, seremos doutoras em Imunofarmacologia e, pasmem, somos colegas farmacêuticas. Sinto uma responsabilidade enorme em ser referência para você, talvez por isso foram tantas repreensões calorosas e poucos parabéns no sucesso, aqui é o melhor lugar para pedir perdão por minhas falhas na sua formação, talvez, por ter em mente que um ótimo aluno teve um bom professor te forcei a ser uma excelente aluna. Me orgulho muito de todas as suas conquistas e toda sua evolução em todas as áreas de sua vida, nunca esqueça que estarei aqui, sempre nos bastidores, te aplaudindo de pé e tenho orgulho de dizer que você será melhor que eu. Te amo.

**Ao meu pastor Mano e sua esposa Rinalda**, por ser aqui na terra meu líder espiritual e que sempre intercede por mim ao nosso Deus. **A todos os irmãos em Cristo** que fazem parte a Igreja Evangélica Casa de Davi (**IECD**), pelas orações, palavras, mensagens e carinho dados a mim em todo o tempo. A todos os meus familiares (tios e primos), em especial minhas **tias Raquel, Mariinha e Socorro** por todo apoio direto e indiretamente ao longo de minha vida. A toda família do meu esposo, em especial **meus sogros, dona Fabiana e seu Lúcio** e minhas **cunhadas, Carol e Carina**, por me receberem em sua família e serem um porto seguro para nós.

**A minha orientadora, a Profa Dra Marcia Regina Piuvezam**. Nesses 10 anos de convívio já falei várias vezes e não é segredo para ninguém que tenho a

honra de ter sido orientada por um exemplo de profissional ética, educada e gentil. São inúmeros adjetivos que eu posso elencar, no entanto, só gostaria de externar minha admiração e falar que a senhora é uma inspiração para mim. Ao longo da minha caminhada científica, passei de uma IC calada para, como a senhora falava, seu “braço direito”, e quantos aprendizados nos permitimos passar. Desde um *paper* ser reconstruído das cinzas como uma publicação na revista dos meus sonhos em que tivemos a coragem de tentar (nunca me esquecerei de todas as nossas reuniões sobre eles). Não posso deixar aqui de agradecer por toda responsabilidade depositada em mim para ser a responsável da cota, compras, animais, reuniões e gestão dos seus alunos, momentos inesquecíveis. Enfim, passar de orientanda para o grupo de “censo de prioridade” não está sendo fácil. Finalizo essa etapa da minha vida feliz e grata a Deus por ter convivido e aprendido, pelo menos um pouco, a conduzir minha vida do jeito Marcia Piuvezam de ser.

**Aos Professores e colegas do doutorado e da pós-graduação**, pela contribuição acadêmica e científica em minha tese e na minha vida profissional. Em especial a **Fátima**, pós hoc. do Laboratório de Cardiovascular, coordenado pelo **prof. Dr. Isaac Almeida de Medeiros**, por sempre ceder e ser tão prestativa nos auxiliando com a citometria de fluxo. A eterna colega de bancada **Talissa Mozzini Monteiro** pelo companheirismo de sempre e, principalmente, por colaborar durante as marcações no citômetro de fluxo. Ao **prof. Dr. Adriano Alves** que colaborou com toda a histologia da minha tese. Ao **prof. Dr. Luís César Rodrigues**, mentor do MHTP, que nos cedeu gentilmente essa molécula em todos os meus estudos, desde o TCC até o doutorado.

**Aos que constroem o Laboratório de Imunofarmacologia (LYMFA)**, um ambiente de trabalho que me fez evoluir como pessoa e como profissional, fecho um ciclo de 10 anos com muito orgulho do caminho que fiz e de todos os colaboradores que tive. A cada conselho, ajuda na bancada, atitudes que me inspiraram a sempre dar o meu melhor em cada momento que estive no laboratório. Aos do **#teampiuvezam** (**Larissa Rodrigues, Larissa Adilis, Raquel, Allysson, Grasiela, Louise, João, Cosmo e Rita**), as pupilas de Dra. Giciane Carvalho Vieira (**Heivila e Larissa Xavier**), ao **#teammascarenhas** (**Luiz Henrique, José Guilherme, Marreiro, Juliane, Éssia e Deyse**). Aos professores do LYMFA **Cláudio, Sandra e**

**Giciane**, por direta ou indiretamente participarem da minha tese e pela construção da minha formação acadêmica científica durante os últimos 10 anos de minha vida.

**As minhas eternas ICs (Iniciação Científica) Larissa Adilis e Grasiela Costa Bezerra:** meninas esse trabalho é nosso. Só posso agradecer a Deus por Ele ter colocado em minha vida as duas melhores profissionais farmacêuticas do mundo. Todas as madrugadas juntas, desafiando os animais, gravando os sinais clínicos nos fins de semana, quantos feriados passamos juntas trancadas no laboratório, quantos choros de alegria quando o experimento funcionava e quanta tristeza quando não, independente do resultado estávamos juntas prontas para próximo experimento, e lá se foram incontáveis PCs (Protocolo de CARAS, kkkk). Obrigada por estarem ao meu lado sempre, por me fazerem confiar 100% em vocês e obrigada por me deixarem ser expectadora do sucesso profissional de cada uma, cada vitória de vocês é minha também.

As professoras membros da Banca de Qualificação **Giciane Carvalho Vieira, Leônia Maria Batista e Tatjana Keesen de Souza Lima**, pela consideração e zelo em participar da construção da minha tese, com sugestões que nos fizeram aprimorar esse trabalho. Os membros da Banca Examinadora da minha tese **Sandra Rodrigues Mascarenhas, Leônia Maria Batista, Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo e Tatjana Keesen de Souza Lima**, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento desse trabalho.

**Aos funcionários da Universidade Federal da Paraíba**, que estiveram presentes durante todo o meu doutorado, em especial a Mônica sempre prestativa e a equipe de funcionários do biotério, principalmente seu Luiz, Adriano e dona Lourdes, companheiros na lida com os BALB/c.

**A Universidade Federal da Paraíba e ao CNPq e CAPES** pela estrutura física, recursos humanos e o estímulo à pesquisa que proporcionaram o desenvolvimento das minhas atividades.

***Obrigada!***

*“E tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo o  
coração, como para o Senhor e não para homens.”  
Colossenses 3:23*

FERREIRA, L.K.D.P. **ESTUDO DOS MECANISMOS IMUNOMODULADORES DO ALCALOIDE SINTÉTICO MHTP NA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICA COMBINADAS (CARAS) EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA**. 2020. 142fls. **Tese** (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – UFPB/CCS, João Pessoa.

## RESUMO

A Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) é uma doença inflamatória crônica do trato respiratório de indivíduos atópicos. Na CARAS predomina a resposta imune tipo 2. Na clínica as classes terapêuticas utilizadas promovem reações adversas, como glaucoma e sedação que comprometem a qualidade de vida dos indivíduos. Dessa forma, se faz necessário a busca por moléculas com potenciais terapêuticos para o tratamento da CARAS. Nesse contexto, o alcaloide sintético MHTP [2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-1-il) fenol] apresenta baixa toxicidade aguda pré-clínica ( $DL_{50} > 1.000$  mg/kg), sem genotoxicidade, atividade antiedematogênica e anti-inflamatória, em modelos de inflamação aguda dependente da modulação negativa da via de sinalização TLR4-p38MAPK/NF- $\kappa$ B(p65). Em modelo de inflamação pulmonar alérgica diminuiu os níveis de células TCD4<sup>+</sup>. O objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos imunomoduladores do tratamento com o MHTP, pelas vias intranasal (in) ou oral (vo), no modelo experimental de CARAS induzida por ovalbumina (OVA). Para tal, camundongos BALB/c fêmeas foram sensibilizados com OVA nos dias 0 e 7 e dos dias 21 a 37, durante três dias consecutivos por semana foram desafiados com OVA por instilação nasal. Do 38° ao 42° dia foram desafiados com aerossol de OVA. O tratamento ocorreu uma hora antes de cada desafio e no 43° dia do protocolo, foi realizada a coleta do material biológico. Os sinais clínicos foram quantificados após o último desafio semanal e após o último desafio por aerossol. A reatividade nasal induzida pela histamina foi realizada no 37° dia. O tratamento de animais saudáveis com MHTP (vias in ou vo) não alterou os parâmetros fisiológicos dos animais. Os animais com CARAS tratados com o alcaloide (in ou vo) apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) dos sinais clínicos (espirros e fricção nasal); da hiper-reatividade nasal à histamina; da migração de células totais e majoritariamente de eosinófilos nos fluidos nasal (NALF) e broncoalveolar (BALF); da inflamação e da hiperprodução de muco nas cavidades nasal e pulmonar; da hiper-reatividade brônquica e do remodelamento tecidual pulmonar; dos níveis séricos de IgE total e OVA-específica; dos níveis de citocinas, no BALF: IL-33, TSLP, IL-4, IL-13, IL-5, TGF- $\beta$  e IL-17. O MHTP aumentou os níveis de INF- $\gamma$  e consequentemente da razão IFN- $\gamma$ /IL-4. A frequência de ativação das MAPK p-ERK1/2 e p-p38 em granulócitos e linfócitos foram reduzidas pelo tratamento com o MHTP assim como o NF- $\kappa$ B(p65) em linfócitos. O MHTP por via oral aumentou os níveis de IL-10. Os resultados obtidos no presente estudo propõem que os mecanismos imunomoduladores do MHTP independente da via administração (in ou vo), estejam relacionados a modulação negativa das MAPK (ERK1/2 e p38) em granulócitos e linfócitos e do NF- $\kappa$ B(p65) em linfócitos o que levou a supressão do quadro patológico da CARAS. Em adição, a regulação do perfil T<sub>H</sub>2 pelo perfil T<sub>H</sub>1 foi observada em ambas as vias de administração do MHTP e pela via oral o alcaloide também promoveu uma regulação via aumento da IL-10 no BALF. Diante do exposto sugerimos que o MHTP é um candidato em potencial para se tornar um fármaco no sentido de ser inserido no arsenal terapêutico no tratamento da CARAS uma vez realizado os ensaios clínicos apropriados.

**Palavras chaves:** MHTP; Alcaloide sintético; Asma; Rinite; CARAS; Imunomodulação.

FERREIRA, L.K.D.P. **STUDY OF THE IMMUNOMODULATIVE MECHANISMS OF THE SYNTHETIC MHTP ALKALOID IN COMBINED EXPERIMENTAL ASTHMA SYNDROME AND ALLERGIC RHINITIS.** 2020. 142fls. **Thesis** (PhD in Natural and Bioactive Synthetic Products) - UFPB / CCS, João Pessoa.

## ABSTRACT

Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome (CARAS) is a chronic inflammatory disease of the respiratory tract of atopic individuals. In CARAS the type 2 immune response predominates. In the clinic, the therapeutic classes used promote adverse reactions, such as glaucoma and sedation, which compromise the quality of life of individuals. Thus, it is necessary to search for molecules with therapeutic potential for the treatment of CARAS. In this context, the synthetic alkaloid MHTP [2-methoxy-4- (7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol] has low preclinical acute toxicity ( $LD_{50} > 1,000$  mg/kg), without genotoxicity, antiedematogenic and anti-inflammatory activity, in models of acute inflammation dependent on the negative modulation of the TLR4-p38MAPK/NF- $\kappa$ B(p65) signaling pathway. In a model of allergic pulmonary inflammation, the levels of TCD4<sup>+</sup> cells decreased. The objective of this work was to investigate the immunomodulatory mechanisms of treatment with MHTP, by intranasal (in) or oral (vo) routes, in the experimental model of CARAS induced by ovalbumin (OVA). For this purpose, female BALB/c mice were sensitized with OVA on days 0 and 7 and from days 21 to 37, for three consecutive days a week they were challenged with OVA by nasal instillation. From the 38th to the 42nd day, they were challenged with an OVA aerosol. The treatment took place one hour before each challenge and on the 43rd day of the protocol, biological material was collected. Clinical signs were quantified after the last weekly challenge and after the last aerosol challenge. Nasal reactivity induced by histamine was performed on the 37th day. The treatment of healthy animals with MHTP (in or vo pathways) did not alter the animals' physiological parameters. Animals with CARAS treated with the alkaloid (in or vo) showed a reduction ( $p < 0.05$ ) of clinical signs (sneezing and nasal friction); in nasal hyper-reactivity to histamine; in the migration of total cells and mostly eosinophils in the nasal (NALF) and bronchoalveolar (BALF) fluids; in inflammation and in the overproduction of mucus in the nasal and pulmonary cavities; bronchial hyperreactivity and pulmonary tissue remodeling; serum levels of total and OVA-specific IgE; in cytokine levels, in BALF: IL-33, TSLP, IL-4, IL-13, IL-5, TGF- $\beta$  and IL-17. MHTP increased the levels of INF- $\gamma$  and consequently the INF- $\gamma$  / IL-4 ratio. The frequency of activation of MAPK p-ERK1/2 and p-p38 in granulocytes and lymphocytes was reduced by treatment with MHTP as well as NF- $\kappa$ B(p65) in lymphocytes. Oral MHTP increased levels of IL-10. The results obtained in the present study propose that the MHTP immunomodulatory mechanisms, regardless of the route of administration (in or vo), are related to the negative modulation of MAPK (ERK1/2 and p38) in granulocytes and lymphocytes and NF- $\kappa$ B(p65) in lymphocytes which led to the suppression of the pathological condition of CARAS. In addition, the regulation of the T<sub>H</sub>2 profile by the T<sub>H</sub>1 profile was observed in both routes of administration of MHTP and by the oral route the alkaloid also promoted regulation via increased IL-10 in the BALF. In view of the above, we suggest that MHTP is a potential candidate to become a drug in the sense of being inserted into the therapeutic arsenal in the treatment of CARAS once the appropriate clinical trials have been carried out.

**Keywords:** MHTP; Synthetic alkaloid; Asthma; Rhinitis; CARAS; Immunomodulation.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1. Fenótipos, endotipos e biomarcadores da Rinite e Asma.....                                                                                                          | 25  |
| Figura 2. Fases da Fisiopatologia da CARAS .....                                                                                                                              | 30  |
| Figura 3. Estrutura química do MHTP [2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-1-il) fenol] .....                                                                    | 43  |
| Figura 4. Síntese do MHTP. ....                                                                                                                                               | 47  |
| Figura 5. Esquema representativo do modelo experimental de CARAS. ....                                                                                                        | 48  |
| Figura 6. Populações de granulócitos e Linfócitos demarcadas para análise da ativação das MAP quinases (p-ERK1/2 e p-p38) e da porção p65 do Fator de Transcrição NF-κB. .... | 54  |
| Figura 7. Esquema representativo dos resultados sobre os mecanismos imunomoduladores do MHTP apresentados no presente trabalho. ....                                          | 116 |

## **LISTA DE TABELAS**

|                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1. Classes Terapêuticas utilizadas no controle das reações alérgicas na rinite e crise de asma.....</b> | <b>39</b> |
| <b>Tabela 2. Grupos experimentais no modelo da CARAS. ....</b>                                                    | <b>49</b> |

## **LISTA DE PAINEL**

|                                                                                                                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Painel 1. Efeito do MHTP sobre os aspectos histopatológicos das cavidades nasal e pulmonar, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Hematoxilina &amp; Eosina (HE) .....</b>   | <b>69</b> |
| <b>Painel 2. Efeito do MHTP sobre Hiperatividade Brônquica (AHR) e Remodelamento Pulmonar, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Tricomio de Masson (TM) .....</b>              | <b>73</b> |
| <b>Painel 3. Efeito do MHTP sobre a produção de muco pelas células caliciformes das vias aéreas, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Ácido Periódico – Schiff (PAS) .....</b> | <b>76</b> |

## LISTA DE GRÁFICOS

|                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gráfico 1. Efeito do MHTP sobre os Sinais clínicos Nasais (espirros e fricção nasal) após o último desafio por aerossol com ovalbumina no modelo experimental de CARAS .....                           | 57 |
| Gráfico 2. Efeito do MHTP sobre os sinais clínicos nasais (espirros e fricção nasal) durante os desafios intranasal com ovalbumina no modelo experimental de CARAS .....                               | 59 |
| Gráfico 3. Efeito do MHTP sobre a reatividade nasal induzida por histamina após o último desafio intranasal com ovalbumina no modelo experimental de CARAS .....                                       | 61 |
| Gráfico 4. Efeito do MHTP na migração de células totais, leucócitos diferenciais e porcentagem de eosinófilos no fluido do lavado nasal (NALF), no modelo experimental de CARAS.....                   | 63 |
| Gráfico 5. Efeito do MHTP na migração de células totais, leucócitos diferenciais e porcentagem de eosinófilos no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF), no modelo experimental de CARAS .....         | 66 |
| Gráfico 6. Efeito do MHTP sobre os aspectos histopatológicos das cavidades nasal e pulmonar, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Hematoxilina & Eosina (HE) .....                      | 70 |
| Gráfico 7. Efeito do MHTP sobre Hiperatividade Brônquica (AHR) e Remodelamento Pulmonar, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Tricomio de Masson (TM) .....                             | 74 |
| Gráfico 8. Efeito do MHTP sobre a produção de muco pelas células caliciformes das vias aéreas, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Ácido Periódico – Schiff (PAS) .....                | 77 |
| Gráfico 9. Efeito do MHTP sobre a produção de IgE total e OVA-específica, no modelo experimental de CARAS.....                                                                                         | 79 |
| Gráfico 10. Efeito do MHTP sobre a produção das citocinas IL-33 e TSLP (alarminas), no modelo experimental de CARAS .....                                                                              | 81 |
| Gráfico 11. Efeito do MHTP sobre a produção das citocinas IL-4, IL-13 e IL-5 (perfil T <sub>H</sub> 2), TGF- $\beta$ e IL-17 (perfil T <sub>H</sub> 17), no modelo experimental de CARAS.....          | 83 |
| Gráfico 12. Efeito do MHTP sobre a produção das citocinas IL-10 (perfil T <sub>reg</sub> ) e IFN- $\gamma$ (perfil T <sub>H</sub> 1) e razão IFN- $\gamma$ /IL-4, no modelo experimental de CARAS..... | 87 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                    |                                                                        |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| <b>CARAS</b>                       | Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas                         |
| <b>RA</b>                          | Rinite Alérgica                                                        |
| <b>T<sub>H</sub></b>               | Linfócito T <i>helper</i>                                              |
| <b>AAS</b>                         | Ácido acetilsalicílico                                                 |
| <b>IgE</b>                         | Imunoglobulina E                                                       |
| <b>SP</b>                          | Substância P                                                           |
| <b>NK</b>                          | Neurocininas                                                           |
| <b>IL</b>                          | Interleucinas                                                          |
| <b>FeNO</b>                        | Fração Exalada de Óxido Nítrico                                        |
| <b>T<sub>H</sub>2<sup>hi</sup></b> | Altos níveis de T <sub>H</sub> 2                                       |
| <b>T<sub>H</sub>2<sup>lo</sup></b> | Baixos níveis de T <sub>H</sub> 2                                      |
| <b>TSLP</b>                        | Linfopoetina de Estroma Tímico                                         |
| <b>ILC2</b>                        | Células Linfoides Inatas do Grupo 2                                    |
| <b>APC</b>                         | Células Apresentadoras de Antígeno                                     |
| <b>DC</b>                          | Células Dendríticas                                                    |
| <b>MHC</b>                         | Complexo Principal de Histocompatibilidade                             |
| <b>TCR</b>                         | Receptor de Células T                                                  |
| <b>GATA-3</b>                      | Fator de Transcrição de Ação “trans” Específico de Células T do Tipo 3 |
| <b>STAT</b>                        | Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição                          |
| <b>NF-κB</b>                       | Fator Nuclear κB                                                       |
| <b>MAPK</b>                        | Proteína Quinase Ativada por Mitógeno                                  |
| <b>FcεRI</b>                       | Receptor de IgE de Alta Afinidade                                      |
| <b>AAM</b>                         | Macrófagos Ativados pela Via Alternativa                               |
| <b>TGF-β</b>                       | Fator de Transformação do Crescimento β                                |
| <b>MEC</b>                         | Matriz Extracelular                                                    |
| <b>AHR</b>                         | Hiper-reatividade das Vias Aéreas                                      |

|                                |                                                                              |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <b>BHR</b>                     | Hiper-reatividade Brônquica                                                  |
| <b>ECP</b>                     | Proteína Catiônica Eosinofílica                                              |
| <b>MBP</b>                     | Proteína Básica Principal                                                    |
| <b>PGs</b>                     | Prostaglandinas                                                              |
| <b>CysLTs</b>                  | Cistenil-Leucotrienos                                                        |
| <b>T-bet</b>                   | Fator de Transcrição Box-T                                                   |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | Interferon- $\gamma$                                                         |
| <b>CD</b>                      | <i>Cluster of Differentiation</i> , molécula marcadora de superfície celular |
| <b>AMPC</b>                    | 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico                                           |
| <b>HPA</b>                     | Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal                                             |
| <b>DL 50</b>                   | Dose Letal mediana                                                           |
| <b>MHTP</b>                    | 2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetraidroisoquinolin-1-il) fenol                |
| <b>s.c.</b>                    | Via Subcutânea                                                               |
| <b>i.p.</b>                    | Via Intraperitoneal                                                          |
| <b>i.n.</b>                    | Via Intranasal                                                               |
| <b>i.t.</b>                    | Via Intratraqueal                                                            |
| <b>v.o.</b>                    | Via Oral                                                                     |
| <b>LPS</b>                     | Lipopolissacarídeo Bacteriano                                                |
| <b>NO</b>                      | Óxido Nítrico                                                                |
| <b>LPA</b>                     | Lesão Pulmonar Aguda                                                         |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$                                           |
| <b>iNOS</b>                    | Óxido Nítrico Sintase induzida                                               |
| <b>NGF</b>                     | Fator do Crescimento do Nervo                                                |
| <b>TLR</b>                     | Receptores do tipo <i>Toll like</i>                                          |
| <b>ICAM-1</b>                  | Molécula de Adesão Intercelular-1                                            |
| <b>VCAM-1</b>                  | Molécula de Adesão Celular Vascular-1                                        |
| <b>Ach</b>                     | Acetilcolina                                                                 |
| <b>SCF</b>                     | Fator de Crescimento de Células Tronco                                       |
| <b>NFAT</b>                    | Fator Nuclear de células T Ativadas                                          |

## SUMÁRIO

|                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                      | <b>21</b> |
| 1.1. CARAS (Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas)                               | 21        |
| 1.2. Definição e Caracterização da Rinite e Asma                                          | 21        |
| 1.3. Epidemiologia da Rinite e Asma                                                       | 22        |
| 1.4. Fenótipos, Endotipos e Biomarcadores de Rinite e Asma                                | 23        |
| 1.5. Fisiopatologia da CARAS                                                              | 26        |
| 1.5.1. Resposta Imune Tipo 2: Fase de sensibilização – 1º contato                         | 26        |
| 1.5.2. Resposta Imune Tipo 2: Fase de reação imediata – 2º contato                        | 27        |
| 1.5.3. Resposta Imune Tipo 2: Fase de reação tardia – manutenção do processo inflamatório | 28        |
| 1.6. Imunorregulação da CARAS                                                             | 31        |
| 1.7. Importância dos modelos experimentais na CARAS                                       | 32        |
| 1.7.1. Protocolos experimentais de Rinite e Asma Alérgicas                                | 33        |
| 1.8. Tratamento da CARAS                                                                  | 37        |
| 1.8.1. Medida Farmacológica                                                               | 37        |
| 1.9. Vias de administração                                                                | 40        |
| 1.10. Alcaloides                                                                          | 41        |
| 1.10.1. Alcaloides Tetrahydroisoquinolínicos                                              | 42        |
| 1.10.2. MHTP [2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-il) fenol] ...         | 42        |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                                       | <b>45</b> |
| 2.1. Geral                                                                                | 45        |
| 2.2. Específicos                                                                          | 45        |
| <b>3. METODOLOGIA</b>                                                                     | <b>46</b> |
| 3.1. Animais                                                                              | 46        |
| 3.2. Obtenção e preparo do MHTP                                                           | 46        |
| 3.3. Protocolo Experimental de CARAS                                                      | 47        |
| 3.4. Tratamentos                                                                          | 48        |
| 3.5. Sinais Clínicos                                                                      | 49        |
| 3.6. Reatividade nasal induzida pela histamina                                            | 49        |
| 3.7. Quantificação celular                                                                | 49        |
| 3.8. Histologia das cavidades nasal e pulmonar                                            | 50        |
| 3.9. Quantificação de IgE e Citocinas                                                     | 52        |

|                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.10. Diferenciação de granulócitos e linfócitos e marcação celular das MAP quinases fosforiladas (p-ERK1/2 e p-p38) e da porção p65 do fator de transcrição NF- $\kappa$ B em ambas as populações .....   | 52 |
| 3.11. Análise Estatística .....                                                                                                                                                                            | 55 |
| 4. RESULTADOS .....                                                                                                                                                                                        | 56 |
| 4.1. Efeito do MHTP sobre os sinais clínicos nasais (espirros e fricção nasal) após o último desafio por AEROSSOL com ovalbumina (OVA) no modelo experimental de CARAS .....                               | 56 |
| 4.2. Efeito do MHTP sobre os sinais clínicos nasais (espirros e fricção nasal) durante os desafios INTRANASAL com ovalbumina no modelo experimental de CARAS .....                                         | 58 |
| 4.3. Efeito do MHTP sobre a reatividade nasal induzida por histamina após o último desafio INTRANASAL com ovalbumina no modelo experimental de CARAS .....                                                 | 60 |
| 4.4. Efeito do MHTP na migração de células inflamatórias totais, leucócitos diferenciais e porcentagem de eosinófilos no Fluido do Lavado Nasal (NALF), no modelo experimental de CARAS .....              | 62 |
| 4.5. Efeito do MHTP na migração de células totais, leucócitos diferenciais e porcentagem de eosinófilos no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF), no modelo experimental de CARAS.....                    | 65 |
| 4.6. Efeito do MHTP sobre os aspectos histopatológicos nos tecidos nasal e pulmonar, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Hematoxilina & Eosina (HE) .....                                  | 68 |
| 4.7. Efeito do MHTP sobre a Hiperatividade Brônquica (AHR) e Remodelamento Pulmonar, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Tricomio de Masson (TM) .....                                     | 72 |
| 4.8. Efeito do MHTP sobre a produção de muco pelas células caliciformes presentes nas cavidades nasal e pulmonar, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Ácido Periódico – Schiff (PAS) ..... | 75 |
| 4.9. Efeito do MHTP sobre a produção de IgE total e OVA-específica, no modelo experimental de CARAS .....                                                                                                  | 78 |
| 4.10. Efeito do MHTP sobre a produção das citocinas IL-33 e TSLP (alarminas) no modelo experimental de CARAS .....                                                                                         | 80 |
| 4.11. Efeito do MHTP sobre a produção das citocinas IL-4, IL-13 e IL-5 (perfil T <sub>H</sub> 2), TGF- $\beta$ e IL-17 no modelo experimental de CARAS .....                                               | 82 |

|                                                                                                                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.12. Efeito do MHTP sobre a produção das citocinas regulatórias do perfil $T_H2$ , IL-10 (perfil $T_{reg}$ ) e IFN- $\gamma$ (perfil $T_H1$ ) e razão IFN- $\gamma$ /IL-4 no modelo experimental de CARAS ..... | 86  |
| 4.13. Efeito do MHTP na porcentagem de granulócitos e linfócitos presentes no BALF de animais com CARAS.....                                                                                                     | 89  |
| 4.14. Efeito do MHTP na ativação da p-ERK1/2 MAPK em granulócitos no BALF de animais com CARAS .....                                                                                                             | 91  |
| 4.15. Efeito do MHTP na ativação da p-p38 MAPK em granulócitos no BALF de animais com CARAS.....                                                                                                                 | 92  |
| 4.16. Efeito do MHTP na porção p65 do Fator de Transcrição NF- $\kappa$ B em granulócitos no BALF de animais com CARAS .....                                                                                     | 93  |
| 4.17. Efeito do MHTP na ativação da p-ERK 1/2 MAPK em linfócitos no BALF de animais com CARAS.....                                                                                                               | 94  |
| 4.18. Efeito do MHTP na ativação da p-p38 MAPK em linfócitos presentes no BALF de animais com CARAS .....                                                                                                        | 95  |
| 4.19. Efeito do MHTP na porção p65 do Fator de Transcrição NF- $\kappa$ B em linfócitos presentes no BALF de animais com CARAS .....                                                                             | 96  |
| 5. DISCUSSÃO .....                                                                                                                                                                                               | 97  |
| 6. CONCLUSÃO .....                                                                                                                                                                                               | 115 |
| 7. REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                                                                             | 117 |
| ANEXO 1: CERTIFICADO CEUA.....                                                                                                                                                                                   | 133 |
| ANEXO 2: PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO (2016-2020) .                                                                                                                                                   | 134 |

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. CARAS (Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas)**

A síndrome da asma e rinite alérgicas combinadas (CARAS – *Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome*) se caracteriza por ser uma doença única do sistema respiratório. Estudos sobre a fisiopatologia da rinite e asma alérgicas vêm comprovando uma íntima ligação na gênese de ambas as doenças. Essas doenças são desencadeadas pelos mesmos agentes etiológicos, apresentam o mesmo perfil de células mediando os processos inflamatórios, estão relacionadas ao sistema respiratório e compartilham o mesmo princípio terapêutico. Os fármacos comumente utilizados tais como anti-histamínicos e corticoides, entre outros, ocasionam efeitos adversos importantes por serem utilizados cronicamente. Portanto é de extrema importância pesquisas experimentais que, ao mimetizar em animais a CARAS, colaborem no entendimento da patogênese e tragam ao mercado farmacêutico possibilidades de novas moléculas candidatas a serem utilizadas como fármacos para o tratamento das duas doenças contribuindo portanto para o arsenal terapêutico no tratamento dessa síndrome alérgica (BOUSQUET et al., 2008; IBIAPINA et al., 2006; LI et al., 2015a, 2016a; LICARI et al., 2017).

### **1.2. Definição e Caracterização da Rinite e Asma**

A rinite é um termo geral que descreve o aparecimento dos sintomas nasais: congestão nasal, rinorreia, espirros e prurido (coceira/fricção nasal), resultantes de um processo inflamatório e/ou disfunção da mucosa nasal. Em adição, provoca deficiência no sono, desvio comportamental e psicológico, chegando a ocasionar comprometimento da qualidade de vida dos pacientes, sendo considerada um fator de risco para segurança no trânsito (LEDFORD, 2003; MELTZER et al., 2012; VUURMAN et al., 2014). A rinite é uma das doenças mais comuns em todo o mundo e apresenta significativa morbidade, elevados custos financeiros (ZUBERBIER et al., 2014) e é considerada um fator de risco para o desencadeamento da asma e também está associada a outras doenças crônicas respiratórias, como a rinossinusite (HENS et al., 2007; WHEATLEY; TOGIAS, 2015).

A asma é definida como uma doença heterogênea, desenvolvida a partir de diversos fatores intrínsecos e desencadeada por fatores extrínsecos tendo como principal característica um processo inflamatório crônico pulmonar associado a uma hiper-reatividade das vias aéreas a estímulos diretos e indiretos (GINA, 2019; HOLGATE et al., 2015). Apresenta os sintomas respiratórios: sibilância, falta de ar, tosse e sensação de aperto no peito com limitação variável do fluxo de ar expirado. Esses sintomas podem variar ao longo do tempo e de intensidade podendo piorar e levar à insuficiência respiratória durante vários períodos. Os sintomas asmáticos são desencadeados por diversos fatores, tais como, exercício, exposição a alérgeno ou a substâncias irritantes, mudança de clima e infecções respiratórias virais (BOUSQUET et al., 2015; FAHY, 2015; LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019; VAN HELDEN; LAMBRECHT, 2013).

### **1.3. Epidemiologia da Rinite e Asma**

Embora as doenças alérgicas que afetam o trato respiratório estejam presentes na população mundial, estudos amplos de epidemiologia envolvendo os dados nacionais são escassos e sua atualização não ocorre constantemente, tendo ainda algumas regiões brasileiras sem dados concretos da distribuição das doenças alérgicas das vias aéreas, como por exemplo a rinite, rinosinusite, sinusite e asma na população (SAKANO et al., 2017). Atualmente, cerca de 10 a 30 % da população mundial apresenta um quadro de rinite alérgica (RA) (TOHIDINIK; MALLAH; TAKKOUICHE, 2019). No Brasil, esta doença atinge cerca de 29,6% entre adolescentes e 25,7% entre crianças na fase escolar (ASBAI, 2018; SAKANO et al., 2017). A RA afeta a qualidade de vida dos indivíduos de forma negativa, interferindo na vida social, no desempenho escolar e intelectual, como também na produtividade no trabalho (GÓMEZ et al., 2015).

A asma acomete mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo sua predominância crescente e calculada em um aumento de mais de 100 milhões de pessoas em 2025 (TOHIDINIK; MALLAH; TAKKOUICHE, 2019). O Brasil vem sendo classificado como o 8º país em prevalência desta doença. Em 2015, foram notificadas 383.000 mortes por asma, sendo as crises asmáticas a quarta causa de hospitalizações pelo Sistema Único de Saúde e a causa da morte de três pessoas por dia no país e, por ano no mundo, são cerca de 250 mil óbitos em decorrência dessa doença (CARDOSO et al., 2017; WHO, 2018).

A asma está presente em todos os países, independente do seu grau de desenvolvimento, é considerada uma das principais enfermidades não transmissíveis, e está entre as mais prevalentes no mundo. A asma é a doença crônica mais frequente em crianças (OMS, 2017). No Brasil, 19% dos adolescentes e 24% das crianças são asmáticos (ASBAI, 2018). A mortalidade da asma é preocupante, sendo essa responsável por 1 em cada 250 mortes no mundo. Em termos mundiais, os custos financeiros com a asma superam aos da tuberculose e HIV/AIDS somados (WHO, 2018).

A comorbidade ou multimorbidade entre a asma e RA é íntima e confere o padrão de uma única doença das vias aéreas, resultado de uma “marcha atópica” portanto sendo a RA e a asma manifestações clínicas de apenas uma doença. (BOUSQUET et al., 2008, 2019; BROŽEK et al., 2017; HENS et al., 2007). A RA não tratada ou incorretamente manejada, eleva em até três vezes o risco de exacerbação asmática, além da hiper-reatividade brônquica ser frequente em pacientes com rinite (BROŽEK et al., 2017). Ainda, é comum observar um quadro inflamatório nasal em asmáticos sem sintomas de rinite e inflamação brônquica em indivíduos com rinite sem sintomas de asma. Como também, a inflamação brônquica por provocação nasal com alérgenos e inflamação nasal por provocação brônquica (BOUSQUET et al., 2008, 2019; BROŽEK et al., 2017; IBIAPINA et al., 2006).

#### **1.4. Fenótipos, Endotipos e Biomarcadores de Rinite e Asma**

A rinite e a asma são classificadas como doenças heterogêneas, resultantes de diversas etiologias. Nesse contexto, a classificação mais aceita é a fenotípica, em que se padroniza um conjunto de respostas clínicas, padrão temporal, gravidade, duração, controle, resposta ao tratamento e presença de comorbidades (MURARO et al., 2016).

Atualmente, a rinite é dividida em quatro grandes fenótipos: rinite alérgica (RA), em resposta a aeroalérgenos induzida em indivíduos sensibilizados; rinite infecciosa, em resposta a microrganismos presentes na cavidade nasal; rinite não infecciosa e não alérgica, em resposta a irritantes, medicamentos, desequilíbrio hormonal e disfunção neuronal; e rinite mista, apresentando mais de dois fenótipos concomitante (HELLINGS et al., 2017; KALINER, 2009; ROBERTS et al., 2013; TRAN; VICKERY; BLAISS, 2011).

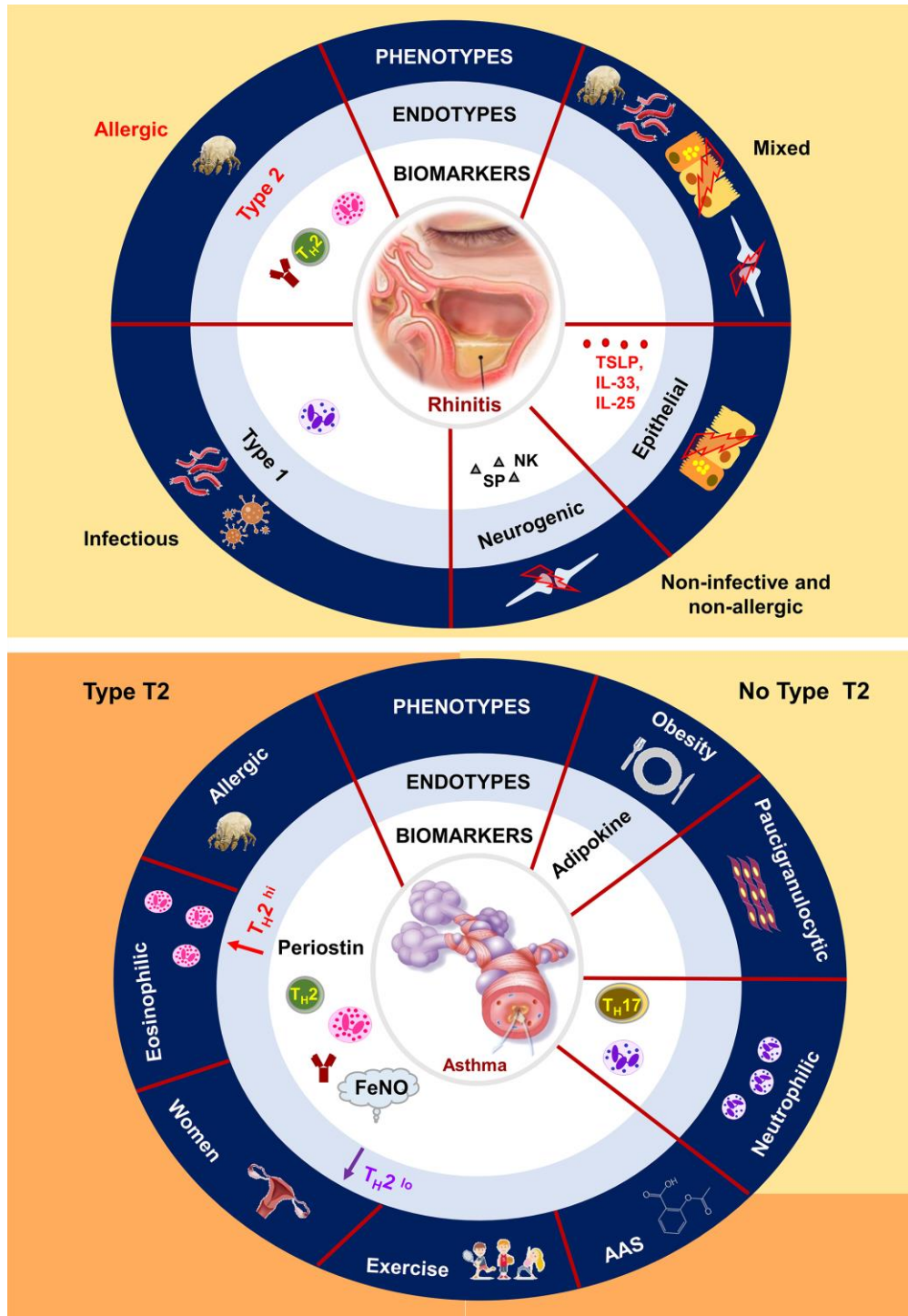
Ainda não se tem um consenso comum sobre a classificação fenotípica da asma, no entanto, a mais aceita, atualmente, baseia-se na fase da vida (infância ou fase adulta) em que os sintomas são apresentados. Dois grandes fenótipos são observados: asma tipo T2, sendo prevalente a resposta  $T_H2$  e de início precoce, na infância, e asma não tipo T2, com mínima participação  $T_H2$  e de início tardio, na fase adulta. Dentro desses dois grandes fenótipos, são distinguidos subfenótipos. Na asma tipo T2, os subfenótipos de início precoce são asma alérgica e asma induzida por exercício; e de início tardio são a asma eosinofílica, asma induzida por ácido acetilsalicílico (AAS) e a asma com início mais tardio em mulheres, relacionada a menopausa, em que as alterações hormonais são expressivas. Na asma não tipo T2 destaca-se os subfenótipos: asma associada a obesidade, asma neutrofílica associada ao tabagismo e asma paucigranulocítica mediada pelo músculo liso (FAHY, 2015; GINA, 2019; HOLGATE et al., 2015).

Os endotipos e biomarcadores estão associados a classificação fenotípica, e definem alvos moleculares (fisiopatologia) na gênese da doença, possibilitando um tratamento direcionado e mais preciso para o paciente (HELLINGS et al., 2017; MURARO et al., 2016).

A rinite é dividida em quatro endotipos: resposta imune Tipo 2, tendo como biomarcadores citocinas do perfil  $T_H2$  (IL-4, IL-5 e IL-13), eosinófilos e IgE alérgeno específica; resposta imune Tipo 1, tendo como biomarcador principal os neutrófilos; rinite neurogênica, tendo as substância P (SP) e neurocininas (NK) como biomarcadores e o endotipo de disfunção epitelial, com as alarminas (IL-25, IL-33 e TSLP-linfopoetina do estroma tímico) produzidas pelo epitélio lesionado como biomarcadores (MURARO et al., 2016).

Na asma, o único endotipo estabelecido é o  $T_H2$  com as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 predominantes. Esse está presente de forma exacerbada ( $T_H2^{hi}$ ) nos fenótipos tipo T2 e ausente ou pouco observado ( $T_H2^{lo}$ ) nos fenótipos não tipo T2 (BOUSQUET et al., 2015; FAHY, 2015; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015; LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019; WYNN, 2015). Na figura 1 está representado esquematicamente os fenótipos, endotipos e biomarcadores da rinite e asma.

Figura 1. Fenótipos, endotipos e biomarcadores da Rinite e Asma



Fenótipos da Rinite: Alérgica (Alérgica), Infeciosa (Infeciosa), Não infecciosa e não alérgica (Não infecciosa e não alérgica) e Mixed (Mista). Endotipos da Rinite: Tipo 2, Tipo 1, Neurogênica e Epithelial. Biomarcadores da Rinite: Tipo 2 (citocinas T<sub>H2</sub>, eosinófilos, IgE), Tipo 1 (neutrófilos), Neurogênica (Neurogênica) (SP e NK) e Epithelial (Epithelial) (TSLP, IL-33, IL-25). Fenótipos da Asma: Tipo T2 (Alérgica; Eosinophilic-Eosinofílica; Women-Mulher, hormonal; Exercise-Exercício físico e AAS) e Não Tipo T2 (Obesity-Obesidade, Paucigranulocytic-Paucigranulocítica e Neutrophilic-Neutrofílica). Endotipos da Asma: T<sub>H2</sub><sup>hi</sup> e T<sub>H2</sub><sup>lo</sup>. Biomarcadores da Asma: T<sub>H2</sub><sup>hi</sup> e T<sub>H2</sub><sup>lo</sup> (citocinas T<sub>H2</sub>, eosinófilos, IgE, periostina e FeNO), Obesidade (adipokines-adipocinas) e Neutrofílica (neutrófilos e citocinas T<sub>H17</sub>). IgE (Imunoglobulina E); SP (Substância P); NK (Neurocinica); TSLP (Linfopoetina do estroma tímico); IL (Interleucina); T<sub>H</sub> (Linfócito T helper); AAS (Ácido Acetilsalicílico); FeNO (Concentração fracionada de óxido nítrico exalado). Phenotypes (fenótipos); Endotypes (endotipos); Biomarkers (biomarcadores); Rhinitis (rinite); Asthma (asma); Type (tipo); Fonte: (PAIVA FERREIRA et al., 2019).

### **1.5. Fisiopatologia da CARAS**

A CARAS é caracterizada por apresentar uma resposta predominante  $T_H2$ , onde sua fisiopatologia está diretamente relacionada a indivíduos atópicos, os quais são geneticamente predisponentes a desencadear um processo de hipersensibilidade imediata ou tipo I ( $T_H2$ ). O indivíduo alérgico ao entrar em contato com aeroalérgenos (elementos proteicos solúveis de baixo peso molecular) presentes em ácaros da poeira; nas asas das baratas; em fungos; em pelos, saliva e urina de animais domésticos; restos de insetos e alimentos (RUBINI et al., 2017) que penetram o epitélio respiratório promovem um desequilíbrio entre imunidade inata e adaptativa desencadeando a CARAS (EIFAN; DURHAM, 2016). A CARAS têm uma fisiopatologia complexa e os processos intracelulares que envolvem produção de mediadores inflamatórios são orquestrados pelas citocinas clássicas do perfil  $T_H2$ , o qual conduz a resposta imune tipo 2, mantenedora da doença única das vias aéreas.

#### **1.5.1. Resposta Imune Tipo 2: Fase de sensibilização – 1º contato**

No primeiro contato do alérgeno com o indivíduo atópico, esse irá penetrar no epitélio respiratório e assim ativar células epiteliais, promovendo a secreção das citocinas chamadas de alarminas: Linfopoetina do Estroma Tímico (TSLP), IL-33 e IL-25 (EIFAN et al., 2012). As alarminas atuam em células situadas intra-epitélio ou abaixo do epitélio respiratório, dentre elas, as células linfoides inatas do grupo 2 (ILC2), ativando-as e produzindo citocinas clássicas da resposta tipo 2 (IL-13 e IL-5). As alarminas também atuam nas células apresentadoras de antígenos (APCs), em especial nas células dendríticas (CDs), as quais participam do processo de polarização do perfil  $T_H2$  (EIFAN; DURHAM, 2016; HAENUKI et al., 2012; LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019; LICONA-LIMÓN et al., 2013; MELUM et al., 2014; NASR et al., 2017).

As CDs capturam e englobam o alérgeno e, ativadas pelas alarminas, dirigem para os linfonodos de drenagem e apresentam os peptídeos alergênicos, via molécula do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) classe 2, á células  $TCD4^+$  *naive* ou virgem via seus receptores (TCR). Na presença de IL-4, ocorre a polarização das  $TCD4^+$  *naive* ( $T_H0$ ) para a subpopulação  $T_H2$ , com ativação dos fatores de transcrição GATA-3 (fator de transcrição de ação trans específicos de

células T do tipo 3) e STAT6 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 6). Os linfócitos T<sub>H</sub>2 produzem então as citocinas clássicas (IL-4, IL-13 e IL-5), a partir da ativação de MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) como a p38 e a ERK1/2 e de fatores transcricionais como o NF-κB que estão diretamente associado ao GATA-3 (GHOSH; MAY; KOPP, 1998; HOLGATE et al., 2015; KHORASANIZADEH et al., 2017; SCHULIGA; MICHAEL, 2015; TULLY et al., 2013).

A IL-4 e IL-13, por compartilharem receptores celulares, ativam os linfócitos B, que se diferenciam em plasmócitos (célula B ativada e produtora de anticorpos), produtores de imunoglobulinas E (IgE)-alérgeno específica. A IgE-alérgeno específica se ligará aos receptores de alta afinidade I (FcεRI) presentes na membrana de mastócitos teciduais e basófilos e eosinófilos circulantes. Esse processo é denominado de sensibilização alérgica (GOULD; SUTTON, 2008; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015; WYNN, 2015). Na figura 2a está representada a fase de sensibilização da CARAS.

### **1.5.2. Resposta Imune Tipo 2: Fase de reação imediata – 2º contato**

Em contato(s) posterior(es) do indivíduo sensibilizado com o alérgeno, esse se ligará diretamente ao complexo IgE–FcεRI acoplados a membrana de mastócitos teciduais e basófilos/eosinófilos circulantes e via ligação cruzada ocasionará ativação celular com liberação dos grânulos contendo mediadores pré estocados, como a histamina, no processo denominado degranulação celular, e, formação de outros mediadores como prostaglandinas e leucotrienos (BOULET, 2018; EIFAN; DURHAM, 2016). Os mastócitos residem próximo a superfície da mucosa e de vasos sanguíneos, se maturam pela ação do fator de células tronco (SCF) e da IL-3 (GURISH; AUSTEN, 2012) e uma vez ativado libera os mediadores inflamatórios bem como os basófilos circulantes que amplificam a resposta alérgica por liberar na corrente sanguínea, principalmente histamina, além de produzirem grandes quantidades de IL-4 (YOSHIMOTO et al., 2009).

A histamina, por ser um dos primeiros mediadores liberados no processo de ligação cruzada entre o alérgeno a IgE-alérgeno e receptor na célula, desempenha um papel central na chamada reação alérgica na CARAS pois promove a vasodilatação local, o aumento da permeabilidade vascular, proporcionando a formação do edema, a migração de células inflamatórias para as vias aéreas e a broncoconstrição. Nas vias aéreas superiores, a histamina exerce um papel

fundamental na atuação sobre as terminações nervosas sensoriais, na estimulação reflexa parassimpática das secreções glandulares, na vasodilatação e no aumento da permeabilidade capilar, promovendo os sintomas da reação imediata da fisiopatologia da RA (prurido nasal, espirros, rinorreia) (EIFAN; DURHAM, 2016; SIMONS; SIMONS, 2011; WHITE, 1990; XU; ZHANG; WANG, 2014). Na figura 2b está representada a fase de reação imediata da CARAS.

### **1.5.3. Resposta Imune Tipo 2: Fase de reação tardia – manutenção do processo inflamatório**

A manutenção do processo inflamatório  $T_H2$  resulta no processo inflamatório crônico e perda da função tecidual na CARAS. Esses processos são mediados por uma rede intensa de células e mediadores como as citocinas e quimiocinas, onde cada vez mais a interação entre eles é estudada no contexto das doenças alérgicas do trato respiratório. Por exemplo, a IL-4 apresenta um papel essencial na polarização do perfil  $T_H2$ , atuando como *feedback* positivo na manutenção da resposta tipo 2 (BOULET, 2018; GOUR; WILLS-KARP, 2015; WYNN, 2015).

O compartilhamento de receptores celulares indica que a IL-4 e IL-13, possuem papel fundamental na amplificação do processo inflamatório tecidual na CARAS, ativando os macrófagos tipo 2 (M2) ou ativados pela via alternativa (AAM). Os M2 produzem o TGF- $\beta$  (fator de transformação do crescimento  $\beta$ ) que, por sua vez, ativa os fibroblastos a produzirem fibras colágenas, as quais se depositam nas vias áreas, levando a um quadro de fibrose tecidual e remodelamento tecidual, pois a deposição de colágeno acarreta no espessamento da matriz extracelular (MEC) (BAGNASCO et al., 2016; GOUR; WILLS-KARP, 2015; HOLGATE et al., 2015).

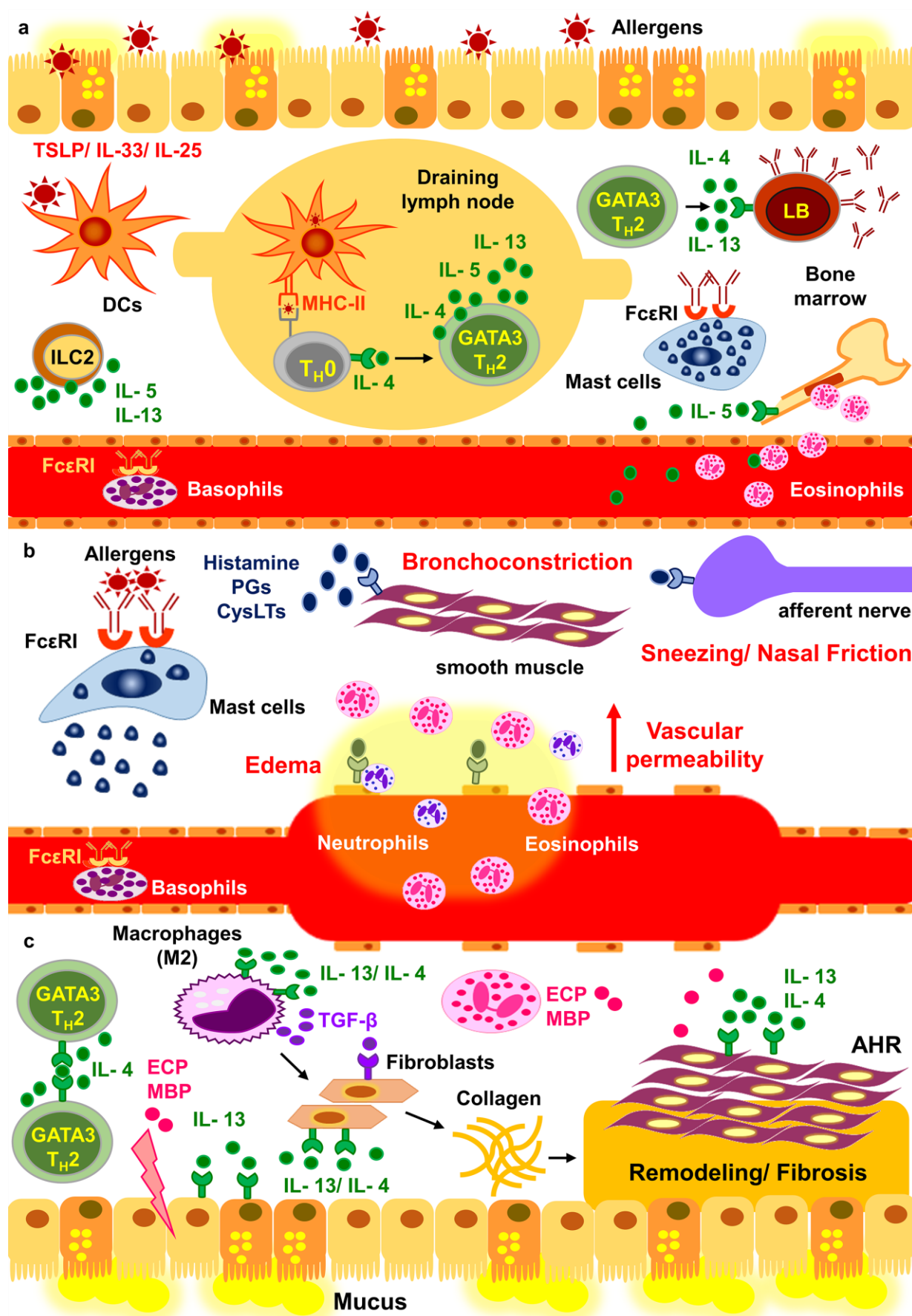
A IL-4 e a IL-13 também ativam diretamente os fibroblastos promovendo uma hiperprodução de colágeno nas vias áreas. Nas células musculares lisas, essas citocinas participam ativamente no processo de hipertrofia e/ou hiperplasia muscular, levando a um quadro de hiper-reatividade das vias áreas (AHR) ou hiper-reatividade brônquica (BHR) (BOULET, 2018; GOUR; WILLS-KARP, 2015). A IL-13 promove ainda a hipersecreção de mucinas, e, conseqüentemente, muco pelas células caliciformes das vias áreas. Também está envolvida no processo de hiperplasia e/ou hipertrofia das células caliciformes e da metaplasia de células ciliadas epiteliais (Clara), se diferenciando em células produtoras de muco (BARLOW et al., 2012; GOUR; WILLS-KARP, 2015).

A IL-5 é uma citocina clássica do perfil T<sub>H</sub>2 que está diretamente relacionada ao processo de produção, maturação e migração eosinofílica na medula óssea para as vias aéreas (HOLGATE et al., 2015; POSSA et al., 2013). O recrutamento de eosinófilos decorre da atuação de quimiocinas, como eotaxina 1, 2 e 3 (CCL11, CCL24 e CCL26, respectivamente) e da própria IL-5. O acúmulo de eosinófilos ativados nas vias aéreas gera a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e enzimas citolíticas, incluindo a proteína catiônica eosinofílica (ECP) e proteína básica principal (MBP), que provocam ruptura da integridade do epitélio causando diretamente a hiper-reatividade das vias aéreas (BARNES, 2017; GEORGE; BRIGHTLING, 2016; YOUSEFI; SIMON; SIMON, 2012).

As proteínas derivadas de eosinófilos participam da inflamação persistente das vias aéreas, e têm sido associadas a exacerbações e declínio da função pulmonar (GEORGE; BRIGHTLING, 2016; GREEN et al., 2002; JATAKANON A, LIM S, 2000; SIVA et al., 2007). Os eosinófilos também contribuem para o remodelamento das vias aéreas em consequência do aumento da deposição da matriz extracelular, do aumento das células mesenquimais subepiteliais e, principalmente, do aumento da massa muscular lisa da via aérea, que é o principal determinante da obstrução do fluxo aéreo (FLOOD-PAGE et al., 2003; KAY, 2015; KAY; PHIPPS; ROBINSON, 2004).

O TGF- $\beta$  derivado de eosinófilos ativa a liberação de fibroblastos e proteínas da matriz, provocando o espessamento da membrana basal reticular e associando à inflamação eosinofílica na asma (BRIGHTLING et al., 2003; ELTBOLI et al., 2015; SIDDIQUI et al., 2008). Os eosinófilos ainda, apresentam a capacidade de apresentar os alérgenos aos linfócitos T (BARNES, 2008; VAN RIJT et al., 2003) e os que se infiltram nas mucosas das vias aéreas têm a capacidade de fixar IgEs nas suas membranas e respondem ao contato com o alérgeno liberando mediadores inflamatórios que atuam na manutenção da resposta imune tipo 2 característica da CARAS (BOULET, 2018; FAJT; WENZEL, 2015; SHAKOORY et al., 2004). Na figura 2c está representada a fase de reação tardia da CARAS.

Figura 2. Fases da Fisiopatologia da CARAS



Fases da fisiopatologia do CARAS. **a) Primeira fase da reação alérgica (fase de sensibilização).** Os alérgenos estimulam as células epiteliais a liberar as alarminas como TSLP, IL-33 e IL-25, que estimulam as ILCs 2 a produzir IL-13 e IL-5. As alarminas estimulam as APCs (CDs) a migrarem para o linfonodo de drenagem e estas ativam  $T_H0$  via MHC-II para polarização do perfil  $T_H2$  com a produção de IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-5 é um importante indutor de eosinofilia, atuando na medula óssea e provocando a produção, maturação e migração de eosinófilos para o local da inflamação. IL-4 e IL-13 estimulam a produção de IgE pelas células B que se ligam aos receptores FcεRI na membrana dos mastócitos e basófilos e eosinófilos circulantes que conferem o primeiro estágio da sensibilização a alérgenos. **b) Segunda fase da reação alérgica (fase de desafio).** A reexposição de alérgenos resulta em ligação cruzada do alérgeno-IgE-célula em mastócitos que ativa o processo de degranulação com a liberação de mediadores pré-estocados como aminas vasoativas - histamina e mediadores neoformados como prostaglandinas (PGs) e cistenil leucotrienos (CysLTs). Esses mediadores serão responsáveis pela reação de fase imediata, atuando nos nervos aferentes, causando os sinais clínicos de espirros e fricção nasal (rinite), nas células endoteliais promovem o aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de líquidos para os tecidos e formação de edema e no músculo liso brônquico promovem a broncoconstrição (asma). **c) Terceira fase tardia da reação alérgica (Manutenção do perfil  $T_H2$ ).** A polarização do perfil de  $T_H2$  é mantida pela produção constante de IL-4 e IL-13. Essas citocinas atuam nas células caliciformes, promovendo a hiperprodução de muco; nas células musculares lisas hiperplasia e/ou hipertrofia e hiperresponsividade das vias aéreas (AHR). Além disso, eles ativam macrófagos (M2), que produzem o TGF-β associado à hiperprodução de fibras de colágeno pelos fibroblastos promovendo remodelamento tecidual e fibrose. Os eosinófilos são as células efetoras da inflamação crônica liberando mediadores como a proteína catiônica eosinofílica (ECP) e a proteína básica principal (MBP), que atuam diretamente na destruição epitelial, remodelamento tecidual e AHR. TSLP (Linfopoetina do estroma tímico); IL (Interleucina); DCs (células dendríticas);  $T_H$  (Linfócito T helper); ILC2 (célula linfóide inata de classe 2); Draining lymph node (linfonodo de drenagem); MHC-II (complexo principal de histocompatibilidade de classe 2); GATA-3 (fator de transcrição de ação "trans" específico de células T do tipo 3); LB (linfócito B); FcεRI (receptor de IgE de alta afinidade); Mast cells (mastócitos); Bone marrow (medula óssea); Basophils (basófilos); Eosinophils (eosinófilos); Allergens (alérgenos); Histamine (histamina); Bronchoconstriction (broncoconstrição); Smooth muscle (músculo liso); Afferent nerve (nervo aferente); Sneezing (espirros); Nasal friction (fricção nasal); Vascular permeability (permeabilidade vascular); Neutrophils (neutrófilos); Macrophage (macrófagos); Fibroblasts (fibroblastos); Collagen (colágeno); Mucus (muco); Remodeling/ Fibrosis (remodelamento/ fibrose); TGF-β (fator de crescimento transformador β); AHR (hiper-reatividade das vias aéreas).  
Fonte: (PAIVA FERREIRA et al., 2019).

## **1.6. Imunorregulação da CARAS**

Os mecanismos responsáveis por regular as respostas imunológicas no contexto da patogênese da CARAS envolvem o papel das células T regulatórias -  $T_{reg}$  (produtoras de IL-10) com efeito supressor sobre outras células  $TCD4^+$ . Essas células têm importante papel na regulação da função das células  $T_H2$  na asma e rinite alérgicas (BARNES, 2008; FAHY, 2015; UMETSU; DEKRUYFF, 2006). As  $T_{regs}$  atuam por meio do contato celular e secretam citocinas por quatro principais mecanismos supressores acionados: a) citocinas supressoras (IL-10, TGF-β e IL-35); b) inativação metabólica (CD25, AMPc, receptor de adenosina 2, receptor de histamina 2, CD39 e CD73); c) supressão da ativação de DC (CTLA-4, PD-1) e d) citólise (granzimas A e B) (BARNES, 2008; FAHY, 2015; UMETSU; DEKRUYFF, 2006).

Em estudos de transferências de  $T_{regs}$  em camundongos, demonstrou-se que essas células são capazes de suprimir os processos patológicos de asma

experimental pela produção e ação de IL-10 e TGF- $\beta$ , citocinas capazes de suprimir ativação das células dendríticas pulmonares (DC) e, pela interação direta com as células endoteliais, impedindo a angiogênese (PALOMARES et al., 2017a). As T<sub>regs</sub> inibem diretamente a degranulação de mastócitos pela interação OX40-OX40L, por diminuição da expressão de Fc $\epsilon$ RI e redução de IgE ancorada em suas membranas (PALOMARES et al., 2017a). Além disso, as T<sub>regs</sub> induzem a produção de IgG4 na célula B em vez da produção de IgE (PALOMARES et al., 2017a).

As células TCD8<sup>+</sup> também desempenham papel imunorregulador no processo inflamatório das vias aéreas na CARAS devido a inibição do processo de sensibilização do organismo ao alérgenos, atenuando a resposta T<sub>H2</sub> via inibição da produção de IgE, produzindo a citocina IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ), a qual está envolvida na alteração da capacidade das células dendríticas, durante a apresentação antigênica, polarizar os linfócitos TCD4<sup>+</sup> para o fenótipo T<sub>H1</sub> (EIFAN et al., 2012; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015; TANG et al., 2012). A depleção dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> está envolvida com o aumento nos níveis séricos de IgE alérgeno-específica, remodelamento e hiper-reatividade das vias aéreas (BOULET, 2018; STOCK et al., 2004).

Outra população de célula T capaz de imunomodular a resposta imune tipo 2 (T<sub>H2</sub>) na CARAS é o perfil de resposta imune T<sub>H1</sub> com a produção principalmente de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\beta$ . O IFN- $\gamma$  antagoniza a formação do fator de transcrição GATA 3 responsável pela geração das células T<sub>H2</sub>. Estudos têm demonstrado que o processo inflamatório na asma pode ser suprimido pela transferência de células T<sub>H1</sub> ou mesmo pela administração de IL-12, citocina responsável pela ativação do fator de transcrição T-bet (fator de transcrição box-T) que induz a produção das citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\beta$ ) detectadas no perfil de resposta T<sub>H1</sub> (FAHY, 2015; GAVETT et al., 1995; LAMBRECHT; HAMMAD, 2015).

### **1.7. Importância dos modelos experimentais na CARAS**

Os modelos experimentais de doenças são necessários para o melhor entendimento e elucidação dos mecanismos fisiopatológicos das doenças e, consequente, avaliação da segurança e eficácia de novas terapias, antes dessas serem introduzidas nos ensaios clínicos (KUMAR et al., 2002). Porém, requisitos para o uso de animais em experimentação foram publicados pelos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) – (Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório – NIH, publicação 85-23, que já está na sua 8ª edição, lançada em 2011), ressaltando

o cumprimento de preceitos éticos para a aceitação da utilização de animais experimentais.

Uma limitação dos modelos animais é não mimetizar a somação das características fenotípicas e endotípicas da asma e da rinite. Porém, os modelos animais têm sido fundamentais para ampliação e melhor elucidação do conhecimento dos parâmetros inflamatórios, estruturais e fisiológicos presentes nos quadros das doenças do trato respiratório, observados em modelos experimentais separados (CHAPMAN et al., 2014; CHEN et al., 2017b; KIM; HONG; LEE, 2015; KUYAMA et al., 2010; REN et al., 2017; SAGAR; AKBARSHAHI; ULLER, 2015; SUN et al., 2016). Já foi descrito distintos fenótipos destas doenças (AGACHE; AKDIS, 2016; CASALE, 2017), mas para a identificação é necessária a elucidação de biomarcadores, que as diferenciam (GUIBAS et al., 2017).

Os modelos de animais utilizados para investigação das doenças respiratórias alérgicas induzidas por Ovalbumina (OVA) e aeroalérgenos têm sido amplamente utilizados para elucidar mecanismos imunológicos e não imunológicos envolvidos na patogênese da asma e da rinite. Além disso, eles são úteis para identificar e investigar novos alvos moleculares para controlar a inflamação alérgica (AUN et al., 2017; NIALS; UDDIN, 2008; VAN DER WOUPE et al., 2010).

Na literatura, até 2019, apenas sete trabalhos utilizaram o modelo experimental da CARAS (LI et al., 2015a, 2016a, 2018; TAKAHASHI et al., 2015; TANG et al., 2019; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Porém, a utilização desse modelo experimental representa um cenário favorável para entender a fisiopatologia dessa síndrome, além de ser fundamental para os testes de potenciais terapias medicamentosas, uma vez que resultados positivos nos animais, abre caminho para sua transposição em estudos clínicos (SAGAR; AKBARSHAHI; ULLER, 2015; SZELENYI, 2000).

### **1.7.1. Protocolos experimentais de Rinite e Asma Alérgicas**

Os protocolos experimentais utilizando modelos animais de doenças respiratórias alérgicas têm sido amplamente utilizados com o objetivo de observar os quadros de asma e rinite humanas. Não obstante, os camundongos, de maneira semelhante a maioria dos animais, não desenvolvem naturalmente uma doença inflamatória crônica alérgica, de forma que os modelos animais requerem protocolos

que apresentem sensibilização a um alérgeno e posterior reexposição ao mesmo para induzir uma resposta inflamatória alérgica (CHAPMAN et al., 2014).

Na literatura, trabalhos experimentais demonstram que tanto a asma como a rinite são doenças crônicas resultantes da exposição intermitente ou contínua a aeroalérgenos responsáveis por desenvolver o quadro inflamatório e, consequente, resposta imune exacerbada nas vias aéreas. Essa exposição se dá, principalmente pela via aérea, por inalação desses alérgenos, no momento da respiração. Diante disso, a forma de instilação nasal nos animais, nos protocolos experimentais, é a análoga ao que acontece na asma e rinite humanas (JOHNSON et al., 2004; KRIEGER et al., 2013; PETERS et al., 2016).

Para mimetização da asma e da rinite humana, a fase de sensibilização e desafio devem ser contempladas nos modelos experimentais (AUN et al., 2017). O primeiro contato com o alérgeno, de forma sistêmica, caracteriza a sensibilização e repetidas reexposições constituem a fase de desafio (LAMBRECHT et al., 2009; NIALS; UDDIN, 2008). Nos humanos, a mucosa respiratória é a forma de exposição ao alérgeno e, consequente, ativação da resposta imunológica do tipo 2 (T<sub>H</sub>2), caracterizando a sensibilização. Já nos modelos experimentais animais, o sistema imunológico é ativado mediante a apresentação alergênica pela injeção subcutânea (sc), injeção intraperitoneal (i.p), gotas intranasais (i.n) ou inalação (AUN et al., 2017). A via i.p é a forma tradicional de induzir o processo de sensibilização. Um dos protocolos experimentais que mimetizam a rinite e a asma humana e que é mais frequentemente utilizado e repetido por diversos grupos de pesquisa é a sensibilização de camundongos fêmeas da linhagem isogênica BALB/c ao alérgeno (frequentemente a OVA), via i.p, com duas administrações espaçadas por 7 a 14 dias e o desafio (via aerossol) alergênico ocorre após uma semana da última injeção da sensibilização (FORNHEM et al., 1995; KIRSCHVINK et al., 2007; TAKAZONO; SHEPPARD, 2017).

O desafio antigênico é essencial para promover o processo inflamatório das vias aéreas, logo após a sensibilização sistêmica ter ocorrido. A maior parte dos artigos presentes na literatura, até o momento, utiliza, no protocolo, o desafio antigênico por meio das vias aéreas, durante vários dias. Esse desafio pode ser de forma inalatória pela nebulização (aerossol), administrado por instilação intratraqueal (i.t) ou intranasal (i.n) em formulação aquosa (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2008; OHRUI et al., 1992; WAGERS et al., 2004). A via de escolha utilizada pela maioria dos autores nos protocolos experimentais é a via por aerossóis, porém essa utiliza

maior quantidade de alérgeno, mas é menos invasiva e não requer sedação do animal. Já as vias i.n e i.t além de requerem sedação para serem administradas, são invasivas, apesar de terem como evidente vantagem o fato dos alérgenos serem instilados localmente e diretamente nas vias aéreas, o que leva a uma inflamação alérgica mais exacerbada e intensa (AUN et al., 2017).

A exposição crônica que ocorre em vários dias ao alérgeno mimetiza de forma mais significativa a asma e rinite humana, o que torna possível o estudo de novos medicamentos e estratégias imunoterapêuticas. Os protocolos experimentais com modelos animais, de uma forma geral, foram imprescindíveis no entendimento atual da interação do sistema imune com o sistema respiratório, no tangente a sua fisiopatologia (AUN et al., 2017).

Os modelos experimentais crônicos de doenças respiratórias alérgicas compreendem exposição repetida das vias aéreas a baixas concentrações de alérgenos por períodos de até 12 semanas (NIALS; UDDIN, 2008). Esses alérgenos expostos a longo prazo, em particular, são antígenos proteicos, como a OVA (KUMAR; HERBERT; FOSTER, 2008).

Vários são os alérgenos utilizados em modelos animais para o desenvolvimento das doenças do trato respiratório, como a asma e a rinite alérgicas. Na literatura, observa-se a utilização mais acentuada e contínua da OVA, porém encontram-se artigos que utilizam como alérgenos os ácaros domésticos (HDM), como *Dermatophagoides pteronvssinus* (Der p) ou *D. farinae* (Der f), e suas variações Der p 1, Der f 1, Der p 23; fungos (*Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata*); extratos de barata; antígenos de *Ascaris*; pó de algodão; ambrósia e látex (*Hevea brasiliensis*). A escolha do alérgeno depende da condição a ser replicada e pode ser usado isolado ou em associação (ZOSKY; SLY, 2007).

No entanto, a OVA é o alérgeno mais utilizado. É a principal proteína encontrada na clara de ovo, constituindo aproximadamente 55% da proteína total desta (SANO et al., 1999) e pode ser sintetizada em grandes escalas, possibilitando sua aquisição em grandes quantidades, o que a torna-a de baixo custo financeiro. A utilização da OVA em modelos experimentais de asma e rinite, desencadeia processos inflamatórios alérgicos intensos tanto na cavidade nasal, como pulmonar (BARRETT et al., 2009; KIM et al., 2006).

No processo de sensibilização, utiliza-se doses repetidas dos alérgenos juntamente com adjuvantes para aumentar a resposta imune (NIALS; UDDIN, 2008). Esses adjuvantes, como o hidróxido de alumínio, são utilizados para aumentar a

imunogenicidade dos alérgenos, aumentando as respostas de anticorpos e ativação das células imunes inatas, que promovem, então, uma resposta imune tipo 2 (perfil  $T_H2$ ), permitindo uma melhor eficácia do processo de sensibilização (CHAPMAN et al., 2014; ISHIDA et al., 2011; LAMBRECHT et al., 2009).

Várias espécies de animais são utilizadas para compreender os mecanismos envolvidos na patogênese da asma e da rinite, como por exemplo, camundongos, cobaia, gato, cão, porco, gado, ovelha, cavalo e primatas, porém, o modelo mais comumente utilizado é a inflamação das vias aéreas alérgicas de camundongos (BLUME; DAVIES, 2013; CHAPMAN et al., 2014; CHEN et al., 2017b; KIM; HONG; LEE, 2015; KIRSCHVINK; REINHOLD, 2008; KUYAMA et al., 2010; REN et al., 2017; SAGAR; AKBARSHAHI; ULLER, 2015; SUN et al., 2016; ZOSKY; SLV, 2007).

Os camundongos se destacam por vários motivos, um deles é o tempo de gestação ser bem menor que os demais, em torno de 20 dias, e terem um maior número de descendentes, fáceis de criar, manter e manipular (AUN et al., 2017; CANNING; CHOU, 2008). Além de ter uma grande variedade de reagentes específicos disponíveis para análises das respostas celulares e moleculares. Apresentam ainda uma maior facilidade de mutação genética, os chamados camundongos transgênicos ou camundongos nocaute (gene-knockout), esses são geneticamente modificados para modelagem das doenças de vias aéreas (BONAMICHI-SANTOS et al., 2015; SHAPIRO, 2008).

A linhagem isogênica de camundongo mais utilizada nos modelos experimentais de asma e rinite com sensibilizações e desafios com a OVA é a BALB/c, essa é caracterizada por desenvolver uma boa resposta imunológica polarizada para o perfil  $T_H2$ , o que torna seu uso um sucesso nos protocolos animais. Porém, as linhagens isogênicas C57BL/6 e A/J também são utilizadas em modelos experimentais de doenças respiratórias alérgicas e demonstraram uma resposta satisfatória (NIALS; UDDIN, 2008).

Diante do exposto, os protocolos experimentais que mimetizam as doenças humanas são essenciais na busca pelo entendimento dos mecanismos fisiopatológicos das doenças e consequentemente para os estudos sobre os mecanismos de ação intracelulares de novos compostos utilizados no tratamento de doenças experimentais. Neste contexto a elucidação dos mecanismos imunológicos que levam a CARAS são essenciais para se determinar moléculas alvos responsáveis pela promoção e manutenção do quadro patológico da CARAS e que

venham a no futuro próximo possibilitar a inserção de novos tratamentos farmacoterapêuticos mais efetivos no tratamento desta doença.

## **1.8. Tratamento da CARAS**

O tratamento para a rinite e asma baseia-se na adoção de duas medidas de controle: a medida não farmacológica e a farmacológica. A medida não farmacológica requer o afastamento do contato com alérgenos, como uma etapa da estratégia terapêutica (BOUSQUET et al., 2015; SOLÉ et al., 2012). Onde essa medida deve ser mantida por pelo menos três meses para que uma melhora clínica possa ser observada. (BOUSQUET et al., 2015; PAPADOPOULOS et al., 2015; SOLÉ et al., 2012). A avaliação do impacto dessa medida de controle de exposição a alérgenos e redução dos sintomas, está diretamente relacionada ao número de alérgenos aos quais o indivíduo é sensibilizado e exposto (RUBINI et al., 2017).

### **1.8.1. Medida Farmacológica**

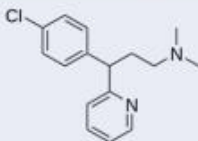
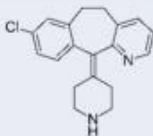
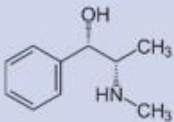
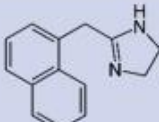
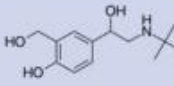
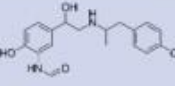
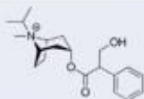
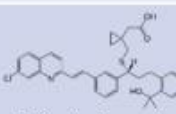
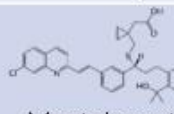
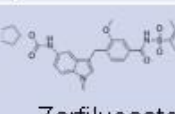
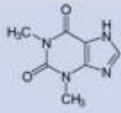
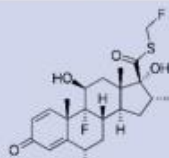
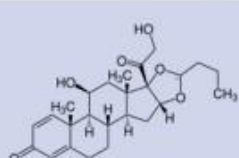
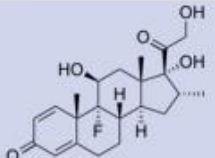
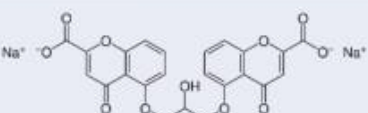
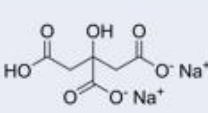
Atualmente, as estratégias terapêuticas no tratamento da rinite e asma, baseiam-se em dois momentos da fisiopatologia da CARAS: a melhora dos processos subsequentes da fase imediata ao segundo contato com o alérgeno, determinando a reação alérgica (quadro clínico) e o controle da fase tardia relacionado a manutenção do processo inflamatório crônico das vias aéreas (PERA; PENN, 2016).

Para o controle da reação alérgica na RA, utiliza-se os anti-histamínicos (BOUSQUET et al., 2001, 2008; SOLÉ et al., 2012) e descongestionantes nasais, sendo esses estimulantes adrenérgicos, promovendo vasoconstrição rápida e alívio do bloqueio nasal (LACCOURREYE et al., 2015). Para o controle rápido da crise asmática e alívio dos sintomas são utilizadas os broncodilatadores pertencentes as classes: agonistas  $\beta$ -adrenérgicos; antagonistas dos receptores muscarínicos M3; e inibidores de fosfodiesterases (FRAGA RIGHETTI et al., 2014). Os antagonistas dos receptores de leucotrienos (CysLts) são utilizados no controle dos sintomas de ambas as doenças (BARNES, 2011; GINA, 2019; WEI, 2016; XU; ZHANG; WANG, 2014).

Para o tratamento do processo inflamatório crônico estabelecido na fase tardia da fisiopatologia da CARAS, a classe terapêutica de escolha são os corticosteroides,

que devido ao seu mecanismo de ação, promove a melhora do quadro inflamatório  $T_H2$  presente nas vias aéreas (BOUSQUET et al., 2008; BROŽEK et al., 2017; DERENDORF; MELTZER, 2008; PERA; PENN, 2016). Os cromoglicatos, que agem estabilizando a membrana mastocitária, impedindo sua degranulação no contato cruzado com o alérgeno, é uma classe terapêutica que pode ser utilizada no tratamento da CARAS em associação aos corticosteroides (BOUSQUET et al., 2008; RATNER et al., 2002). Na tabela 1 estão representados os fármacos das classes terapêuticas utilizadas na medida farmacológica no controle da CARAS.

Tabela 1. Classes Terapêuticas utilizadas no controle das reações alérgicas na rinite e crise de asma

| Classe Terapêutica                                                  | RA                                                                                                           |                                                                                                       | Asma                                                                                                      |                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Controle da Reação Alérgica da Rinite e Crise Asmática              |                                                                                                              |                                                                                                       |                                                                                                           |                                                                                                   |
| Anti-histamínicos                                                   | <br>Clorfeniramina          | <br>Desloratadina   |                                                                                                           |                                                                                                   |
| Descongestionantes                                                  | <br>Pseudoefedrina          | <br>Nafazolina      |                                                                                                           |                                                                                                   |
| Broncodilatadores                                                   |                                                                                                              |                                                                                                       |                                                                                                           |                                                                                                   |
| Agonistas Adrenérgicos β                                            |                                                                                                              |                                                                                                       | <br>Salbutamol         | <br>Formoterol |
| Antagonistas Muscarínicos M3                                        |                                                                                                              |                                                                                                       | <br>Ipratrópio        |                                                                                                   |
| Antagonistas de CysLTs                                              | <br>Montelukaste          | <br>Montelukaste | <br>Zafirlucaste     |                                                                                                   |
| Inibidores de fosfodiesterases                                      |                                                                                                              |                                                                                                       | <br>Teofilina        |                                                                                                   |
| Tratamento do processo inflamatório crônico na Fase Tardia da CARAS |                                                                                                              |                                                                                                       |                                                                                                           |                                                                                                   |
| Corticosteróides                                                    | <br>Fluticasona           | <br>Budesonida    | <br>Dexametasona     |                                                                                                   |
| Cromoglicatos                                                       | <br>Cromoglicato de sódio |                                                                                                       | <br>Cromolina sódica |                                                                                                   |

Fonte: Paiva Ferreira, 2020.

As classes terapêuticas apresentam efeitos farmacológicos importantes no processo inflamatório da CARAS, porém, todas provocam efeitos colaterais e adversos importantes na avaliação do manejo no tratamento do paciente, a exemplo de: sedação, diminuição da atenção e cognição, retenção urinária, constipação intestinal e hipotensão, pelo uso de anti-histamínicos (SIMONS; SIMONS, 2011; XU; ZHANG; WANG, 2014); cefaleia e tolerância, pelos descongestionantes (CHERVINSKY et al., 2005); tremor muscular, taquicardia e hipopotassemia, pelos agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (FRAGA RIGHETTI et al., 2014); glaucoma pelos antagonistas muscarínicos (FRAGA RIGHETTI et al., 2014); dor abdominal, cefaleia e sonolência, pelos antagonistas CysLTs (GINA, 2019); náuseas e vômitos, diurese e crises epiléticas, pela teofilina (FRAGA RIGHETTI et al., 2014); irritação local, sangramento, interferência no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), reabsorção óssea, catarata e glaucoma, pelo uso de corticosteroides (DERENDORF et al., 2014; MELTZER et al., 2013).

Portanto, é essencial a busca por novas moléculas que venham a apresentar efeitos farmacológicos importantes no manejo da CARAS, no entanto, que apresentem menos efeitos colaterais. A pesquisa em torno desse conceito é cada vez mais requerida. Uma alternativa terapêutica que visa somar seus efeitos à terapia medicamentosa é a introdução dos imunobiológicos, sendo uma ferramenta de extrema seletividade no seu mecanismo de ação que, a depender do endotipo e biomarcadores da asma e rinite, podem ser utilizados. Na CARAS, ambas são respostas Tipo 2 ( $T_H2$ ). No Brasil, está aprovada a terapia com os anticorpos Omalizumab, anti-IgE, (HUMBERT et al., 2014) e Mepolizumab, anti-IL-5 (FAHY, 2015; ORTEGA et al., 2014). Estudos pré-clínicos promissores com os anticorpos anti-IL-13 e anti-IL-4 estão sendo desenvolvidos (FAHY, 2015; LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019).

### **1.9. Vias de administração**

Atualmente, as vias de administração na farmacoterapia da rinite e asma mais utilizadas são via oral e a tópica nasal (intranasal). Os medicamentos tópicos nasais no caso da rinite têm eficácia similar aos orais, e têm como sua principal vantagem terapêutica o início de ação mais rápida pela distribuição do fármaco nas vias aéreas e maior controle da obstrução nasal. No entanto, o sabor amargo de alguns tópicos

nasais, pode dificultar a adesão ao tratamento (ALVAREZ-LORENZO; CONCHEIRO, 2014; KALINER et al., 2011; LAFORCE et al., 2004).

A biodisponibilidade sistêmica de um fármaco constitui-se um fator de segurança em sua terapia. O termo biodisponibilidade é aplicado a velocidade e extensão da entrada do fármaco na circulação sistêmica. Na terapia nasal, o índice de absorção depende da condição da mucosa, suprimento sanguíneo e edema nasal. Uma porcentagem de até 50% da dose aplicada é deglutida e absorvida no estômago. Os efeitos sistêmicos dependem da dose absorvida pela mucosa nasal somada a porção deglutida e efetividade da metabolização hepática de primeira passagem do fármaco (SASTRE; MOSGES, 2012). Estando na corrente sanguínea, uma porção do fármaco, a depender da sua lipofilicidade, liga-se a proteínas plasmáticas diminuindo a possibilidade de efeitos adversos (SAMOLIŃSKI; NOWICKA, 2015). O fármaco ideal deveria apresentar alta lipofilicidade, baixa disponibilidade sistêmica e rápida absorção (SAKANO et al., 2017).

#### **1.10. Alcaloides**

Os alcaloides apresentam um importante papel no metabolismo e função dos organismos sendo oriundos de vegetais, animais e microrganismos (GOYAL; SASMAL, 2014; GREEN et al., 2013; HAN; LIU; WANG, 2013; TADEUSZ ANISZEWSKI, 2015; ZANGARA, 2003). Os alcaloides são considerados como as drogas mais antigas usadas no tratamento de muitas doenças e, algumas moléculas, atualmente, ainda são usadas na medicina moderna, como a morfina e a escopolamina (BHATTACHARYA et al., 2014; LI et al., 2014).

Novos alcaloides são descobertos e desenvolvidos por meio da síntese química (HAN; LIU; WANG, 2013; POUWER et al., 2014). Os alcaloides sintéticos e semissintéticos vêm apresentando maior atividade biológica, quando comparados aos alcaloides naturais, onde modificações a nível de elétrons podem proporcionar mudanças consideráveis nos efeitos dos alcaloides (AMAT et al., 2012; DUBOUZET et al., 2013; MEHROTRA et al., 2013). Isso pode ser atribuído a capacidade desses metabólitos apresentarem uma flexibilidade química estrutural, onde o mesmo alcaloide, em diferentes condições celulares, pode modificar sua estrutura e, portanto, seu efeito farmacológico (TADEUSZ ANISZEWSKI, 2015).

### 1.10.1. Alcaloides Tetrahydroisoquinolínicos

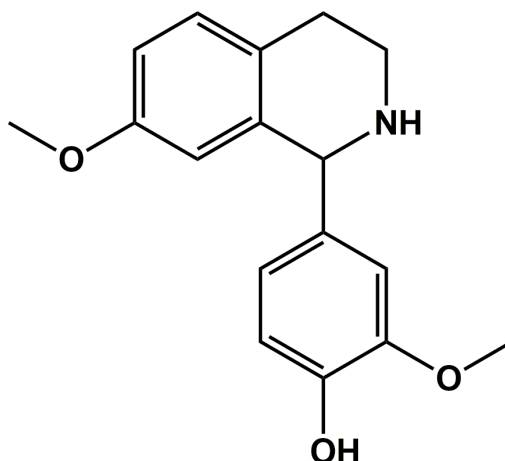
Os alcaloides tetrahydroisoquinolínicos tem como precursor biossintético o aminoácido aromático L-tirosina (SINGH; SHAH, 2016). Os efeitos farmacológicos dessa classe de alcaloides estão sendo, cada vez mais, estudados e descritos na literatura. Os alcaloides tetrahydroisoquinolínicos apresentam atividade dopaminérgica (ANDUJAR et al., 2012; BERENGUER et al., 2009; EL AOUAD et al., 2009; PÁRRAGA et al., 2013); anticonvulsivante (BHUTADA et al., 2010; GITTO et al., 2010; ROSARIA GITTO et al., 2006); neuroprotetora (ABE et al., 2005; ANTKIEWICZ-MICHALUK et al., 2006; LUDWIG et al., 2006); antitrombótica (CHENG et al., 2009; PYO et al., 2008; YUN-CHOI et al., 2001) e anti-inflamatória (ALVES DE ALMEIDA et al., 2017; KIM et al., 2007; LI et al., 2015b; MANIKANDAN A; SIVAKUMAR A, 2016; PARK et al., 2006; SOUTO et al., 2011; TSOYI et al., 2008b; WANGCHUK et al., 2016; ZHANG et al., 2014).

Os primeiros alcaloides que apresentam um grupo fenil na posição 1 do anel tetrahydroisoquinolínico a serem isolados foram as (+)- Criptostilinas I, II e III, isoladas a partir da *Cryptostylis fulva* (KAMETANI; SUGI; SHIBUYA, 1971; LEANDER; LUNING; RUUSA, 1969), em seguida, foram isoladas as (-)- Criptostilinas I, II e III, a partir da *Cryptostylis erythroglossa* (LEANDER; LUNING; WESTIN, 1973).

### 1.10.2. MHTP [2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-il) fenol]

O MHTP é um alcaloide que apresenta o núcleo base 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolínico, sendo análogo estrutural do alcaloide criptostilina II, isolado da *Cryptostylis fulva* (LEANDER; LUNING; WESTIN, 1973). Sua estrutura química está demonstrada na figura 3.

**Figura 3. Estrutura química do MHTP [2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-1-il) fenol]**



Fonte:(CORDEIRO, 2012).

O rendimento da síntese do MHTP é de 93,45%, essa proporção conota a possibilidade de, futuramente, definido seus efeitos farmacológicos, ser inserido na indústria farmacêutica, não apresentando a problemática de impossibilidade de sua produção em larga escala. Está problemática está inserida constantemente, quando se há necessidade de extrativismo vegetal em grandes proporções para obtenção de alcaloides naturais (CORDEIRO, 2012).

O estudo da toxicidade aguda não clínica do MHTP foi o primeiro passo da busca por suas atividades farmacológicas frente a futuros estímulos inflamatórios. Neste contexto o estudo da sua toxicidade aguda não clínica em camundongos da linhagem Swiss; resultou em baixa toxicidade, com dose letal de 50% (DL 50) maior que 1000 mg/kg, sem a presença de atividade genotóxica (FERREIRA, 2014). Esses resultados foram de grande relevância para o avanço do estudo das propriedades farmacológicas desse alcaloide, fornecendo segurança da janela terapêutica para o tratamento com MHTP.

Pacheco de Oliveira e colaboradores em 2015 observaram que o tratamento oral com o MHTP, na dose de 2,5 mg/kg, em modelos de inflamação aguda, apresentou uma atividade antiedematogênica, mediante o edema formado pela carragenina e prostaglandina E2 (PGE2). O tratamento com MHTP inibiu a migração de polimorfonucleares e extravasamento proteico para o peritônio, em modelo experimental de peritonite, induzida por carragenina. Em modelo de lesão pulmonar aguda (LPA), induzida por LPS (Lipopolissacarídeo Bacteriano), o MHTP reduziu a migração de células para o sítio inflamatório. Em cultura de macrófagos peritoneais estimulados com LPS, o MHTP inibiu a produção de Óxido Nítrico (NO), bem como

as citocinas pró inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6. Esses dados comprovam a atividade anti-inflamatória do MHTP, mediante a processos inflamatórios de fase aguda, em resposta a micro-organismos (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015).

Do Nascimento Xavier e colaboradores em 2019 demonstraram que o MHTP administrado pela via intranasal (2,5 mg/kg) promoveu redução na migração de células totais e neutrófilos, bem como dos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  no fluido do lavado bronco alveolar (BALF) de camundongos com LPA e, ainda o MHTP permitiu a sobrevivência de 100% dos animais. Os efeitos farmacológicos do MHTP apresentados acima estão associados a regulação negativa da via de sinalização dependente de TLR4- p38MAPquinase/p65NF- $\kappa$ B em células inflamatórias no BALF (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019).

Em modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA, o tratamento por via intranasal com MHTP, na dose de 5 mg/kg, promoveu efeito antialérgico, devido à diminuição na produção de IgE-alérgeno-específica; anti-inflamatório, mediante a inibição na migração de polimorfonucleares, em especial eosinófilos, e linfócitos TCD3<sup>+</sup> para o sítio inflamatório e diminuição do padrão inflamatório histopatológico pulmonar; e efeito imunomodulador, devido à diminuição da população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e a concentração de citocinas do perfil T<sub>H</sub>2 (IL-4 e IL-13) no BALF, além de diminuir a produção de muco pelas células caliciformes presentes no pulmão (PAIVA FERREIRA et al., 2018).

Portanto, os resultados acima apresentados comprovam os efeitos anti-inflamatório, antialérgico e imunomodulador do MHTP nos processos inflamatórios induzidos e, ainda as vias de administração oral e intranasal realizadas no tratamento como o MHTP apresentaram semelhanças quanto ao seu efeito onde a dose de 2,5 mg/kg se mostrou ter um papel anti-inflamatório mediante a processos de inflamação aguda, já a dose de 5 mg/kg promoveu um efeito imunomodulador em processo inflamatório alérgico pulmonar.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do tratamento, pelas vias oral ou intranasal, com o MHTP na dose de 5 mg/kg em camundongos com CARAS, síndrome que une os processos patológicos da rinite e asma concomitantes, e desvendar os possíveis mecanismos intracelulares no sentido de caracterizar o alcaloide como uma possível molécula a ser testada em ensaios clínicos e torna-la um fármaco a ser acrescido ao arsenal de medicamentos no tratamento da síndrome de asma e rinite alérgicas combinadas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Investigar os mecanismos imunomoduladores do alcaloide MHTP quando administrado pelas vias intranasal (in) e oral (vo), no tratamento da CARAS induzida por Ovalbumina.

### **2.2. Específicos**

Avaliar o efeito do MHTP sobre os parâmetros característicos da rinite:

- Sinais clínicos nasais (espirros e fricção nasal);
- Reatividade nasal induzida por histamina;
- Migração de células inflamatórias no lavado nasal;
- Inflamação tecidual e produção de muco na cavidade nasal.

Analisar o efeito do MHTP sobre os parâmetros característicos da asma:

- Migração de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (BALF);
- Inflamação tecidual, produção de muco, hiperatividade das vias aéreas (AHR) e, o espessamento da matriz extracelular (ECM) na cavidade pulmonar.

Estimar os mecanismos imunomoduladores do MHTP sobre a resposta imune característica da CARAS:

- Níveis séricos de IgE total e IgE OVA-específica;
- Citocinas (IL-33, TSLP, IL-4, IL-13, IL-5; TGF- $\beta$ , IL-17, IL-10 e INF- $\gamma$ ) no BALF.

Identificar nos granulócitos e linfócitos do BALF a atividade do MHTP nos mecanismos de transdução de sinal intracelular envolvendo as MAPKs (p38 e ERK1/2) e NF- $\kappa$ B(p65) no processo inflamatório da CARAS.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Animais

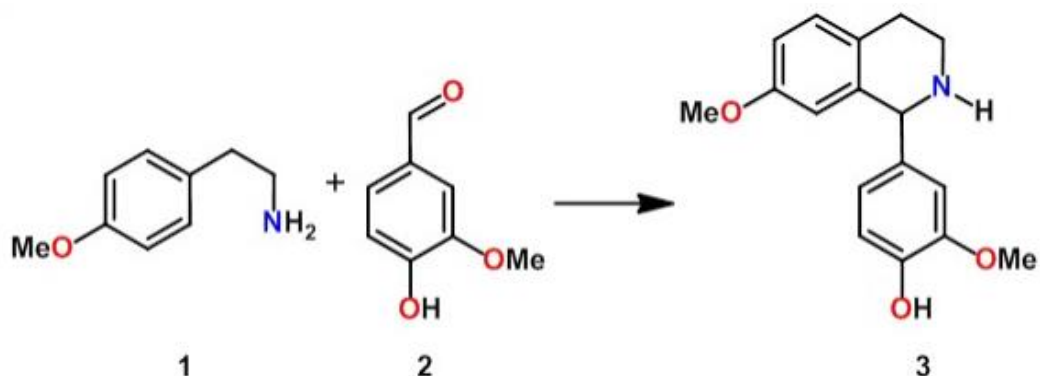
Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c fêmeas com idade entre 6 a 8 semanas, pesando entre 20 a 25g foram fornecidos pelo biotério Prof. Dr. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM/UFPB), João Pessoa, PB, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de  $25 \pm 2$  °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas (6h00 as 18h00 claro e de 18h00 as 6h00 escuro) com livre acesso à água (autoclavada) e a uma dieta controlada, a base de ração do tipo *pellets* durante todo o período de experimentação.

Cada grupo experimental foi representado por 6 animais. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)/Brasil, além de observar as exigências dispostas na Lei nº11794/2008. A eutanásia dos animais foi realizada pela administração intra-muscular (i.m.) de uma solução anestésica contendo 29 mg/mL de ketamina e 1,91 mg/mL de xilasina em solução salina (NaCl 0,9 %). Este projeto foi aprovado pela Comité de Ética no Uso Animal (CEUA/UFPB) sob o protocolo de número 165/2015 (Anexo 1).

#### 3.2. Obtenção e preparo do MHTP

O alcaloide tetrahidroisoquinolínico, 2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-il) fenol (MHTP) foi fornecido gentilmente pelo prof. Dr. Luís Cezar Rodrigues, CBIOTEC/UFPB/João Pessoa, PB, Brasil. Para a síntese do alcaloide foi utilizado dois reagentes, a 4-metoxifeniletamina (1) e a vanilina (2), aplicando a reação de *Pictet–Spengler* (Figura 4). O MHTP tem fórmula molecular  $C_{17}H_{19}NO_3$  e massa molecular 285 g/mol, obtendo um rendimento de 93,45% (CORDEIRO, 2012; PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015).

**Figura 4. Síntese do MHTP.**



Para a obtenção do MHTP na dose de 5 mg/kg foram preparadas duas suspensões. Para a administração do MHTP por via instilação nasal (40 µL/ animal) utilizou-se a concentração de 3,125 mg/mL de MHTP em 50 µL de Ácido Clorídrico (HCl) 1N e em seguida foi adicionado 500 µL de solução salina. O pH foi ajustado para 7 com hidróxido de sódio (NaOH). Para a administração do MHTP por via oral (10 µL/ 10 g animal) utilizou-se a concentração de 0,5 mg/mL de MHTP em 50 µL de Ácido Clorídrico (HCl) 1N e em seguida foi adicionado 500 µL de solução salina. O pH foi ajustado para 7 com hidróxido de sódio (NaOH).

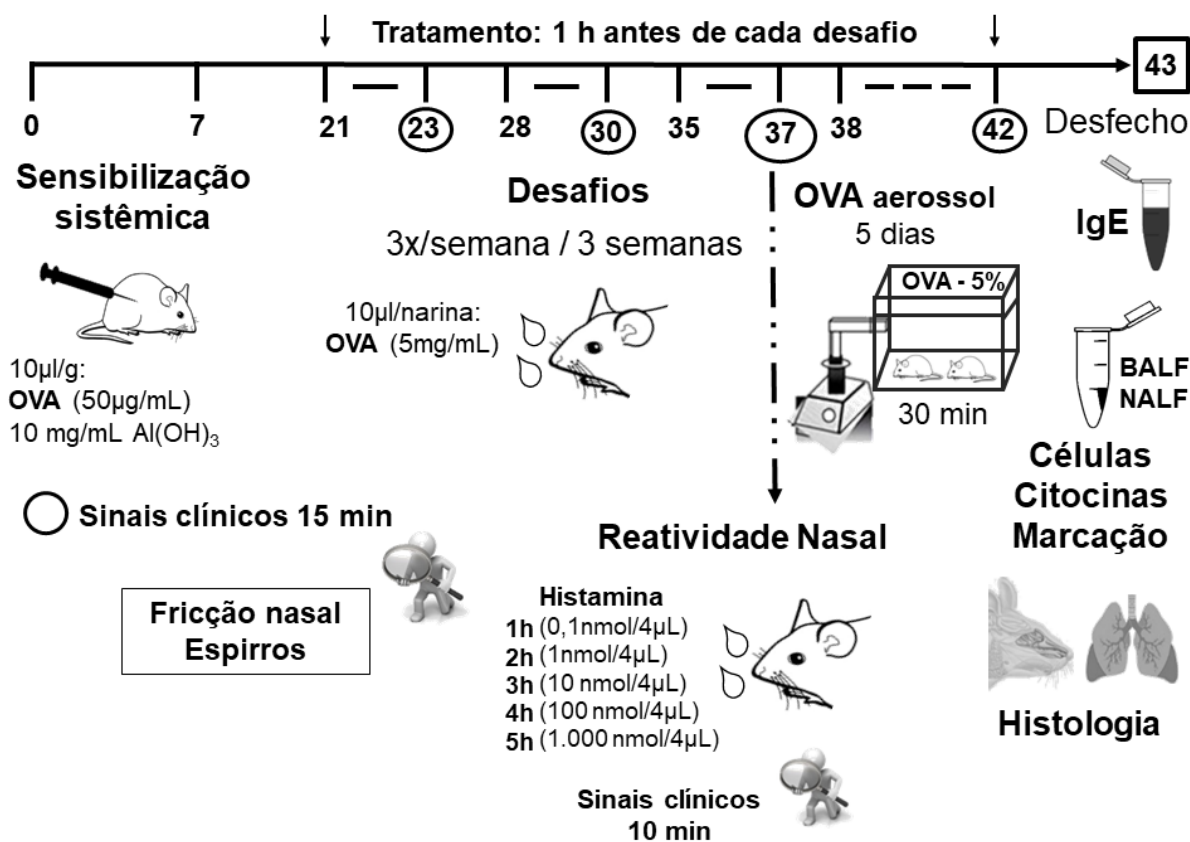
### **3.3. Protocolo Experimental de CARAS**

O modelo experimental de CARAS desenvolvido no presente trabalho, teve como base os trabalhos de LI e col. (2015a, 2016) com modificações. Nos dias 0 e 7 os camundongos foram sensibilizados com injeção de 10µL/g, intraperitoneal (i.p.), de uma suspensão contendo 50 µg/mL de OVA grade V (Ovalbumina, SIGMA Chemical, St. Louis, MO) e 10 mg/mL de Al(OH)<sub>3</sub> (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) em solução salina. Dos dias 21 a 37 do protocolo, durante 3 dias consecutivos, em 3 semanas consecutivas, os animais foram desafiados por instilação nasal com uma solução de OVA-V (5mg/mL), foi administrado 20 µL/ animal.

A partir do 38° dia, por cinco dias consecutivos, os animais foram desafiados com aerossol de OVA grade II (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) a 5% em solução salina. Os desafios foram realizados durante 30 minutos diários em uma câmara fechada, sob um fluxo contínuo de aerossol, com o auxílio de um nebulizador ultrassônico. O tratamento dos animais ocorreu uma hora antes de cada desafio. No 43° dia do protocolo, ocorreu o desfecho do modelo experimental e foi realizada a coleta do material biológico para análise dos parâmetros imunológicos. A figura 5

esquematiza os passos realizados durante a execução do protocolo experimental da CARAS.

Figura 5. Esquema representativo do modelo experimental de CARAS.



Fonte: Paiva Ferreira, 2020.

### 3.4. Tratamentos

Os animais foram distribuídos em sete grupos experimentais (n=6), o grupo Salina (animais saudáveis não sensibilizado e desafiado com OVA); o grupo OVA (animais doentes, sensibilizado e desafiado com OVA) com o quadro fisiopatológico da CARAS. Quatro grupos experimentais foram tratados com MHTP. Dois grupos foram tratados com MHTP (5 mg/kg) por via intranasal (in) ou via oral (v.o.) e assim como o grupo Salina, não foram sensibilizados nem desafiados com OVA, e dois grupos foram tratados com MHTP (5 mg/kg) pelas duas vias de administração sendo expostos aos processos de sensibilização e desafios com OVA. Por fim, utilizamos o grupo Dexa, tratados com dexametasona (2mg/kg, DECADRON, Achê®) como droga padrão por ser um corticoide e utilizado na clínica para o controle terapêutico da CARAS, esses animais também foram expostos ao alérgeno ovalbumina. Todos os tratamentos por via oral foram realizados pelo método de gavagem e os

tratamentos intranasal pelo método de instilação nasal. Os tratamentos ocorreram uma hora antes de cada desafio com Salina ou Ovalbumina. A tabela 2 demonstra os tratamentos e desafios dos grupos experimentais para melhor compreensão.

**Tabela 2. Grupos experimentais no modelo da CARAS.**

|                          | <b>Grupo</b>         | <b>Sensibilização</b> | <b>Desafio</b> | <b>Tratamento</b> |
|--------------------------|----------------------|-----------------------|----------------|-------------------|
| <b>Animais saudáveis</b> | <b>Salina</b>        | Salina                | Salina         | -                 |
|                          | <b>MHTP in</b>       | Salina                | Salina         | MHTP 5 mg/kg (in) |
|                          | <b>MHTP vo</b>       | Salina                | Salina         | MHTP 5 mg/kg (vo) |
| <b>Animais doentes</b>   | <b>OVA</b>           | OVA                   | OVA            | -                 |
|                          | <b>MHTP in + OVA</b> | OVA                   | OVA            | MHTP 5 mg/kg (in) |
|                          | <b>MHTP vo + OVA</b> | OVA                   | OVA            | MHTP 5 mg/kg (vo) |
|                          | <b>Dexa + OVA</b>    | OVA                   | OVA            | Dexa 2 mg/kg (vo) |

Fonte: Paiva Ferreira, 2020.

### 3.5. Sinais Clínicos

Os sinais clínicos nasais, fricção nasal e espirro, foram quantificados, por 15 minutos, em cada camundongo de cada grupo nos dias 23º, 30º, 37º e 42º do protocolo, imediatamente após o desafio com OVA (KUYAMA et al., 2010).

### 3.6. Reatividade nasal induzida pela histamina

A hiper-reatividade nasal a histamina foi determinada pela quantificação dos sinais clínicos: espirro e fricção nasal, durante 10 minutos, após a administração de doses crescentes de histamina diluída em solução salina, na cavidade nasal. No dia 37º, uma hora após o desafio com o alérgeno, 4 µL/animal de doses crescentes de histamina (0,1, 1, 10, 100 e 1000 nmol/ camundongo) foram instilados na cavidade nasal de forma consecutiva em intervalos de 60 minutos (KUYAMA et al., 2010).

### 3.7. Quantificação celular

A celularidade foi quantificada nos fluidos das cavidades nasal (NALF) e broncoalveolar (BALF) que foram coletados no 43º dia do protocolo experimental, 24 horas após o último desafio. O BALF foi coletado com 1,5 mL de HBSS+/- gelado, injetado no pulmão do animal pela traqueia e, o NALF foi coletado com 1mL de

HBSS+/- gelado, injetado na nasofaringe do animal pela traqueia, sentido traqueia-nariz, os fluidos foram transferidos para tubos tipo eppendorf e armazenados em isopor refrigerado. A contagem do número total de células no BALF e no NALF foi realizada em câmara hemocitométrica (Neubauer). O BALF foi diluído (1:4) e o NALF foi diluído (1:2) em solução de Turk (VETEC, Rio de Janeiro, RJ). Para tal, em 10µL do BALF foi adicionado 30 µL de Turk e em 20 µL do NALF foi adicionado 20 µL de Turk; a contagem das células totais foi realizada no microscópio óptico (40 X - BX40, OLYMPUS).

Após a contagem das células totais, os tubos foram centrifugados (centrífuga CR422, JONAM) a 300 g, em uma temperatura de 4 °C, por seis minutos. Os sobrenadantes foram separados e congelados no freezer a uma temperatura de -20°C para posterior dosagem de citocinas. Para contagem diferencial, o pellet foi ressuspensão em 300µL de HBSS+/- gelado, homogeneizado e retirados 200 µL de cada fluido (BALF e NALF) e centrifugados em lâminas de citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método panótico (Kit Panótico, Renylab). A contagem diferencial de células foi realizada por microscopia óptica. Cada lâmina foi analisada até a contagem de 100 células, utilizando para isso a objetiva de imersão (100X), os leucócitos contados foram divididos em quatro classes: macrófagos; linfócitos; neutrófilos e eosinófilos.

### **3.8. Histologia das cavidades nasal e pulmonar**

O maior lóbulo do pulmão esquerdo e a cavidade nasal dos camundongos foram coletados no dia do desfecho (43 dias) do protocolo da CARAS após a eutanásia por overdose anestésica. Os tecidos foram fixados em solução de formalina tamponada a temperatura ambiente. A cavidade nasal (cabeça) foi adicionada em solução ácido nítrico (10%) para descalcificação. O processamento histológico iniciou-se pela desidratação em álcool etílico em concentrações crescentes (70, 80, 90 e 100%) e inclusão em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo com espessura de 4µm, adicionados em lâmina e desparafinizados. Os cortes aderidos na lâmina foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE), Ácido Periódico – Schiff (PAS) ou Tricomio de Masson (TM) e analisadas em microscopia óptica (Motic BA 410). As fotografias digitais foram capturadas pela câmera Moticam 5.0 MP. As análises morfométricas dos achados histológicos foram realizadas pelo software KS400.

Para a análise tecidual dos cortes corados com Hematoxilina-Eosina (H&E), foi pontuado um escore de 0 a 6, em que a soma dos parâmetros foi quantificada, de acordo com a lesão evidenciada. As lesões evidenciadas foram vasodilatação (presente [1] ou ausente [0]), manutenção da integridade epitelial bronquiolar ou nasal (presente [1] ou ausente [0]), obstrução alveolar ou nasal (presente [1] ou ausente [0]). Finalmente, como parte do escore, a migração celular foi avaliada, onde zero (0) significa ausência de migração, (1) poucas células isto é de 0 a 9 células por campo, (2) mais de 10 células por campo e (3) formação dos anéis celulares perivasculares e peribronquiolares ou acima de 20 células por campo na cavidade nasal. As possíveis alterações foram avaliada em todos os campos de cada lâmina de forma duplo-cego na objetiva de 40x (PAIVA FERREIRA et al., 2018).

Para a realização da técnica de morfometria utilizou-se os cortes histológicos corados pelo TM e PAS. Estes foram visualizados pela objetiva de 40x e digitalizadas 20 imagens aleatórias através do mesmo microscópio e microcâmera, perfazendo uma área total de 281.872 mm<sup>2</sup> de parênquima pulmonar ou nasal analisado em cada tipo de coloração. A área de PAS positiva e a área corada pelo TM foram calculadas pelos algoritmos construídos no software KS400. Em cada imagem foram selecionados todos os pixels com tons de azul (TM) ou roxo (PAS positiva) para a criação de uma imagem binária, processamento digital e cálculo da área em µm<sup>2</sup> (PRATA et al., 2017).

Para o cálculo da área do musculo liso das regiões pulmonares, os cortes histológicos de pulmão corados pela TM foram visualizados pela objetiva de 40x do microscópio Olympus (Tóquio, Japão) para a digitalização de 20 regiões bronquiolares aleatórias pela microcâmera Q-Color3. O interstício pulmonar foi excluído da análise utilizando ferramentas do programa. Os tipos de pixels da musculatura lisa bronquiolar foram selecionados para a criação de uma imagem binária e cálculo da área em µm<sup>2</sup>. As análises morfométricas foram realizadas pelo programa KS400 contido no analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Germany) (PRATA et al., 2017). A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e a definição das condições de morfometria foi a descrita por Calliari em 1997 (CALLIARI, 1997).

### **3.9. Quantificação de IgE e Citocinas**

Para a quantificação da IgE, no 43º dia do protocolo, 24 horas após o último desafio, o sangue foi coletado pelo plexo braquial de todos os grupos experimentais para a obtenção do soro. Após os camundongos serem anestesiados, foi efetuado um corte no plexo braquial e o sangue foi coletado com auxílio de uma pipeta Pasteur, pela qual foi aspirado cerca de 500 a 1000 µL de sangue. O sangue foi armazenado em tubos do tipo eppendorf inclinados a 45º e estocados em geladeira por cerca de quatro horas, para facilitar a formação dos coágulos e coleta dos soros que foi realizada após a centrifugação do sangue por 300 g, a 4°C por 10 min. Em seguida, os soros foram alicotados, etiquetados e congelados a -20 °C para serem quantificados pelo Ensaio Imunoenzimático do tipo ELISA sanduíche para IgE total e IgE OVA específica, de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

As citocinas IL-33, TSLP, IL-4, IL-13, IL-5, TGF-β, IL-17, IL-10 e IFN-γ, presentes no BALF de camundongos sensibilizados e desafiados foram quantificadas pelo método imunoenzimático ELISA, de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

### **3.10. Diferenciação de granulócitos e linfócitos e marcação celular das MAP quinases fosforiladas (p-ERK1/2 e p-p38) e da porção p65 do fator de transcrição NF-κB em ambas as populações**

A análise celular por citometria de fluxo permite a distinção de populações celulares heterogêneas a partir de parâmetros como “forward-scattered light” (FSC) e “side-scattered light” (SSC), os quais distinguirão as células pelo tamanho (difração da luz-FSC) e granularidade (difusão da luz-SSC) respectivamente. Desse modo foi quantificado as populações de granulócitos e linfócitos presentes no BALF de animais submetidos ao protocolo experimental de CARAS (VAN RIJT et al., 2004).

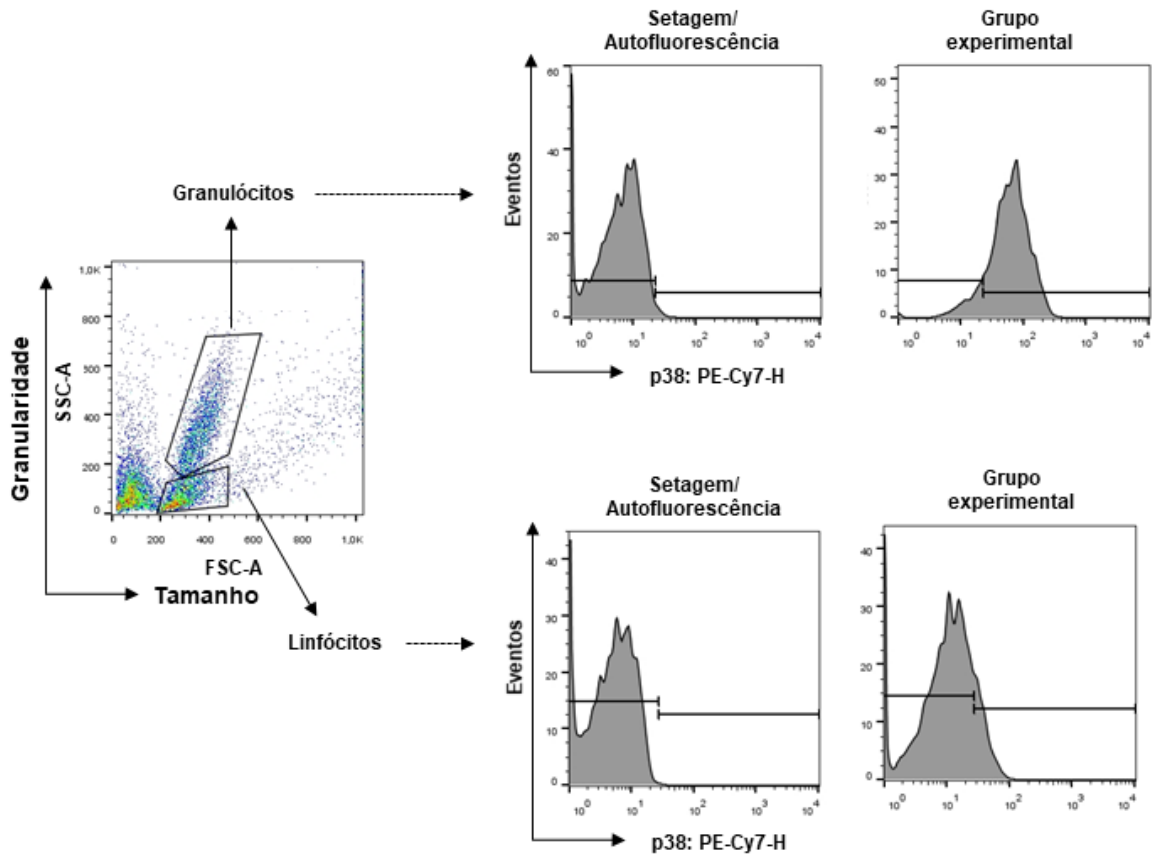
A avaliação da expressão das porções fosforiladas das MAP quinases (p-ERK1/2 e p-p38) e da porção p65 do fator de transcrição NF-κB essenciais para síntese de citocinas e moléculas pró-inflamatórias que modulam o mecanismo patológico da CARAS foram avaliadas pela técnica de citometria de fluxo e para tal,

o BALF foi coletado, centrifugado, retirado o sobrenadante e ressuspensão em volume calculado para  $5 \times 10^5$  células/mL de HBSS+/- gelado e destinado à análise dos parâmetros FSC e SSC no citômetro de fluxo (FACSCanto™II) onde para cada marcador avaliado foi utilizado anticorpo específico e marcação fluorescente. O protocolo específico para cada marcação foi realizado de acordo com as normas do Kit do fabricante utilizado (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

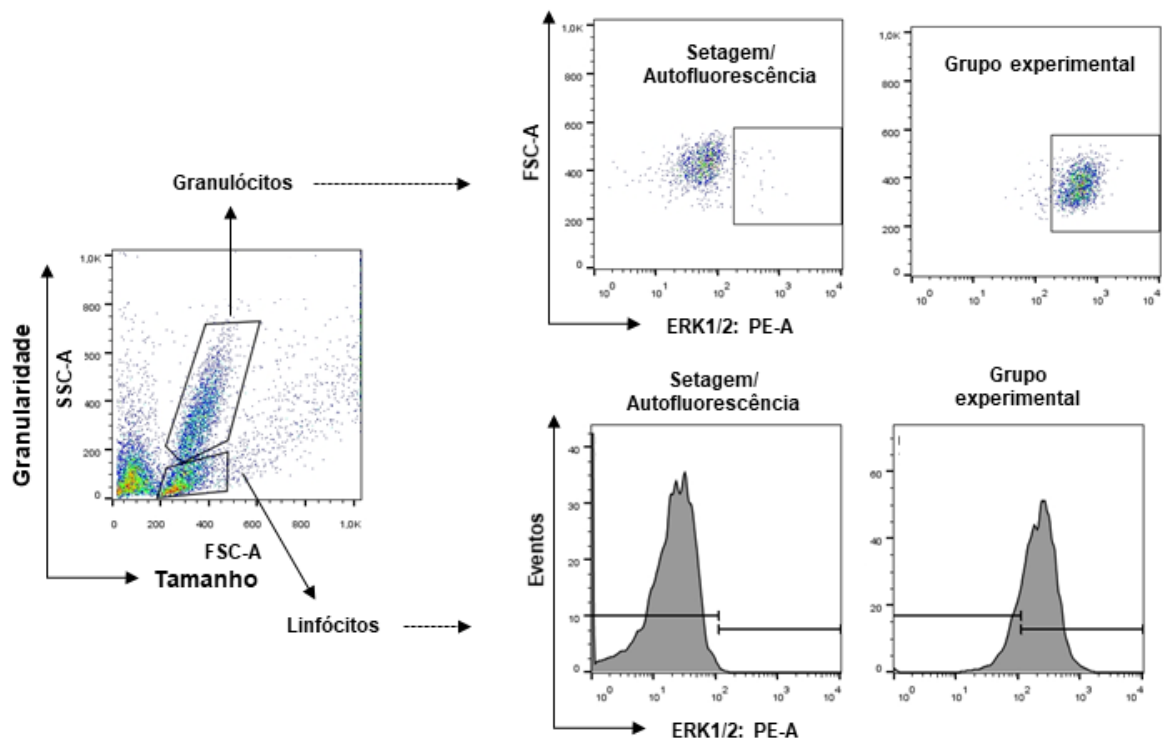
A análise por citometria de fluxo foi realizada pela medição da fluorescência dos marcadores celulares, foi selecionado em todas as análises 10 mil eventos. Para a marcação de p-ERK1/2 (PE) foi detectada após passagem em filtro de 564 a 606 nm. Para a marcação de p-p38 (PE Cy7) foi detectada após passagem em filtro de 750 a 810 nm e para a marcação de p65- NF- $\kappa$ B (PerCP-Cy5.5) foi detectada após passagem em filtro de 670 a 735 nm O citômetro de fluxo (FACSCanto™II, com o software de aquisição sendo o BD FACSDiva 6.1.) utilizado foi equipado com três lasers de excitação 405nm 30mW (diodo em violeta), 488nm 20mW (argônio em azul) e 633nm 17mW (Hélio Neônio em vermelho) de potência, resfriado a ar. Na figura 6 está demarcada as populações de granulócitos e linfócitos que foram utilizadas para analisar a ativação das MAP quinases (p-ERK1/2 e p-p38) e da porção p65 do Fator de Transcrição NF- $\kappa$ B neste estudo.

Figura 6. Populações de granulócitos e Linfócitos selecionadas para análise da ativação das MAP quinases (p-ERK1/2 e p-p38) e do Fator de Transcrição NF- $\kappa$ B(p65).

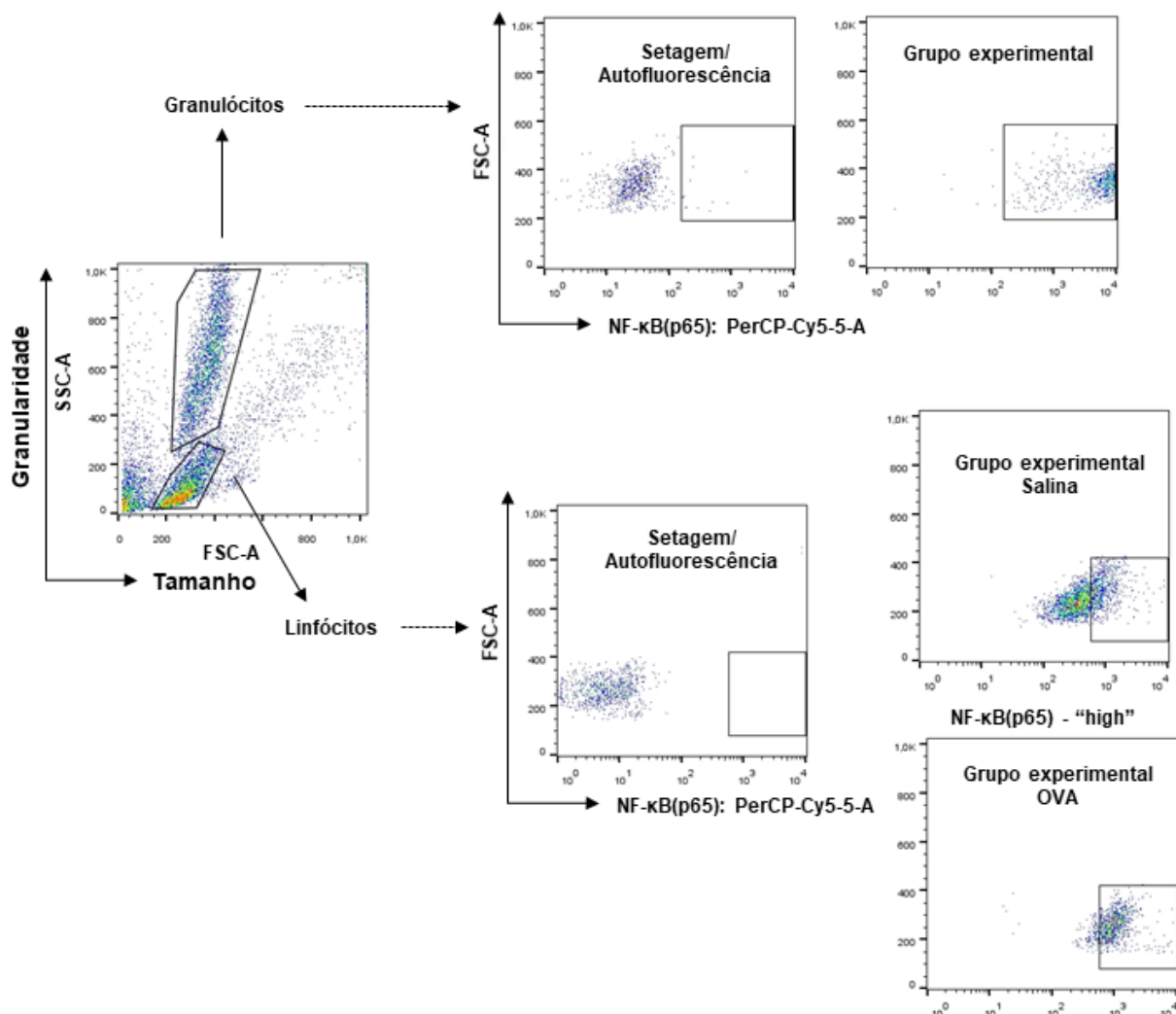
(a)



(b)



(c)



Esquema da análise por citometria de fluxo realizada em granulócitos e linfócitos no BALF de animais com CARAS. **(a)** análise da p-ERK1/2, **(b)** análise da p-p38 e **(c)** análise do NF-κB(p65) "high". Fonte: Paiva Ferreira, 2020.

### 3.11. Análise Estatística

Para todas as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 8.0 e valores com  $P < 0,05$ , considerados significantes (GraphPad Software Inc., San Diego, U.S.A.). Para analisar os dados do Citometro de Fluxo foi utilizado o programa FlowJo, versão 10. Todos os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e analisados empregando-se o teste estatístico ANOVA one-way seguido do teste de Tukey onde (a)  $p < 0,05$  comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$  comparado ao grupo OVA.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Efeito do MHTP sobre os sinais clínicos nasais (espirros e fricção nasal) após o último desafio por AEROSSOL com ovalbumina (OVA) no modelo experimental de CARAS**

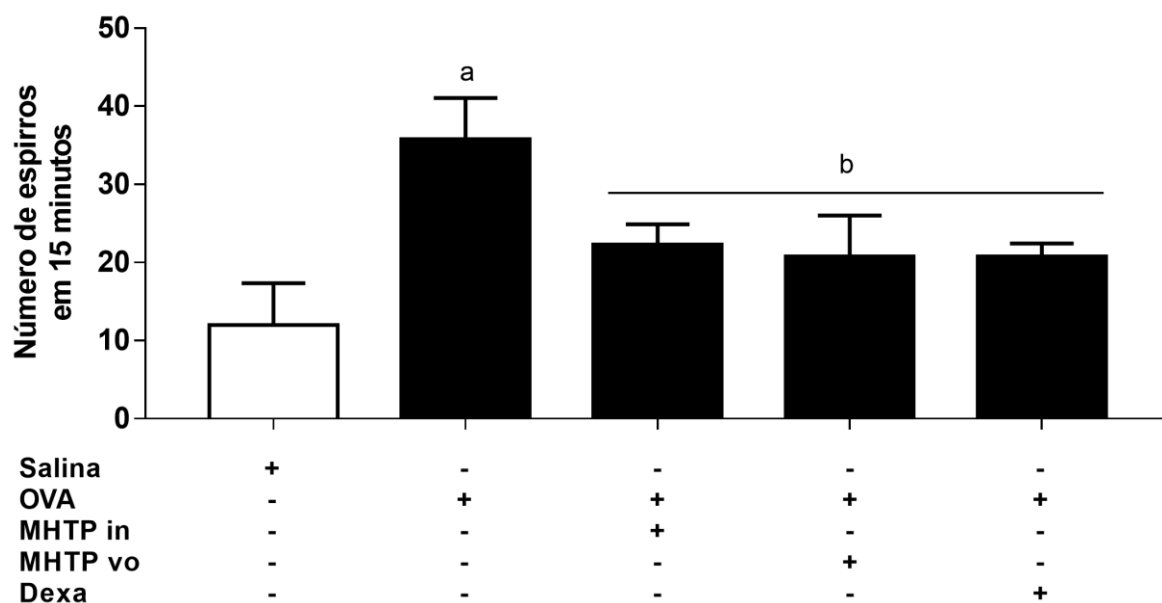
Os sinais clínicos espirros e fricção nasal, característicos do processo da rinite alérgica, foram quantificados por 15 minutos logo após o último desafio (42º dia) com solução salina ou com OVA por aerossol no protocolo experimental da CARAS.

Os animais do grupo OVA (animais doentes) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) no número dos sinais clínicos (espirros e fricção nasal) em relação ao grupo Salina (animais saudáveis) sendo o aumento dos sinais de três vezes nos espirros ( $35,8 \pm 2,66$  e  $12 \pm 2,68$ ; respectivamente) e duas vezes nas fricções nasais ( $14,8 \pm 0,48$  e  $6,5 \pm 0,87$ ; respectivamente) (Gráficos 1a e b).

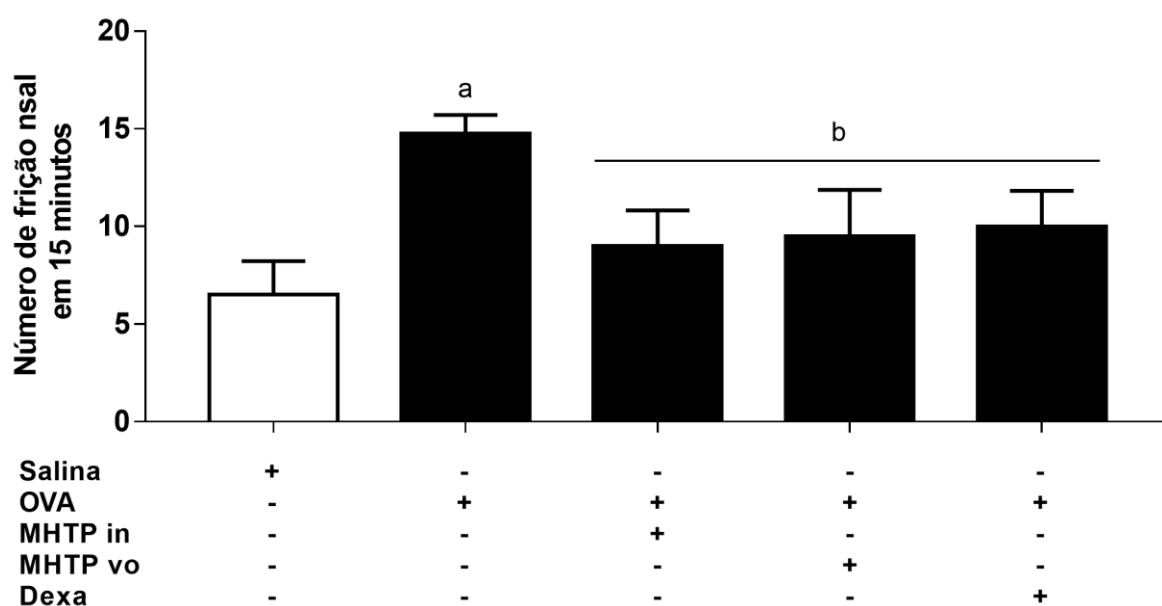
Os animais doentes tratados com o MHTP (vias intranasal (in) ou oral (vo)), ou com a Dexametasona, foram capazes de reduzir ( $p < 0,05$ ) os espirros e as fricções nasais, quando comparados aos animais do grupo OVA. Nos espirros a diminuição foi de 37,7% (MHTP in) e 41,8% (MHTP vo ou Dexametasona) (Gráfico 1a) e nas fricções nasais a diminuição foi de 39,1%, 35,8% e 32,4%, respectivamente (Gráfico 1b).

**Gráfico 1. Efeito do MHTP sobre os Sinais clínicos Nasais (espirros e fricção nasal) após o último desafio por aerossol com ovalbumina no modelo experimental de CARAS**

(a)



(b)



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último dia do desafio por aerossol (42º) do protocolo experimental da CARAS foi realizada a contagem dos sinais clínicos espirros e fricção nasal por 15 minutos imediatamente após o desafio com OVA ou solução salina. **(a)** Número de espirros e **(b)** Número de fricção nasal. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

#### **4.2. Efeito do MHTP sobre os sinais clínicos nasais (espirros e fricção nasal) durante os desafios INTRANASAL com ovalbumina no modelo experimental de CARAS**

Os sinais clínicos espirros e fricção nasal, foram quantificados por 15 min. logo após o último desafio semanal com solução salina ou com OVA por instilação nasal, ocorrendo nos 23º, 30º e 37º dias do protocolo experimental da CARAS.

Na quantificação dos espirros verificados semanalmente o grupo OVA apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Salina a partir da primeira semana de desafios intranasal e mantido nas semanas seguintes. Detectou-se a presença de espirros na primeira semana após o desafio com o alérgeno no grupo OVA em comparação com o grupo Salina ( $5,25 \pm 0,75$  e  $0 \pm 0$  respectivamente). O aumento no número de espirros foi de oito vezes maior na segunda semana ( $6,5 \pm 0,65$  e  $0,75 \pm 0,25$ , respectivamente) e de 16 vezes maior na terceira semana ( $8 \pm 1,29$  e  $0,5 \pm 0,29$ , respectivamente) de observação (Gráfico 2a). Os resultados demonstram que o número de espirros nas crises alérgicas está relacionado com a quantidade de exposições do indivíduo alérgico ao alérgeno.

Entretanto, os animais doentes e tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexametasona, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) no número de espirros em 59,3%, 43,7% e 68,7%, respectivamente, quando comparados aos animais do grupo OVA na terceira semana de avaliação (37º dia). O tratamento com Dexametasona foi capaz de reduzir os espirros na segunda semana (30º dia) de desafios com OVA em 38% ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 2a).

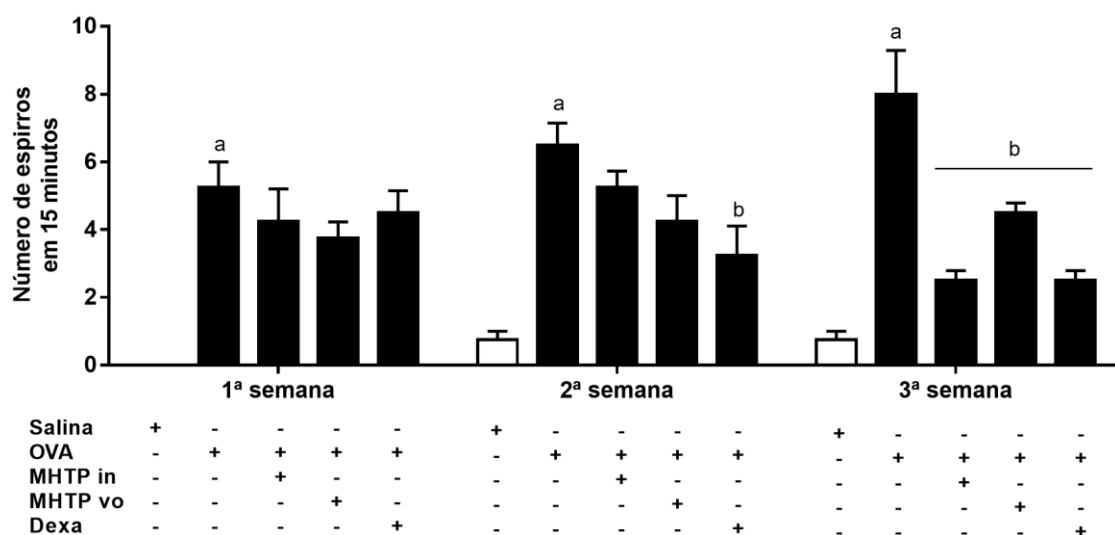
Na quantificação, semanalmente, das fricções nasais o grupo OVA apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) no número das fricções nasais em relação ao grupo Salina. Esse parâmetro foi detectado a partir da primeira semana de desafios intranasal com OVA e foi mantido nas semanas seguintes. O aumento no número das fricções nasais foi de 3 vezes nas três semanas avaliadas: primeira semana ( $4,25 \pm 0,25$  e  $1,50 \pm 0,29$ , respectivamente); segunda semana ( $5,25 \pm 0,25$  e  $1,75 \pm 0,48$  respectivamente) e terceira semana ( $6,25 \pm 0,48$  e  $2,25 \pm 0,25$ , respectivamente) (Gráfico 2b). Esses resultados indicam que a fricção nasal é um sinal clínico marcante nas crises alérgicas da rinite.

Os animais doentes e tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexametasona apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) no número de espirros na terceira semana avaliada

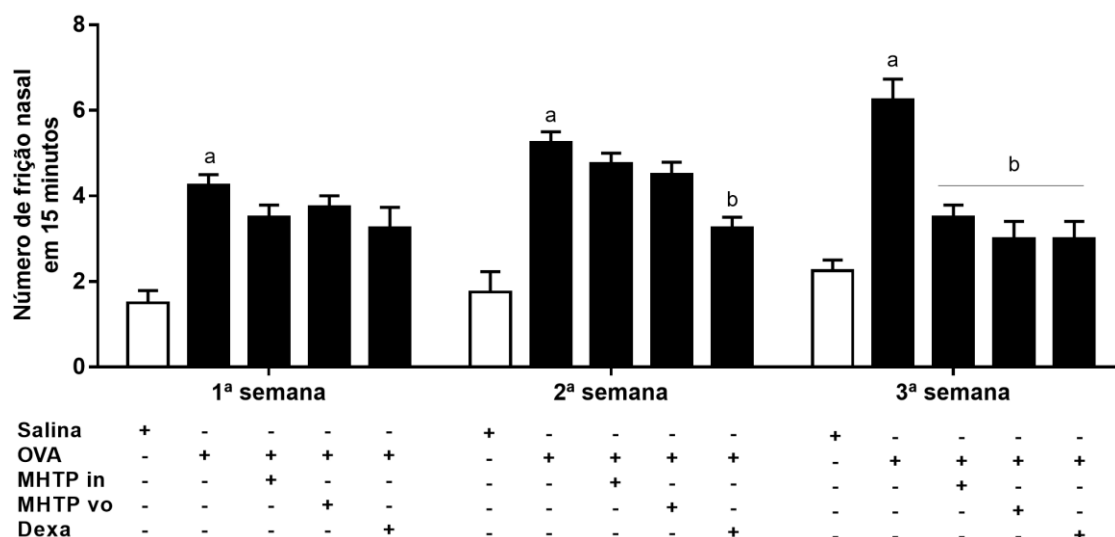
(37º dia) quando comparados aos animais do grupo OVA. O percentual de redução foi de 44% (MHTP in) e 52% (MHTP vo ou Dexa). A Dexa também foi capaz de reduzir os espirros na segunda semana (30º dia) em 38% ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 2b).

**Gráfico 2. Efeito do MHTP sobre os sinais clínicos nasais (espirros e fricção nasal) durante os desafios intranasal com ovalbumina no modelo experimental de CARAS**

(a)



(b)



Camundongos BALB/c fêmeas ( $n=6$ ) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último desafio semanal por instilação nasal, nos dias 23º, 30º e 37º do protocolo experimental da CARAS foi realizada a contagem dos sinais clínicos espirros e fricção nasal por 15 minutos imediatamente após o desafio com OVA ou solução salina. **(a)** Número de espirros e **(b)** Número de fricção nasal. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

#### **4.3. Efeito do MHTP sobre a reatividade nasal induzida por histamina após o último desafio INTRANASAL com ovalbumina no modelo experimental de CARAS**

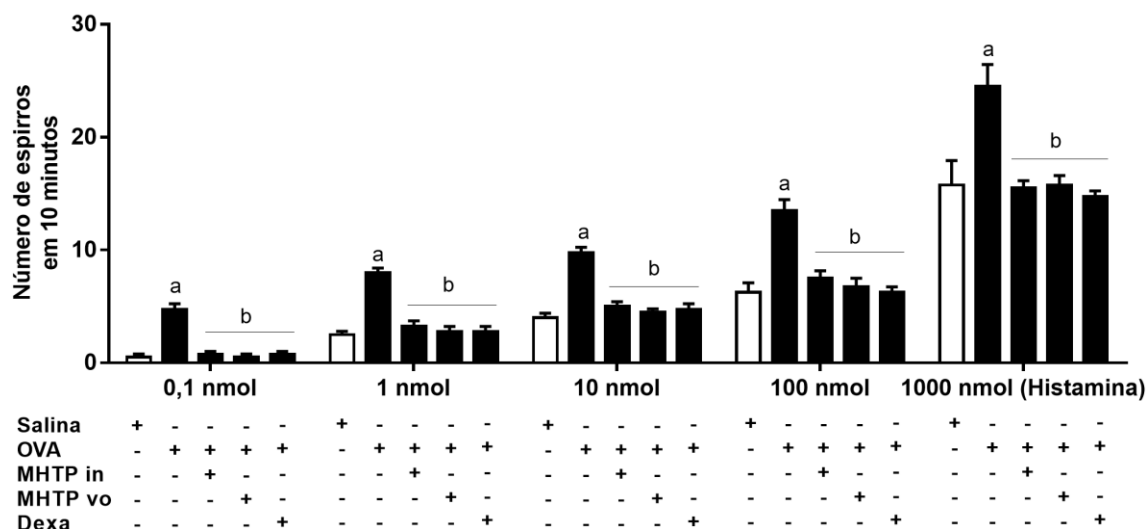
A reatividade nasal induzida por histamina foi realizada no 37º dia do protocolo experimental de CARAS, uma hora após o desafio por instilação nasal com salina ou com OVA. A contagem dos sinais clínicos espirros e fricção nasal foram realizadas, por 10 min. após instilações nasais com doses crescentes de histamina exógena, totalizando cinco instilações com uma hora de intervalo entre as sucessivas doses (0,1; 1; 10; 100 e 1000 nmol/histamina).

Em ambos os sinais clínicos, espirros e fricção nasal, observou-se que o desafio com OVA no grupo OVA (animais doentes) promoveu aumento ( $p < 0,05$ ) dos sinais clínicos após a instilação nasal com a menor dose de histamina (0,1 nmol) em comparação com o grupo Salina (animais saudáveis). O aumento no número de espirros foi de nove vezes ( $4,75 \pm 0,48$  e  $0,5 \pm 0,29$ , respectivamente) e nas fricções nasais foi de três vezes ( $4,75 \pm 0,48$  e  $1,5 \pm 0,29$ , respectivamente) (Gráficos 3a, b), respectivamente. Esses resultados inferem que a OVA promove uma hiperatividade nasal em animais alérgicos.

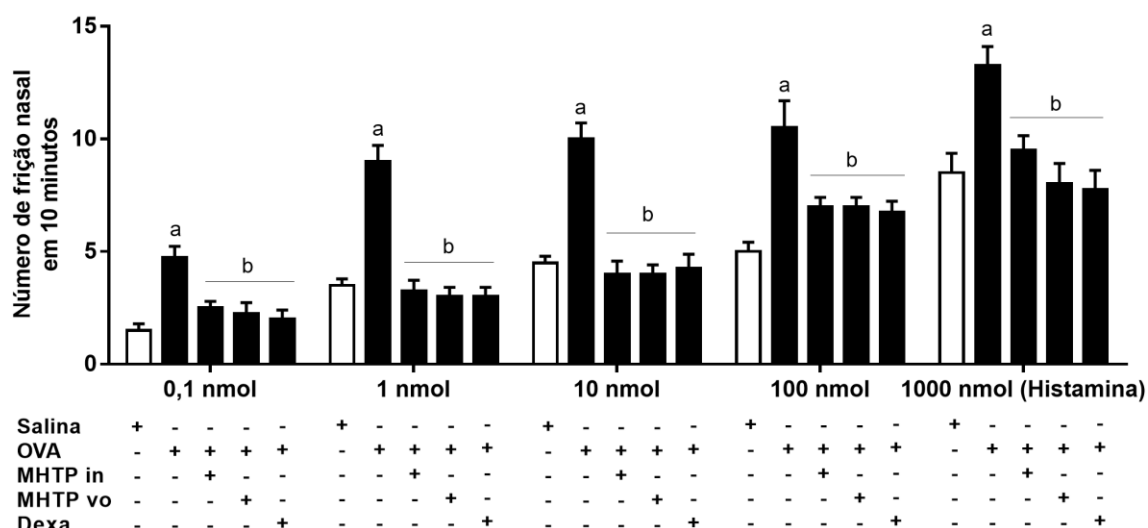
Os animais doentes e tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexa, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) em ambos os sinais clínicos após a instilação nasal com a menor dose de histamina (0,1 nmol) quando comparados aos animais do grupo OVA. Nos espirros os percentuais de redução foram de 84,2%, 89,4% e 84,2% respectivamente e nas fricções nasais de 47,3%, 52,6% e 57,8% respectivamente (Gráficos 3a, b).

**Gráfico 3. Efeito do MHTP sobre a reatividade nasal induzida por histamina após o último desafio intranasal com ovalbumina no modelo experimental de CARAS**

(a)



(b)



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último desafio por instilação nasal (37°) do protocolo experimental da CARAS, 1 hora após o desafio com OVA ou solução salina foi realizada a Reatividade Nasal induzida por Histamina, em intervalos de 1 hora foi instilado doses crescentes de histamina (0,1; 1; 10; 100 e 1000 nmol/histamina) nos animais e a contagem dos sinais clínicos espirros e fricção nasal foi realizada por 10 minutos. **(a)** Número de espirros e **(b)** Número de fricção nasal. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

#### **4.4. Efeito do MHTP na migração de células inflamatórias totais, leucócitos diferenciais e porcentagem de eosinófilos no Fluido do Lavado Nasal (NALF), no modelo experimental de CARAS**

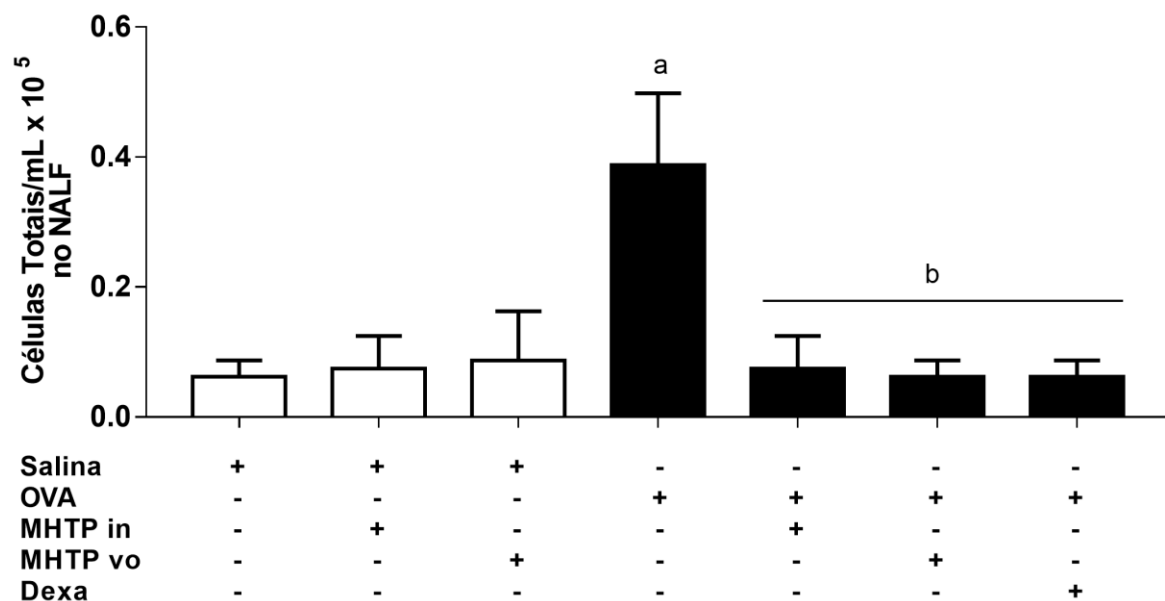
O perfil celular no NALF está expresso nos Gráficos 4(a) - células totais ( $10^5/\text{mL}$ ), 4(b) - células diferenciais ( $10^5/\text{mL}$ ) e 4(c) - porcentagem de eosinófilos. Os animais saudáveis tratados com MHTP (vias in ou vo) não apresentaram migração de células inflamatórias (macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos) para o NALF quando comparados com os animais do grupo Salina.

Os animais doentes (grupo OVA), quando comparados aos do grupo Salina, apresentaram um aumento ( $p < 0,05$ ), de seis vezes, na migração de células inflamatórias totais ( $0,39 \pm 0,06$  e  $0,06 \pm 0,01$ , respectivamente). Como também aumentou as populações de linfócitos ( $0,048 \pm 0,009$  e  $0,008 \pm 0,002$ , respectivamente); de neutrófilos ( $0,0268 \pm 0,0008$  e  $0,0001 \pm 0,0001$ , respectivamente); de eosinófilos ( $0,234 \pm 0,0327$  e  $0 \pm 0$ , respectivamente). O grupo OVA apresentou 58% de eosinófilos no NALF quando comparado ao grupo Salina ( $58 \pm 2,74$  e  $0 \pm 0$ ;  $p < 0,05$ ).

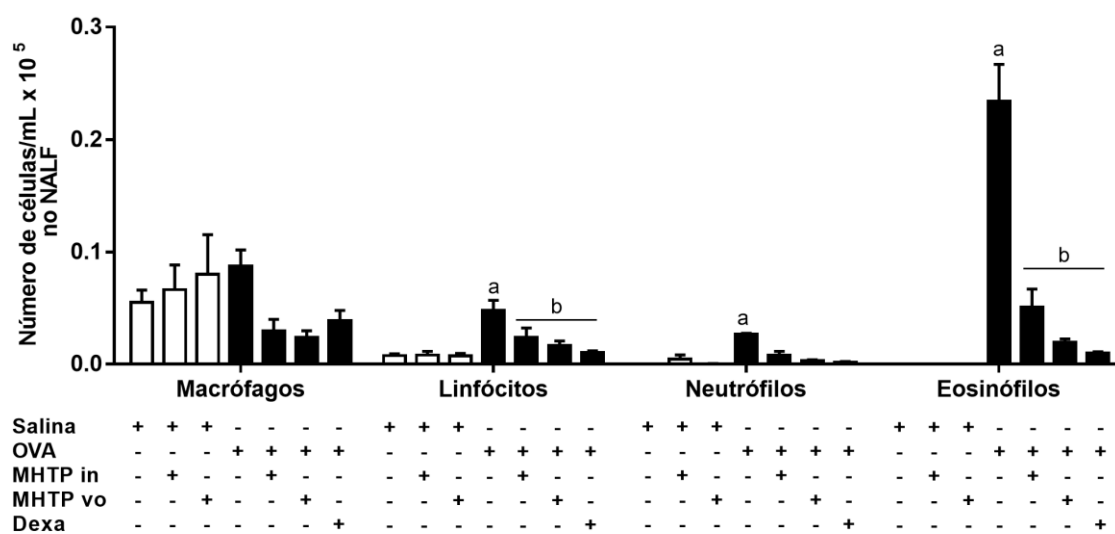
Os animais doentes e tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexametasona (Dexa), apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) na migração de células inflamatórias totais (79,8% com MHTP in e 84,6% com MHTP vo ou Dexa); nas populações de linfócitos (50%, 64,5% e 71,1%, respectivamente) e de eosinófilos (78,4%, 91,7% e 95,7% respectivamente). Os percentuais de redução de eosinófilos nos animais dos grupos MHTP (in ou vo) e Dexa foram de 21%, 44,8% e 70,1% respectivamente no NALF quando comparados aos animais do grupo OVA.

Gráfico 4. Efeito do MHTP na migração de células totais, leucócitos diferenciais e porcentagem de eosinófilos no fluido do lavado nasal (NALF), no modelo experimental de CARAS

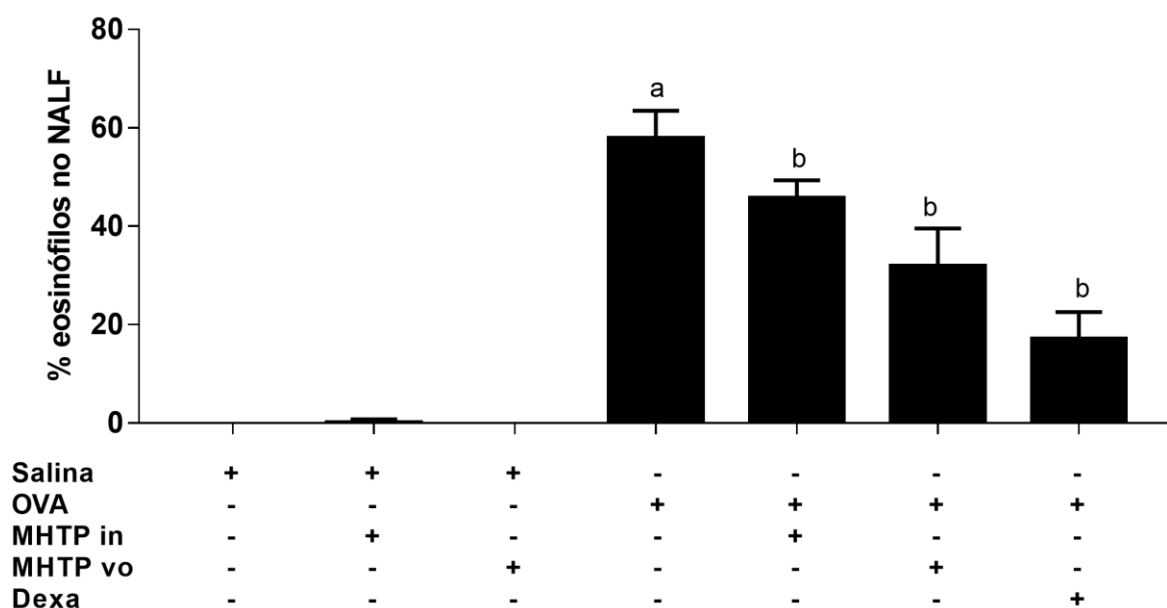
(a)



(b)



(c)



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio ou tratados com MHTP pelas duas vias de administração e desafiados com solução salina. No último dia do protocolo experimental da CARAS foi coletado o Fluido do Lavado Nasal (NALF), uma alíquota foi adicionada a solução de Turk, para contagem das células totais. Após centrifugação o *pellet* foi ressuspensão e citocentrifugado, corado pelo método de panótico, para contagem diferencial das populações celulares. **(a)** Células Totais, **(b)** Células diferenciais: Macrófagos, Linfócitos, Neutrófilos e Eosinófilos e **(c)** Porcentagem de Eosinófilos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

#### **4.5. Efeito do MHTP na migração de células totais, leucócitos diferenciais e porcentagem de eosinófilos no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF), no modelo experimental de CARAS**

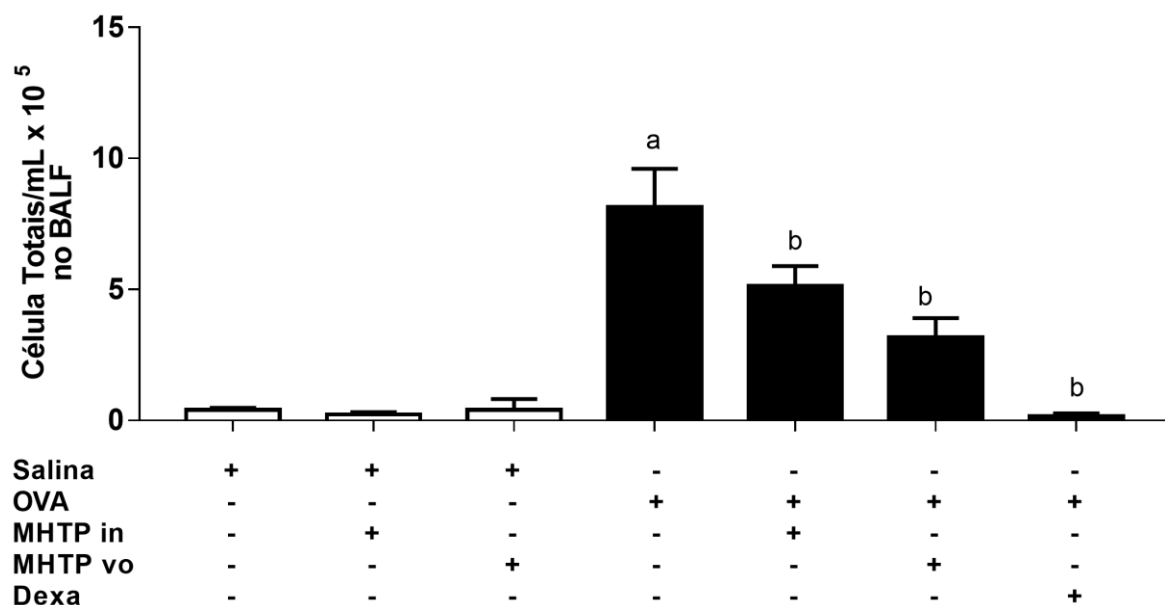
O perfil celular no BALF está expresso nos Gráficos 5(a) - células totais ( $10^5/\text{mL}$ ), 5(b) - células diferenciais ( $10^5/\text{mL}$ ) e 5(c) - porcentagem de eosinófilos. O tratamento de animais saudáveis com o MHTP (vias in ou vo) não promoveu a migração de células inflamatórias (macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos) para o BALF quando comparado com os animais do grupo Salina.

Os animais do grupo OVA, quando comparados aos do grupo Salina, apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ), de 20 vezes, na migração de células totais ( $8,15 \pm 0,73$  e  $0,4 \pm 0,04$ ); apresentou também um aumento de macrófagos ( $1,83 \pm 0,34$  e  $0,2 \pm 0,03$ ); de linfócitos ( $1,55 \pm 0,23$  e  $0,18 \pm 0,03$ ); de eosinófilos ( $4,19 \pm 0,379$  e  $0 \pm 0$ ); ( $p < 0,05$ ). O grupo OVA apresentou 54,3% de eosinófilos no BALF quando comparado ao grupo Salina ( $54,3 \pm 3,28$  e  $0 \pm 0$ ;  $p < 0,05$ ).

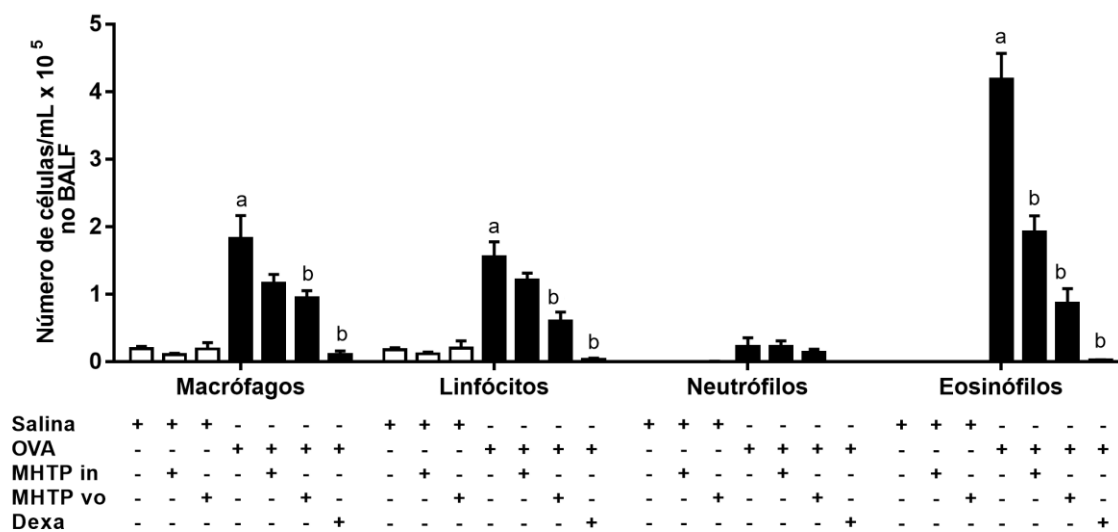
Os animais doentes tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexametasona, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) na migração de células inflamatórias totais (37%, 60,9% e 97,4% respectivamente); de eosinófilos (54,1%, 79,3% e 99,4% respectivamente), e a porcentagem de eosinófilos no BALF foi de 21,7%, 39,5% e 73,2% respectivamente, quando comparados aos animais do grupo OVA. Em adição, apenas os animais doentes tratados por via oral com o MHTP ou Dexametasona apresentaram redução dos macrófagos em 48% e 93,9% ( $p < 0,05$ ) respectivamente e dos linfócitos em 60,6% e 97,4% ( $p < 0,05$ ) respectivamente, quando comparados aos animais do grupo OVA.

Gráfico 5. Efeito do MHTP na migração de células totais, leucócitos diferenciais e porcentagem de eosinófilos no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF), no modelo experimental de CARAS

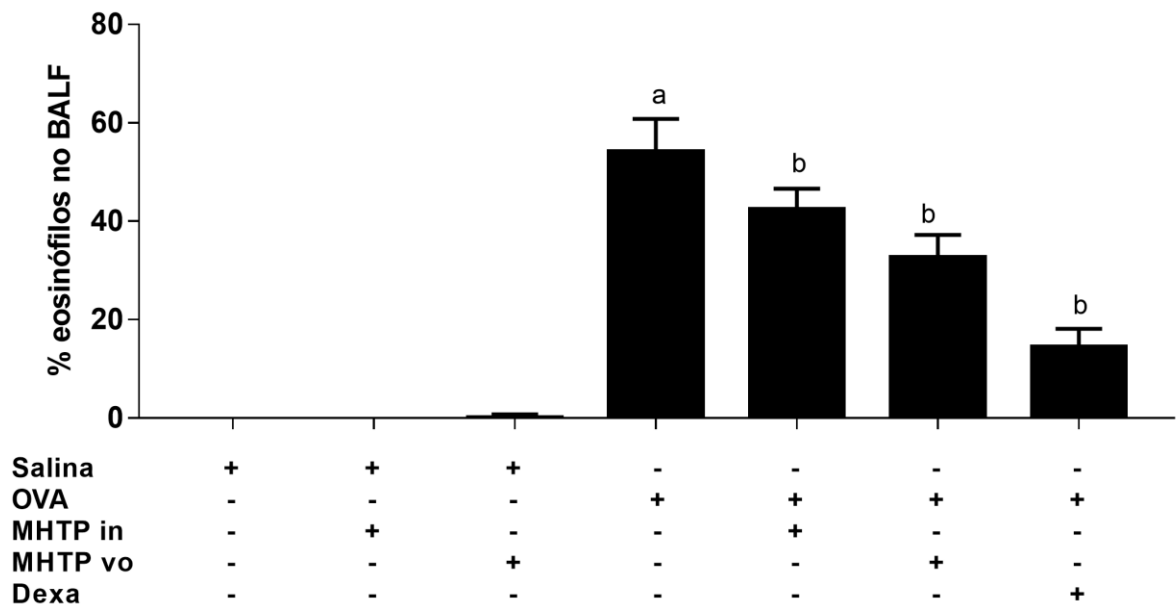
(a)



(b)



(c)



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio ou tratados com MHTP pelas duas vias de administração e desafiados com solução salina. No último dia do protocolo experimental da CARAS foi coletado o Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF), uma alíquota foi adicionada a solução de Turk, para contagem das células totais. Após centrifugação o *pellet* foi ressuspenso e citocentrifugado, corado pelo método de panótico, para contagem diferencial das populações celulares. **(a)** Células Totais, **(b)** Células diferenciais: Macrófagos, Linfócitos, Neutrófilos e Eosinófilos e **(c)** Porcentagem de Eosinófilos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

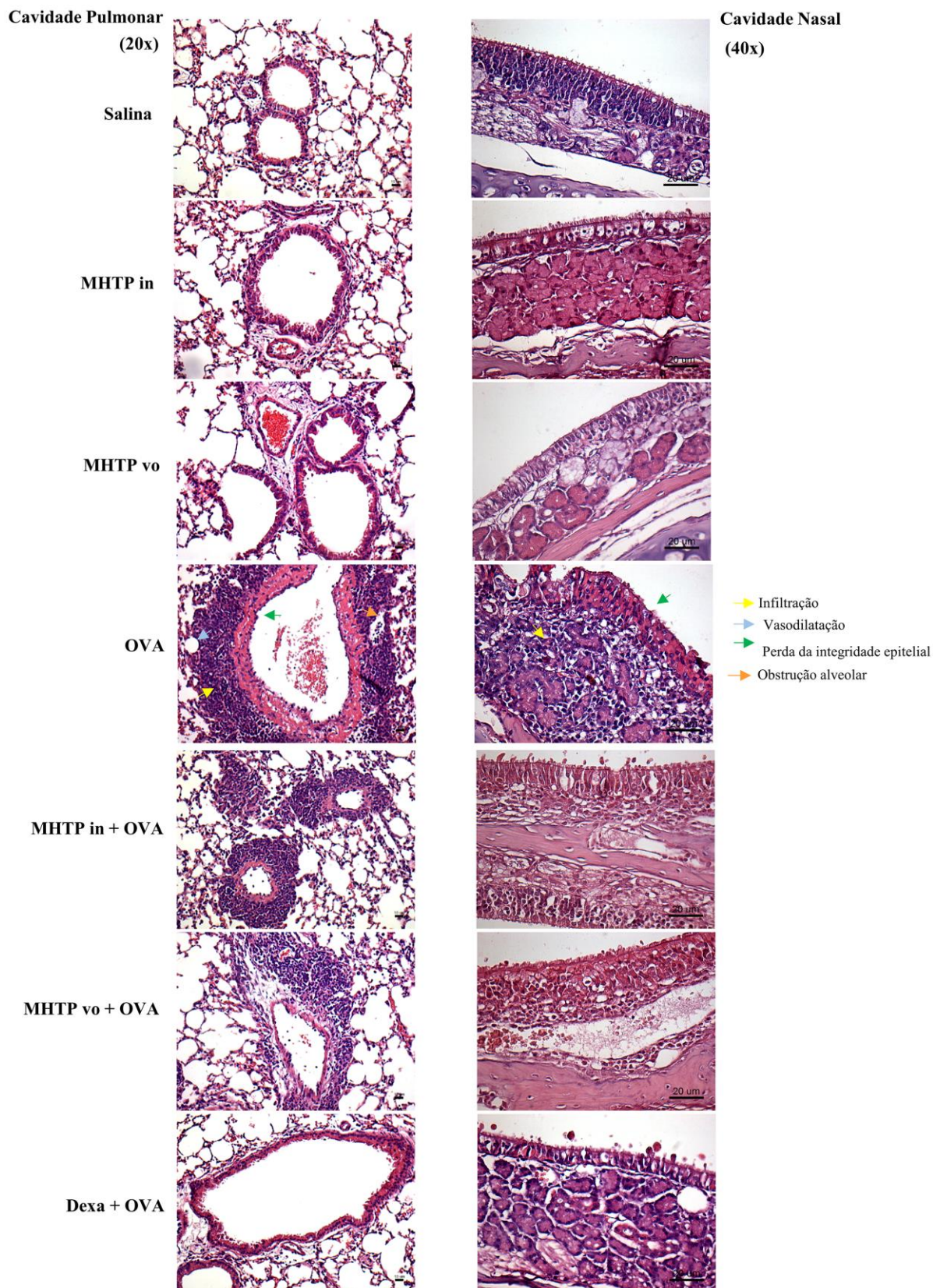
#### **4.6. Efeito do MHTP sobre os aspectos histopatológicos nos tecidos nasal e pulmonar, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Hematoxilina & Eosina (HE)**

Os aspectos histológicos das regiões nasal e pulmonar dos animais dos grupos experimentais estão demonstrados no Pannel 1, o score inflamatório nos Gráficos 6(a) e 6(b) respectivamente, assim como a contagem de eosinófilos nos tecidos nasal está representada no Gráfico 6(c) e pulmonar no Gráfico 6(d). O tratamento com o MHTP (vias in ou vo), em animais saudáveis não promoveu processos inflamatórios nos tecidos nasal e pulmonar quando comparados com os animais do grupo Salina.

A sensibilização e os desafios com OVA (grupo OVA) promoveram, no tecido nasal, intensa infiltração celular (seta amarela) e perda da integridade epitelial nasal (seta verde). No tecido pulmonar dos animais do grupo OVA observou-se intensa infiltração celular (seta amarela), perda da integridade epitelial bronquiolar (seta verde), obstrução alveolar (seta laranja) e vasodilatação (seta azul). No score inflamatório dos tecidos nasal e pulmonar quantificou-se um intenso processo inflamatório nos animais do grupo OVA quando comparados aos do grupo Salina, com aumento de 10 vezes no tecido nasal ( $2,08 \pm 0,193$  e  $0,195 \pm 0,0337$ ;  $p < 0,05$ ) e de 6 vezes no tecido pulmonar ( $6,6 \pm 0,245$  e  $1 \pm 0$ ;  $p < 0,05$ ). Em relação ao número de eosinófilos, pode-se observar que o grupo OVA apresentou um aumento de 64 vezes no tecido nasal ( $48 \pm 1,68$  e  $0,750 \pm 0,250$ ;  $p < 0,05$ ) e de 33 vezes no tecido pulmonar ( $101 \pm 6,67$  e  $3 \pm 0,707$ ;  $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo Salina. Esses resultados inferem a presença marcante dos eosinófilos no processo inflamatório da CARAS.

Os animais doentes tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexametasona, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros inflamatórios nos tecidos nasal e pulmonar quando comparados aos animais não tratados (grupo OVA). A redução do score inflamatório no tecido nasal foi de 43,7%, 54,5% e 94,7% ( $p < 0,05$ ) respectivamente. No tecido pulmonar a redução do score inflamatório foi de 18,1%, 48,4% e 75,7% ( $p < 0,05$ ) respectivamente. A migração de eosinófilos para o tecido nasal foi reduzida ( $p < 0,05$ ) em 86,9%, 89% e 89,5% respectivamente e para o tecido pulmonar a redução ( $p < 0,05$ ) foi de 5,6%, 72,2% e 75,2% respectivamente.

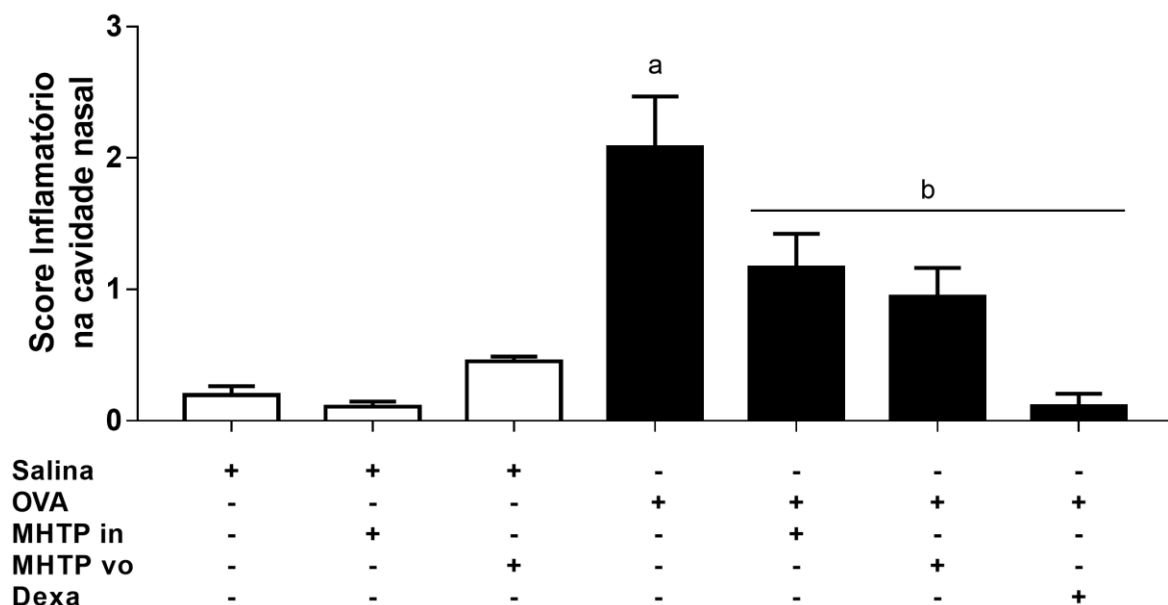
**Painel 1. Efeito do MHTP sobre os aspectos histopatológicos das cavidades nasal e pulmonar, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Hematoxilina & Eosina (HE)**



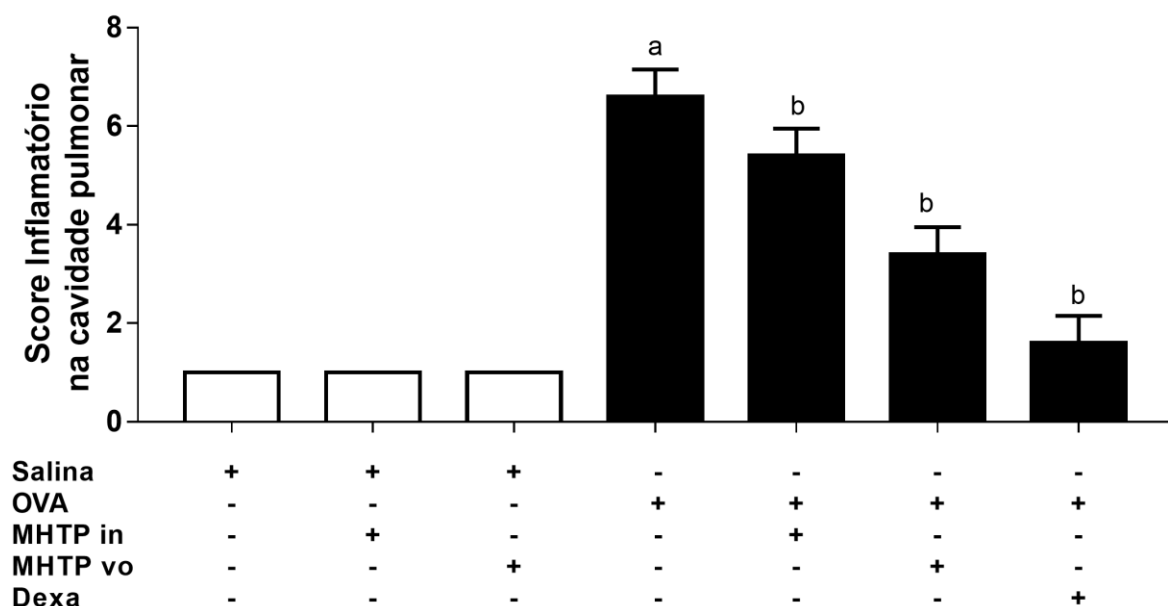
Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio ou tratados com MHTP pelas duas vias de administração e desafiados com solução salina. No último dia do protocolo experimental da CARAS foram coletados a cabeça para as análises histológicas da cavidade nasal e do pulmão. Após os órgãos serem submetidos a protocolos de descalcificação, desidratação e inclusão em parafina, os cortes aderidos em lâminas foram corados com Hematoxilina & Eosina (HE). No **painel 1** pode-se observar os seguintes parâmetros inflamatórios: vasodilatação (seta azul); perda da integridade epitelial bronquiolar ou nasal (seta verde); obstrução alveolar (seta laranja) e infiltração celular perivascular e peribronquiolares (pulmão) ou nasal (seta amarela).

**Gráfico 6. Efeito do MHTP sobre os aspectos histopatológicos das cavidades nasal e pulmonar, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Hematoxilina & Eosina (HE)**

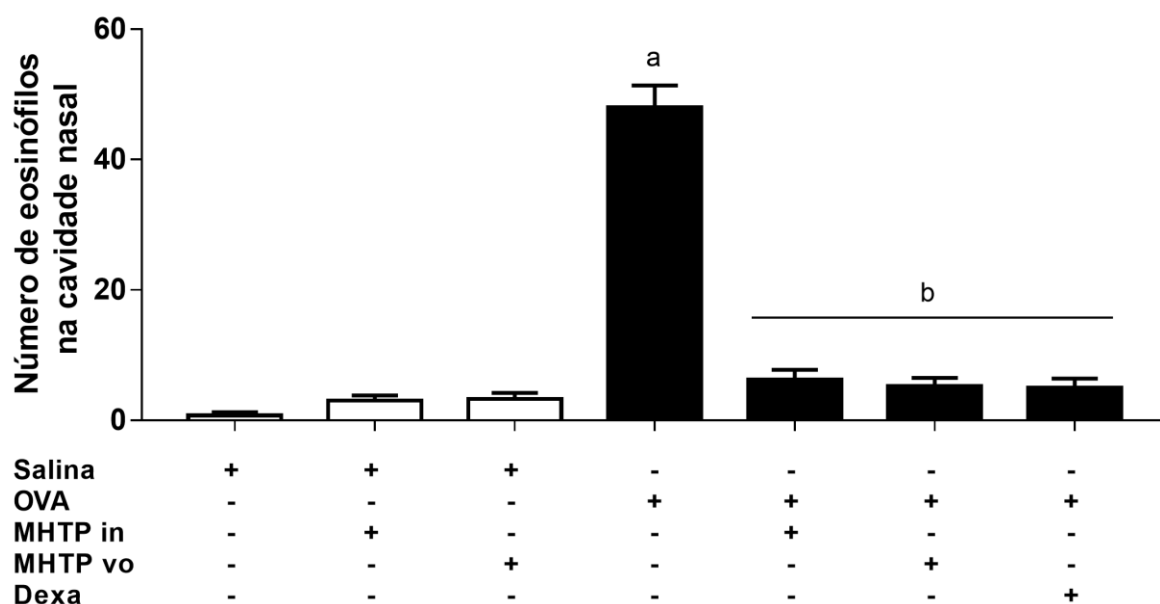
(a)



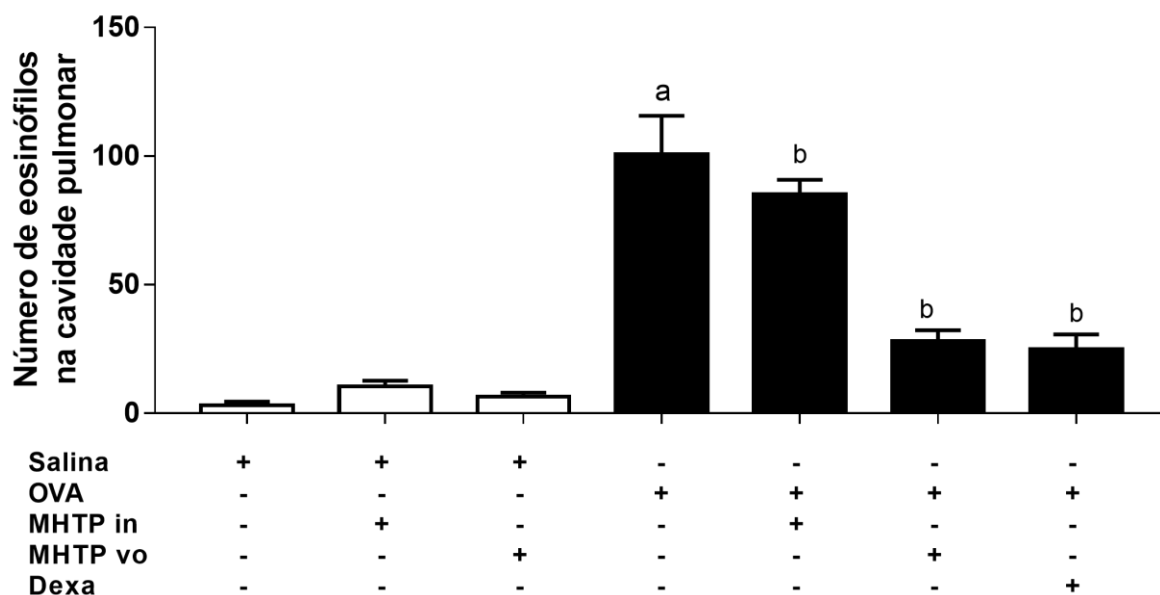
(b)



(c)



(d)



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram submetidos ao protocolo de CARAS. No 43<sup>a</sup> dia foram coletados a cabeça e o pulmão para as análises histológicas. Após os órgãos serem submetidos a protocolos de descalcificação, desidratação e inclusão em parafina, os cortes foram corados com Hematoxilina & Eosina (HE), foi realizado o score inflamatório, onde se foi pontuado os seguintes parâmetros: vasodilatação (presente [1] ou ausente [0]); manutenção da integridade epitelial bronquiolar ou nasal (presente [1] ou ausente [0]); obstrução alveolar ou nasal (presente [1] ou ausente [0]) e, para a migração celular foi utilizado as seguintes pontuações: zero (0) significa ausência de migração, (1) poucas células de 0 a 9 células por campo, (2) mais de 10 células por campo e (3) formação dos anéis celulares perivasculares e peribronquiolares (pulmão) ou acima de 20 células por campo na cavidade nasal (PAIVA FERREIRA et al., 2018). **(a)** Score inflamatório na cavidade nasal, **(b)** Score inflamatório na cavidade pulmonar, **(c)** Eosinófilos na cavidade nasal e **(d)** Eosinófilos na cavidade pulmonar. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

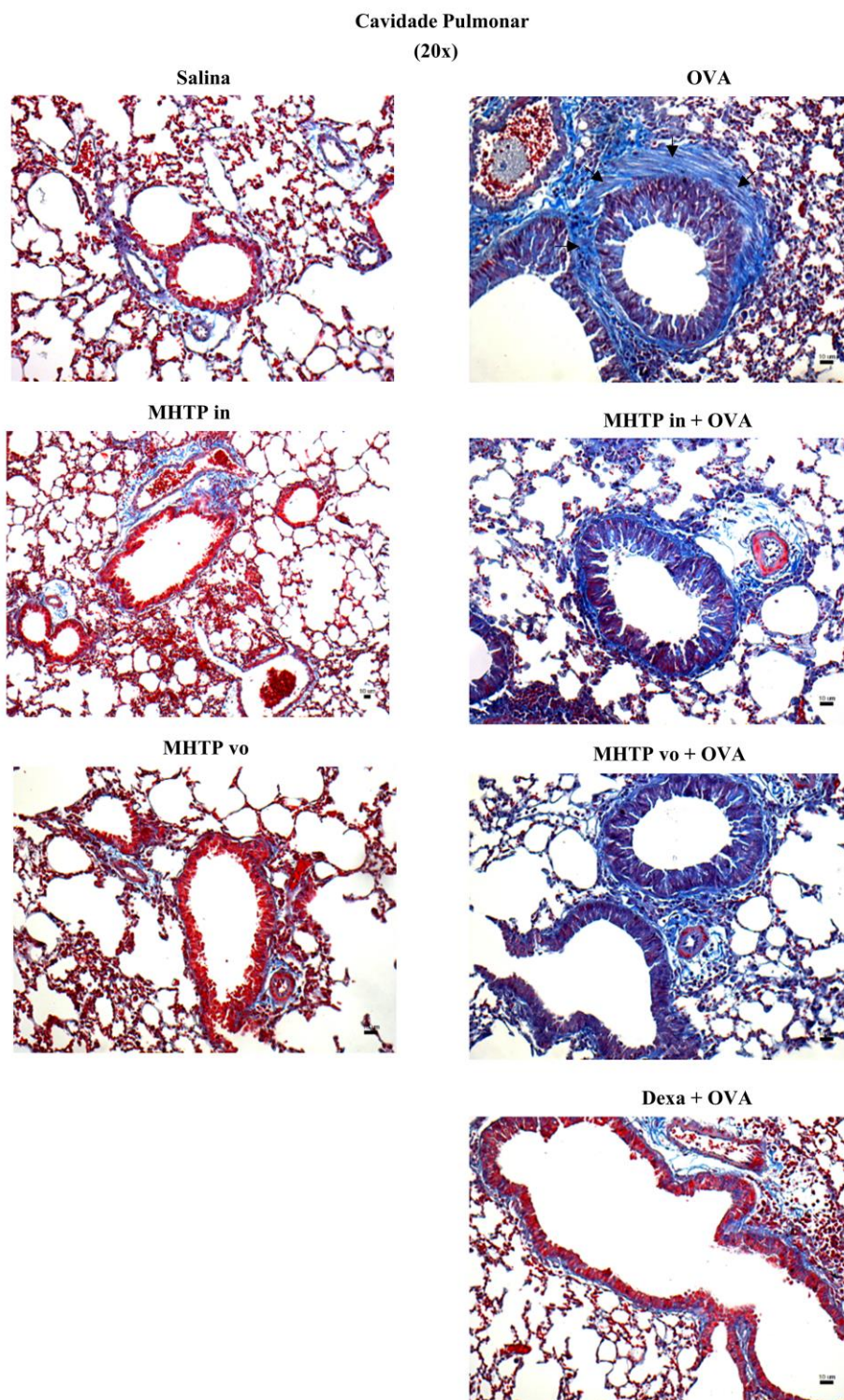
#### **4.7. Efeito do MHTP sobre a Hiperatividade Brônquica (AHR) e Remodelamento Pulmonar, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Tricomio de Masson (TM)**

A quantificação da musculatura lisa bronquiolar estão demonstrados no Painel 2 e no Gráfico 7(a). O tratamento com o MHTP pelas duas vias (in ou vo) em animais saudáveis não alterou a área correspondente a musculatura lisa bronquiolar basal quando comparado com os animais do grupo Salina.

Os animais doentes (grupo OVA) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) da área muscular lisa bronquiolar de 98 vezes quando comparados com os do grupo Salina ( $27,2 \pm 0,97$  e  $0,276 \pm 0,0103$  respectivamente), indicando um processo de hiperplasia e/ou hipertrofia muscular com consequente hiperatividade das vias aéreas nos animais do grupo OVA. Os animais doentes tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexametasona, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) da área muscular lisa bronquiolar em 16,1%, 78,7% e 81,4% respectivamente, quando comparados aos animais do grupo OVA.

A quantificação da MEC está demonstrada no Painel 2 e no Gráfico 7(b). O tratamento com o MHTP pelas duas vias (in ou vo) em animais saudáveis não induziu alterações na MEC pulmonar quando se comparados aos animais do grupo Salina. Os animais doentes (grupo OVA) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) da MEC pulmonar de 32 vezes quando comparados aos do grupo Salina ( $6003 \pm 212$  e  $184 \pm 18,2$  respectivamente) indicando um processo de fibrose e remodelamento tecidual pulmonar visualizado pela seta preta no Painel 2 e no Gráfico 7(b). Os animais doentes e tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexametasona, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) da MEC pulmonar em 18,1%, 51,2% e 67,2% respectivamente, quando comparados aos do grupo OVA.

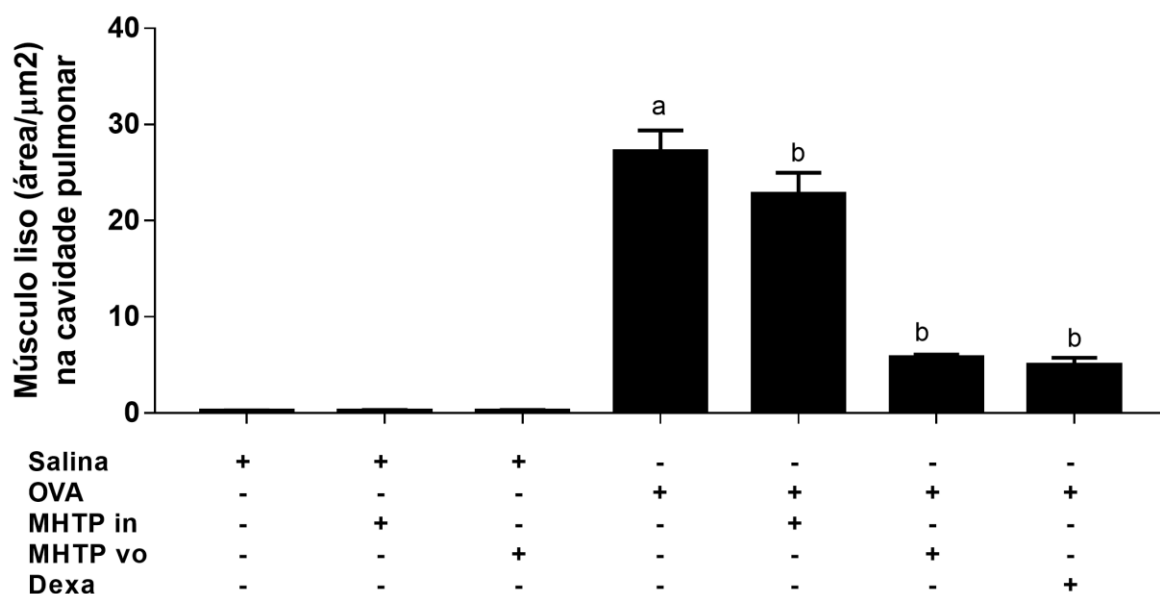
**Painel 2. Efeito do MHTP sobre Hiperatividade Brônquica (AHR) e Remodelamento Pulmonar, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Tricômio de Masson (TM)**



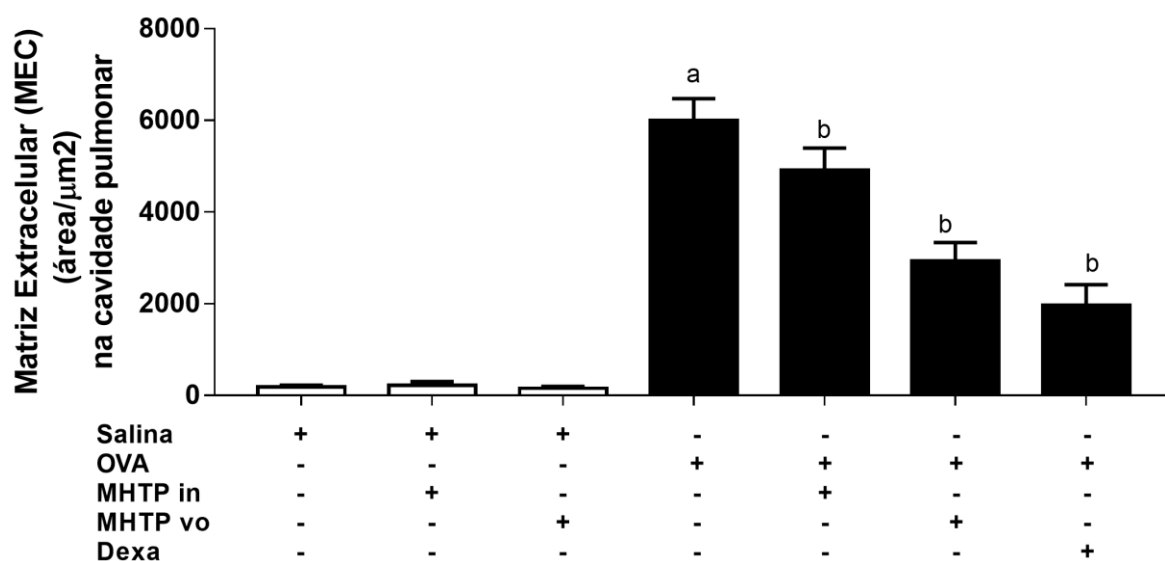
Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio ou tratados com MHTP pelas duas vias de administração e desafiados com solução salina. No último dia do protocolo experimental da CARAS os pulmões dos animais foram avaliados de acordo com os parâmetros histopatológicos observados. Após o órgão ser submetido a protocolos de desidratação e inclusão em parafina, os cortes aderidos em lâminas foram corados com Tricômio de Masson (TM). No **painel 2** o aumento da Matriz Extracelular (ECM) pode ser observado pela seta preta.

Gráfico 7. Efeito do MHTP sobre Hiperatividade Brônquica (AHR) e Remodelamento Pulmonar, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Tricômio de Masson (TM)

(a)



(b)



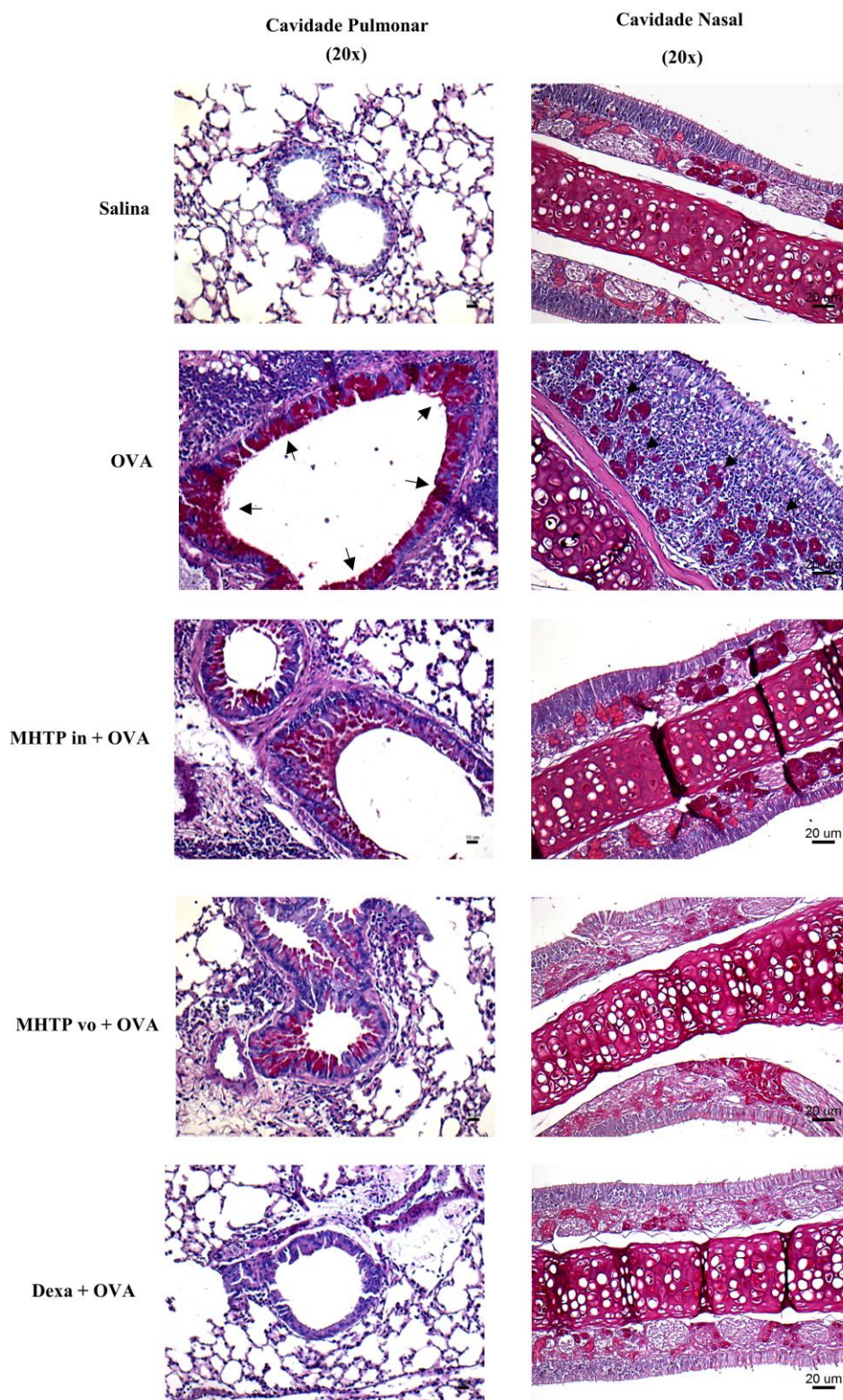
Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio ou tratados com MHTP pelas duas vias de administração e desafiados com solução salina. No último dia do protocolo experimental da CARAS os pulmões foram avaliados de acordo com os parâmetros histopatológicos observados. Após o órgão ser submetido a protocolos de desidratação e inclusão em parafina, os cortes aderidos em lâminas foram corados com Tricômio de Masson (TM), e foi quantificado a camada de musculo liso pulmonar bem como a Matriz Extracelular (ECM), envolvidos na hiperatividade brônquica (AHR) e Remodelamento tecidual respectivamente (PRATA et al., 2017). **(a)** Músculo liso na cavidade pulmonar e **(b)** Matriz Extracelular (ECM) na cavidade pulmonar. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

**4.8. Efeito do MHTP sobre a produção de muco pelas células caliciformes presentes nas cavidades nasal e pulmonar, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Ácido Periódico – Schiff (PAS)**

A produção de muco pelas células caliciformes das vias aéreas superior (cavidade nasal) e inferior (pulmão) foi analisada a partir da quantificação de muco. Os resultados estão demonstrados no Painel 3 e nos Gráficos 8 (a) e 8(b), respectivamente. Os animais do grupo OVA apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) na produção de muco pelas células caliciformes de 10 vezes no tecido nasal quando comparados com os animais do grupo Salina, ( $1185 \pm 95,2$  e  $112 \pm 11,3$  respectivamente) e de 60 vezes na cavidade pulmonar ( $5410 \pm 23,6$  e  $90,2 \pm 23,8$  respectivamente) indicando um processo de hiperplasia e/ou hipertrofia das células caliciformes com consequente hiperprodução de muco. O muco está demonstrado pela seta preta no Painel 3 e nos Gráficos 8 (a) e 8(b), respectivamente.

Os animais doentes tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexametasona, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) de muco pelas células caliciformes em ambos os tecidos nasal (90,1%, 89,7% e 89,5%, respectivamente) e pulmonar (42,1%, 77,8% e 98,2%, respectivamente) quando comparados aos animais do grupo OVA.

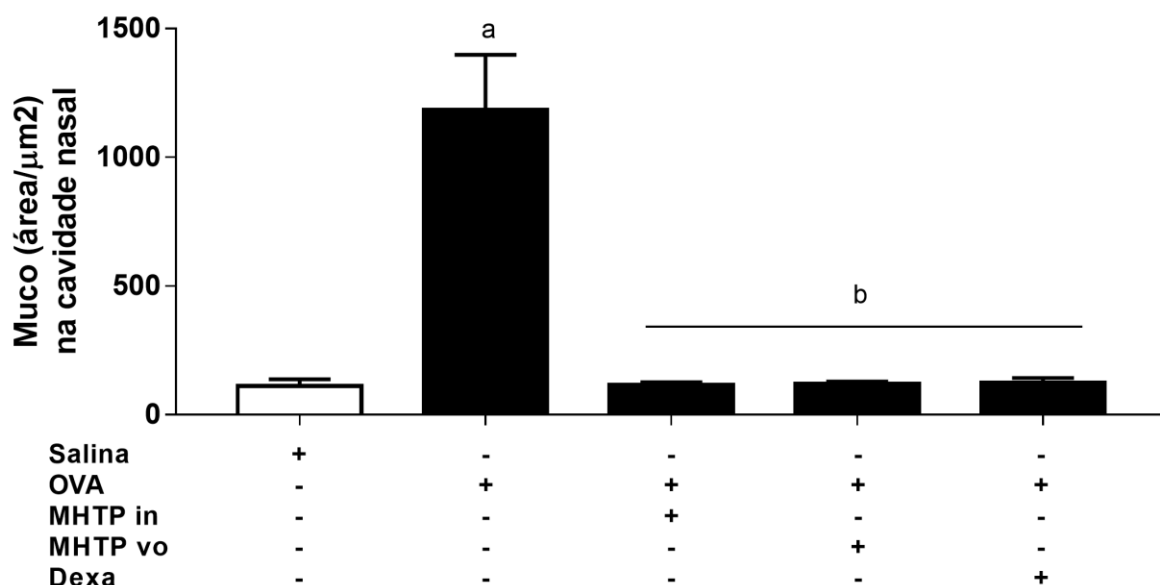
**Painel 3. Efeito do MHTP sobre a produção de muco pelas células caliciformes das vias aéreas, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Ácido Periódico – Schiff (PAS)**



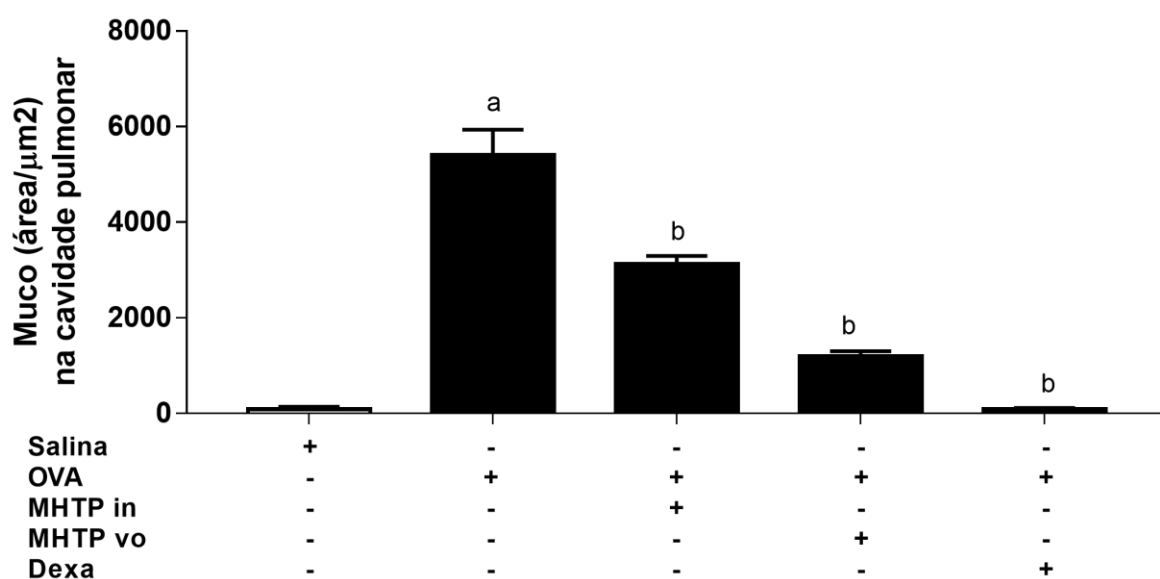
Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último dia do protocolo experimental da CARAS foram coletados a cabeça para retirada da cavidade nasal e o pulmão dos animais para a avaliação histopatológica. Após os órgãos serem submetidos a protocolos de descalcificação, desidratação e inclusão em parafina, os cortes aderidos em lâminas foram corados com Ácido Periódico – Schiff (PAS). No **painel 3** o muco (hiperplasia e/ou hipertrofia das células caliciformes) pode ser observado pela seta preta.

Gráfico 8. Efeito do MHTP sobre a produção de muco pelas células caliciformes das vias aéreas, no modelo experimental de CARAS, com a coloração de Ácido Periódico – Schiff (PAS)

(a)



(b)



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último dia do protocolo experimental da CARAS foram coletados a cabeça para retirada da cavidade nasal e o pulmão dos animais para a avaliação histopatológica. Após os órgãos serem submetidos a protocolos de descalcificação, desidratação e inclusão em parafina, os cortes aderidos em lâminas foram corados com Ácido Periódico – Schiff (PAS), e foi quantificado o muco produzido pelas células caliciformes das vias aéreas (PRATA et al., 2017). **(a)** Muco na cavidade nasal e **(b)** Muco na cavidade pulmonar. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

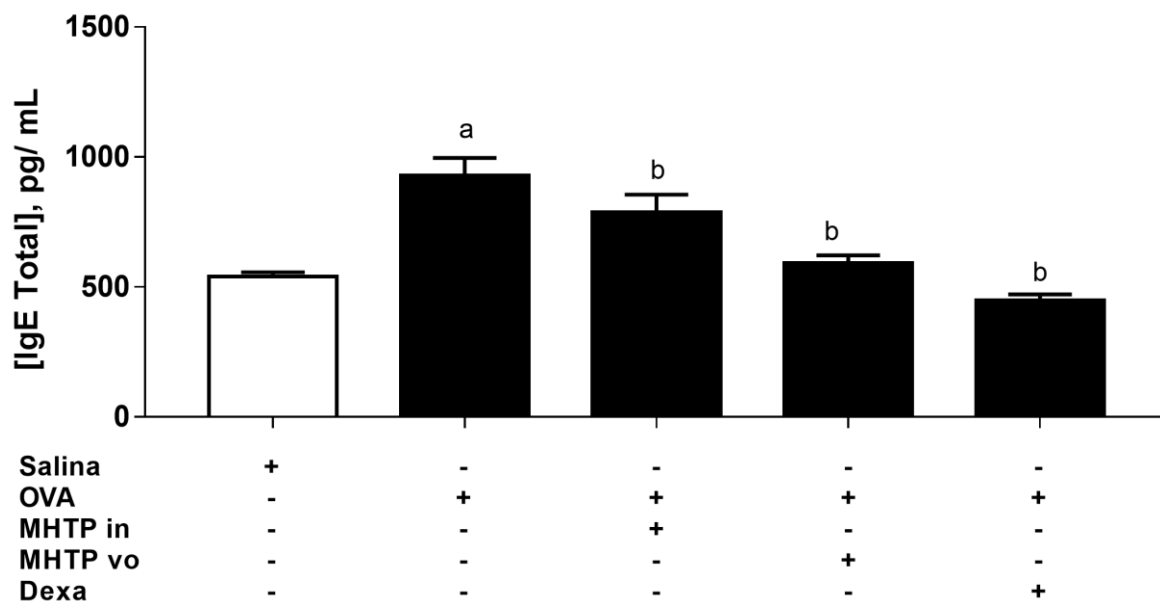
#### **4.9. Efeito do MHTP sobre a produção de IgE total e OVA-específica, no modelo experimental de CARAS**

As quantificações de IgE total (pg/mL) e IgE OVA-específica (pg/mL) estão demonstradas nos Gráficos 9 (a) e 9(b), respectivamente. Os animais doentes (grupo OVA) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) de IgE total quando comparados com os do grupo Salina ( $928 \pm 34,4$  e  $540 \pm 8,20$ , respectivamente), bem como de IgE OVA-específica ( $398 \pm 35,3$  e  $0 \pm 0$  respectivamente). Os resultados inferem a relação do aumento nos níveis de IgE total equivalentes a presença da IgE OVA-específica nos animais alérgicos, uma vez que os animais do grupo Salina não produziram IgE alérgico específica.

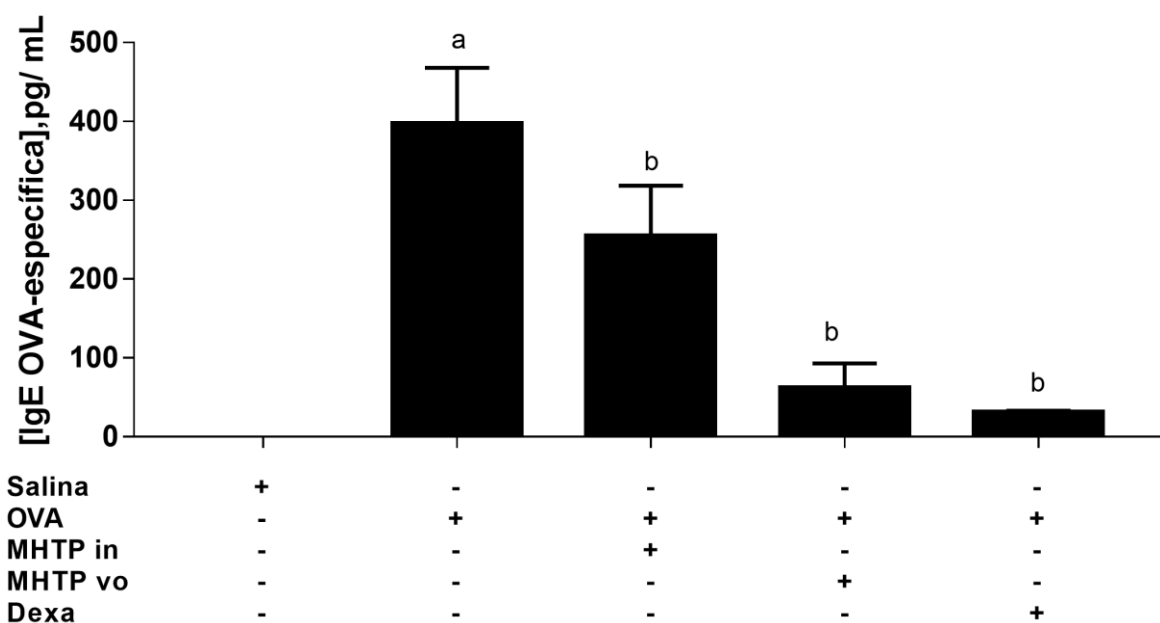
Os animais doentes tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexametasona, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) de IgE total (15%, 36,2% e 51,6%, respectivamente) bem como de IgE OVA-específica (35,6%, 84% e 91,8% respectivamente) quando comparados aos animais do grupo OVA.

Gráfico 9. Efeito do MHTP sobre a produção de IgE total e OVA-específica, no modelo experimental de CARAS

(a)



(b)



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último dia do protocolo experimental da CARAS o sangue foi coletado e o soro foi utilizado para dosagem pelo método imunoenzimático do tipo ELISA sanduiche de (a) IgE total e (b) IgE OVA-específica. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

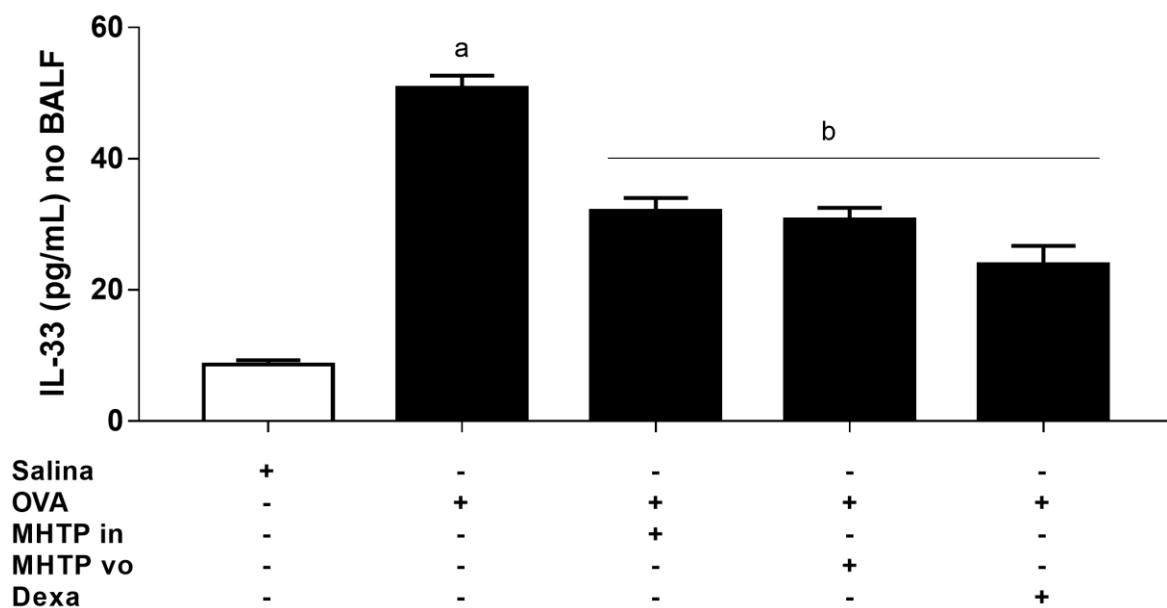
#### **4.10. Efeito do MHTP sobre a produção das citocinas IL-33 e TSLP (alarminas) no modelo experimental de CARAS**

Os resultados das quantificações das alarminas IL-33 (pg/mL) e TSLP (pg/mL) estão expressos nos Gráficos 10 (a) e 10(b), respectivamente. Os animais doentes (grupo OVA) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) na produção de ambas as alarminas IL-33 ( $50,8 \pm 0,95$  e  $8,61 \pm 0,34$ ) e TSLP ( $22,5 \pm 0,565$  e  $8,52 \pm 0,442$ ; respectivamente) quando comparados aos do grupo Salina.

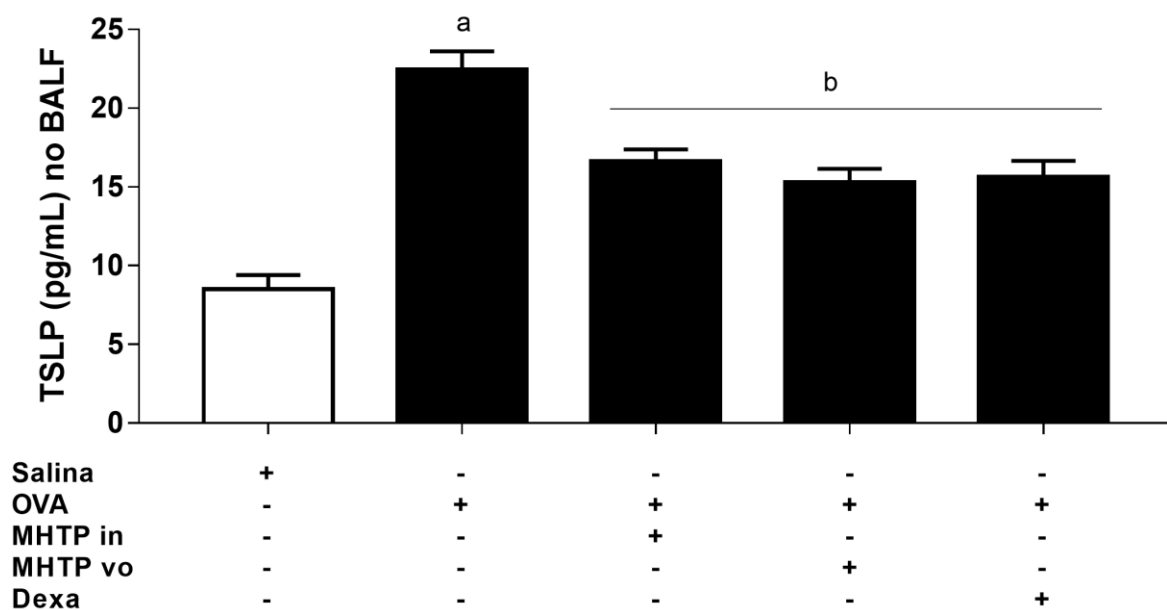
Os animais doentes tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexametasona, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) de ambas as alarminas quando comparados com os animais do grupo OVA: IL-33 em 37%, 39,5% e 52,9%, respectivamente e TSLP em 25,7%, 32% e 30,6%, respectivamente.

Gráfico 10. Efeito do MHTP sobre a produção das citocinas IL-33 e TSLP (alarminas), no modelo experimental de CARAS

(a)



(b)



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último dia do protocolo experimental da CARAS o Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) foi coletado e o sobrenadante foi utilizado para dosagem das citocinas pelo método imunoenzimático do tipo ELISA sanduiche. **(a)** IL-33 e **(b)** TSLP. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

**4.11. Efeito do MHTP sobre a produção das citocinas IL-4, IL-13 e IL-5 (perfil  $T_H2$ ), TGF- $\beta$  e IL-17 no modelo experimental de CARAS**

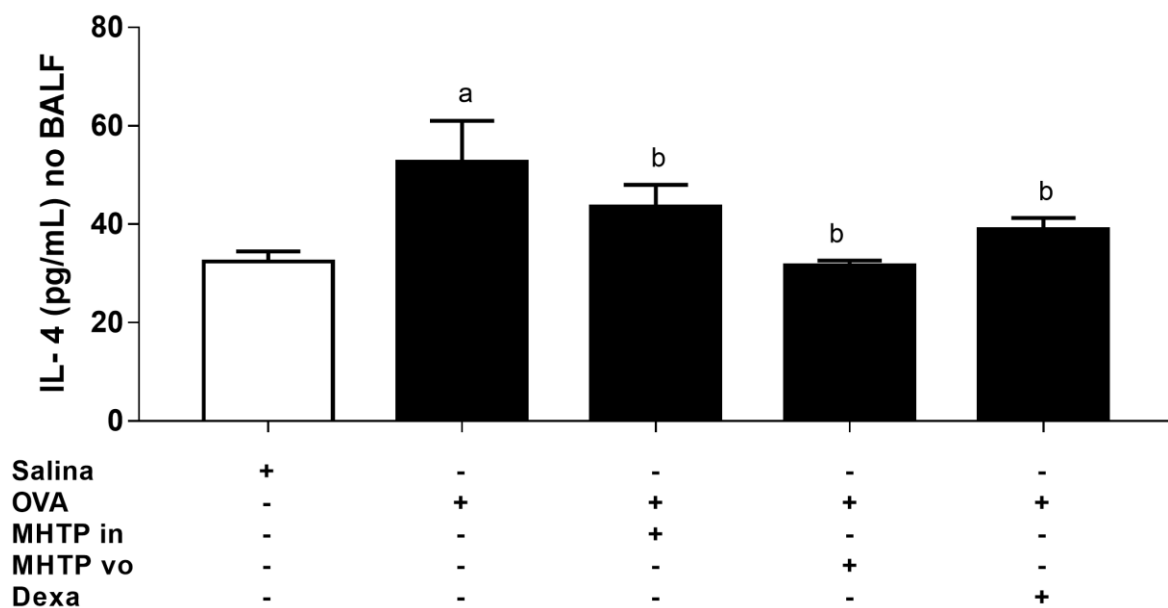
As citocinas IL-4, IL-13 e IL-5 são clássicas do perfil de resposta imune  $T_H2$  e coordenam a fisiopatologia da CARAS. O TGF- $\beta$  e a IL-17 estimulam o espessamento da MEC culminando com o remodelamento tecidual na CARAS. Os resultados de IL-4 (pg/mL), IL-13 (pg/mL), IL-5 (pg/mL), TGF- $\beta$  (pg/mL) e IL-17 (pg/mL) estão demonstrados nos Gráficos 11(a), 11(b), 11(c), 11(d) e 11(e), respectivamente.

Os animais do grupo OVA, quando comparados aos do grupo Salina apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) de todas as citocinas que modulam o processo inflamatório característico da resposta imune tipo 2: IL-4 ( $52,7 \pm 4,15$  e  $32,4 \pm 1,05$ ; respectivamente), IL-13 ( $78,2 \pm 1,95$  e  $36,6 \pm 1,33$ ; respectivamente), IL-5 ( $79,5 \pm 4,22$  e  $33 \pm 4,18$ ; respectivamente), TGF- $\beta$  ( $19 \pm 0,385$  e  $5,11 \pm 0,108$ ; respectivamente) e IL-17 ( $452 \pm 67,2$  e  $104 \pm 26,4$ ; respectivamente).

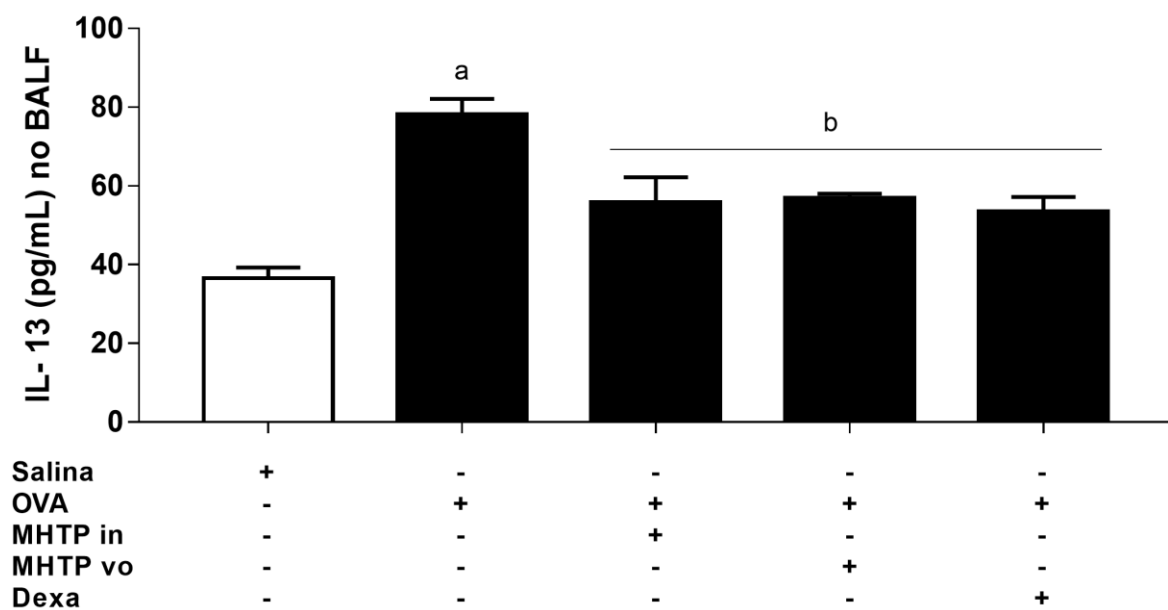
Os animais doentes tratados com o MHTP (in ou vo) ou com Dexa, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) de todas as citocinas quando comparados aos do grupo OVA: IL-4 em 17,2%, 39,8% e 25,9%, respectivamente; IL-13 em 28,3%, 27,2% e 31,4%, respectivamente; IL-5 em 46,1%, 49,9% e 45,6% respectivamente, TGF- $\beta$  em 32,1%, 38, 4% e 47,3%, respectivamente e IL-17 em 62,8%, 65% e 80,3% respectivamente.

Gráfico 11. Efeito do MHTP sobre a produção das citocinas IL-4, IL-13 e IL-5 (perfil T<sub>H</sub>2), TGF- $\beta$  e IL-17 (perfil T<sub>H</sub>17), no modelo experimental de CARAS

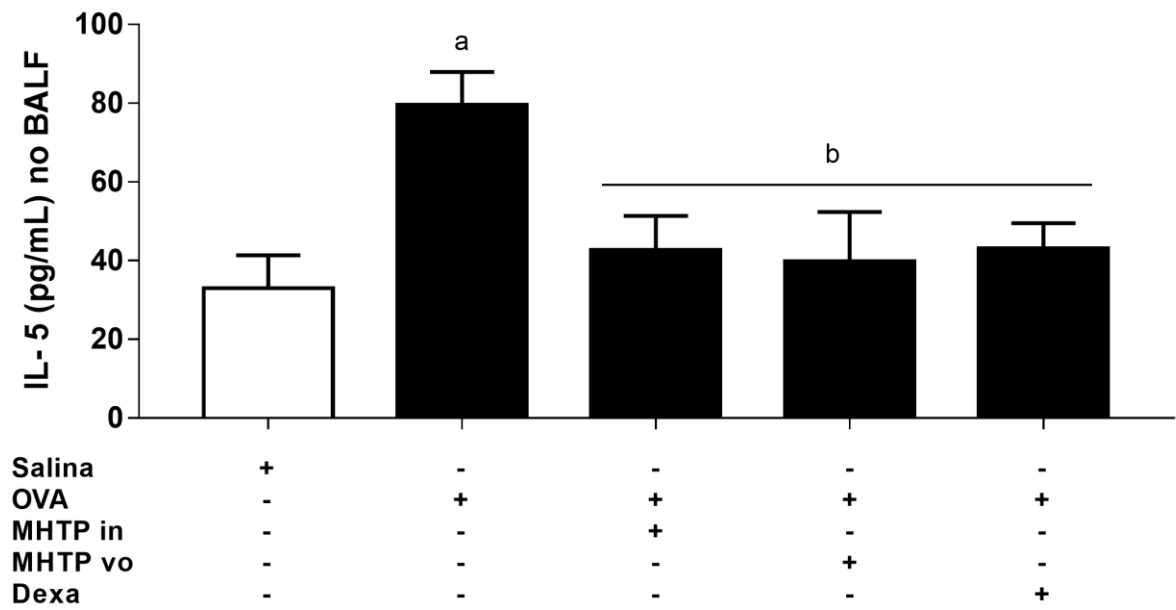
(a)



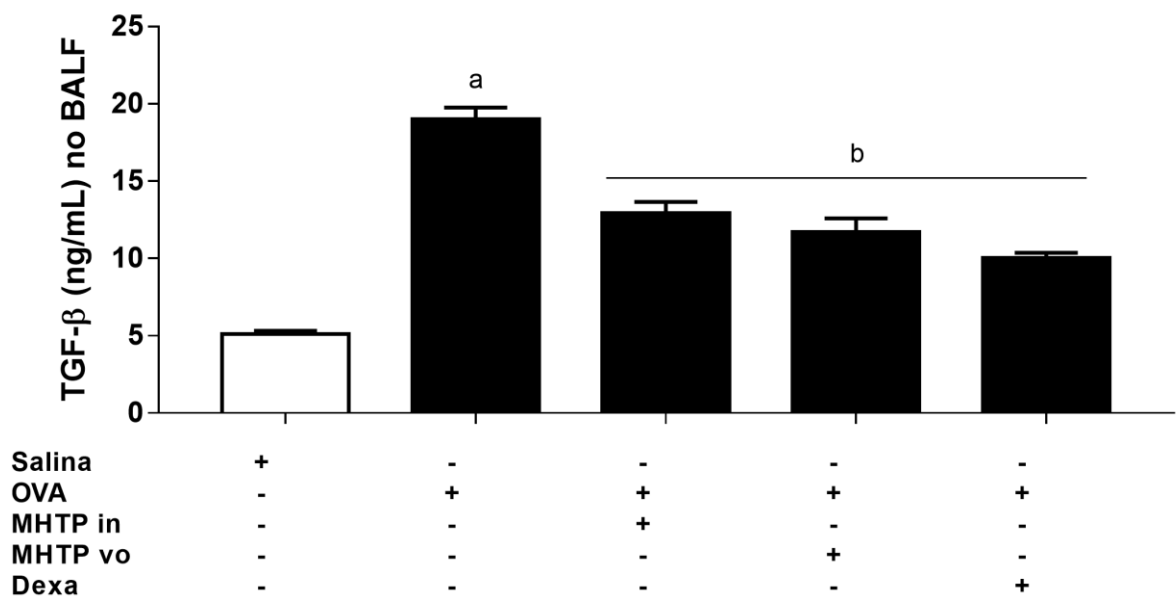
(b)



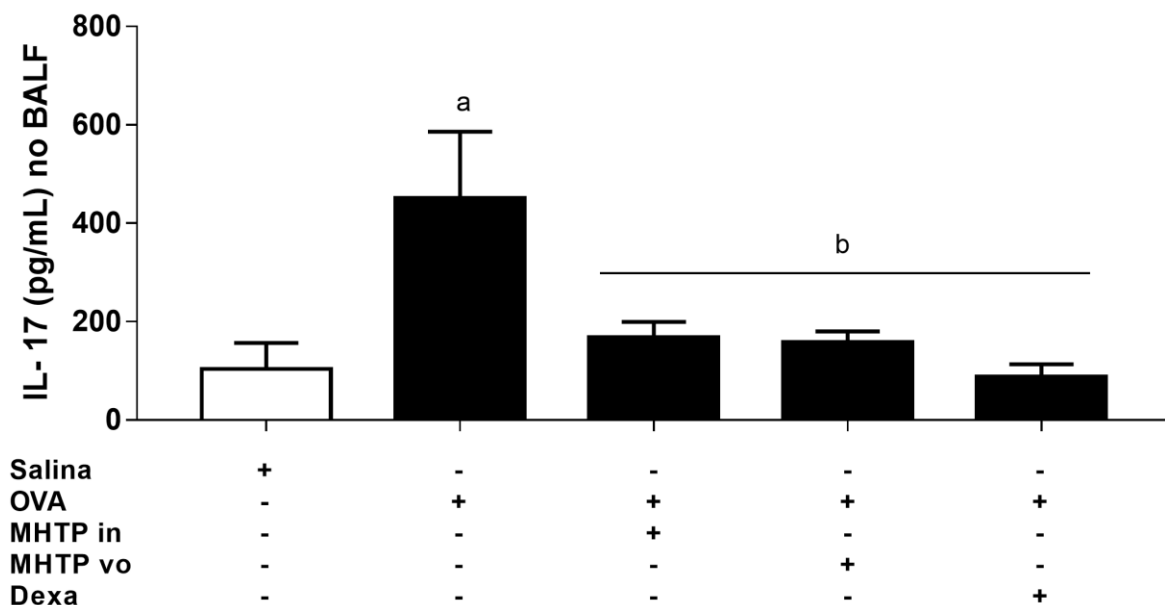
(c)



(d)



(e)



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último dia do protocolo experimental da CARAS o Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) foi coletado e o sobrenadante foi utilizado para dosagem das citocinas pelo método imunoenzimático do tipo ELISA sanduiche. **(a)** IL-4, **(b)** IL-13, **(c)** IL-5, **(d)** TGF- $\beta$  e **(e)** IL-17. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

#### **4.12. Efeito do MHTP sobre a produção das citocinas regulatórias do perfil $T_H2$ , IL-10 (perfil $T_{reg}$ ) e IFN- $\gamma$ (perfil $T_H1$ ) e razão IFN- $\gamma$ /IL-4 no modelo experimental de CARAS**

Um dos mecanismos de imunorregulação do perfil  $T_H2$  envolvido na resposta imune tipo 2, característica na CARAS é a produção de IL-10, principalmente pela população de linfócitos  $T_{reg}$ , outro mecanismo imunorregulador é a produção da citocina clássica do perfil de resposta imune  $T_H1$ , o IFN- $\gamma$ . Ambas citocinas foram mensuradas no presente estudo e os resultados estão demonstrados nos Gráficos 12 (a) para IL-10 (pg/mL) e 12 (b) para IFN- $\gamma$  (pg/mL). Os animais doentes (grupo OVA) não apresentaram alteração, quando comparados aos do grupo Salina, na produção de IL-10 ( $451 \pm 13,3$  e  $489 \pm 4,19$  respectivamente) entretanto, apresentaram diminuição ( $p < 0,05$ ), de 22,9%, na produção de IFN- $\gamma$  ( $114 \pm 2,56$  e  $148 \pm 2,6$ ; respectivamente).

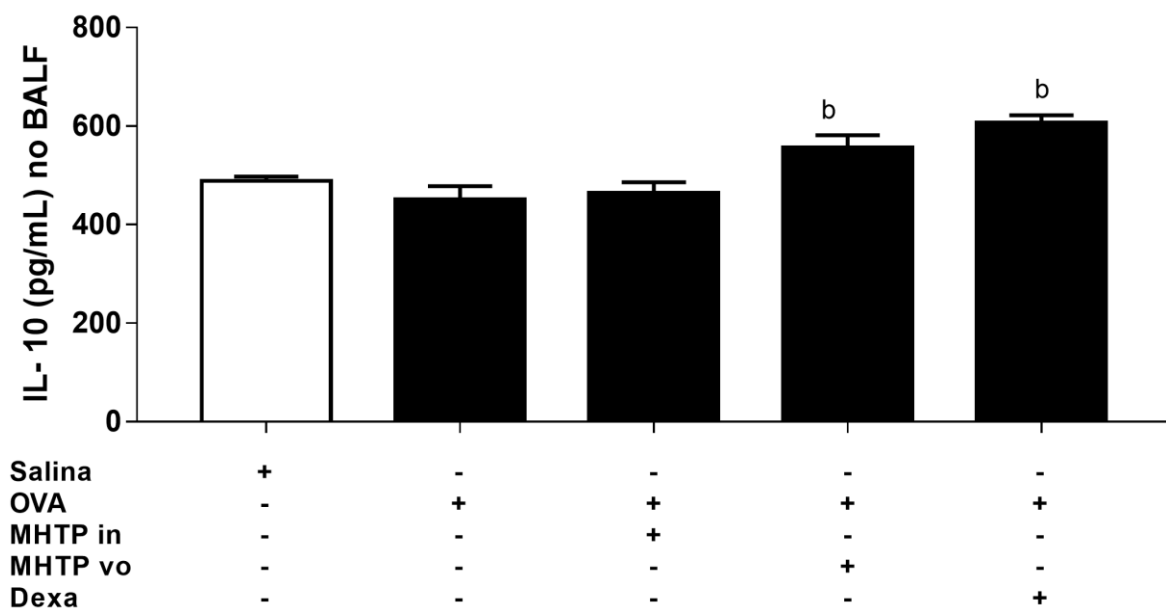
Os animais doentes e tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexametasona, apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) de IFN- $\gamma$  quando comparado ao grupo OVA em 45,6%, 32,4% e 36,8%, respectivamente. Apenas os tratamentos com o MHTP, pela via oral, e a Dexametasona promoveram aumento ( $p < 0,05$ ) de IL-10 quando comparado ao grupo OVA em 23,5% e 34,5%, respectivamente.

A razão IFN- $\gamma$ /IL-4 é um dado de relevância no contexto da imunorregulação entre os perfis de respostas imunes  $T_H1/T_H2$ , devido ao fato de que essas duas citocinas promovem as polarizações de seus perfis e consequentemente na inibição do outro. O resultado da razão IFN- $\gamma$ /IL-4 está demonstrado no Gráfico 12(c). Os animais do grupo OVA apresentaram a polarização do perfil  $T_H2$  com o aumento de IL-4 (Gráfico 11a), e consequente redução de IFN- $\gamma$  (Gráfico 12b), demonstrando portanto diminuição na razão IFN- $\gamma$ /IL-4 no grupo OVA quando comparado ao grupo Salina de 48,6% ( $2,31 \pm 0,162$  e  $4,5 \pm 0,194$ ;  $p < 0,05$ ) (Gráfico 12c). Esses resultados confirmam a polarização para o perfil de resposta imune  $T_H2$  nos animais alérgicos.

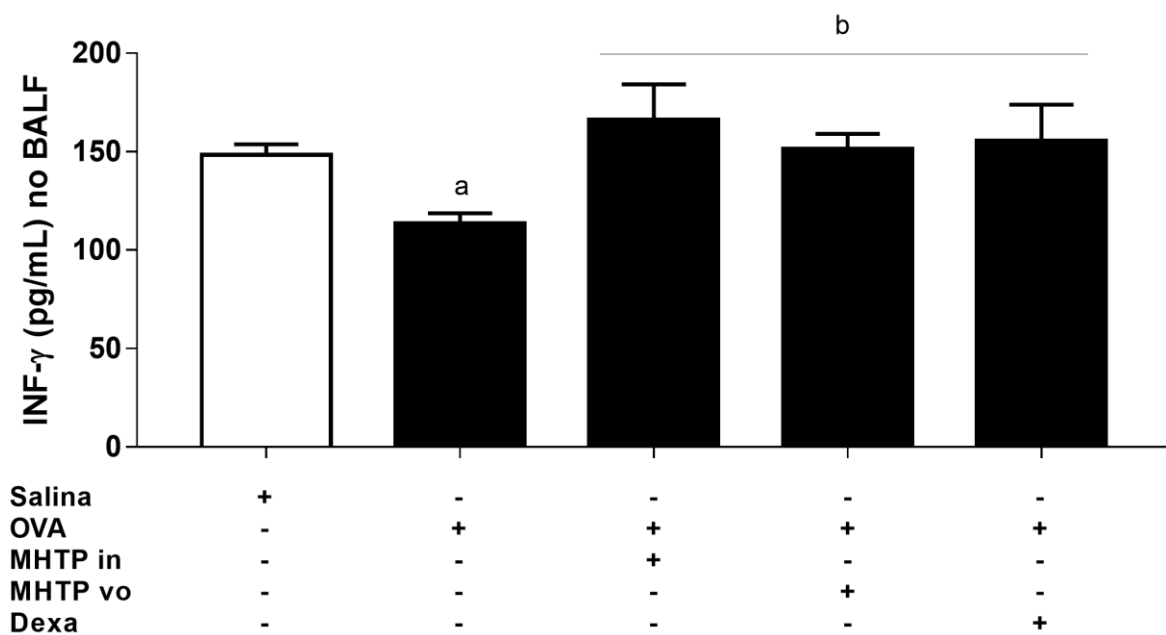
Os animais doentes e tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexametasona, apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) na razão IFN- $\gamma$ /IL-4 em 48%, 86,1% e 72,2% respectivamente, quando comparados aos animais do grupo OVA.

Gráfico 12. Efeito do MHTP sobre a produção das citocinas IL-10 (perfil T<sub>reg</sub>) e IFN- $\gamma$  (perfil T<sub>H</sub>1) e razão IFN- $\gamma$ /IL-4, no modelo experimental de CARAS

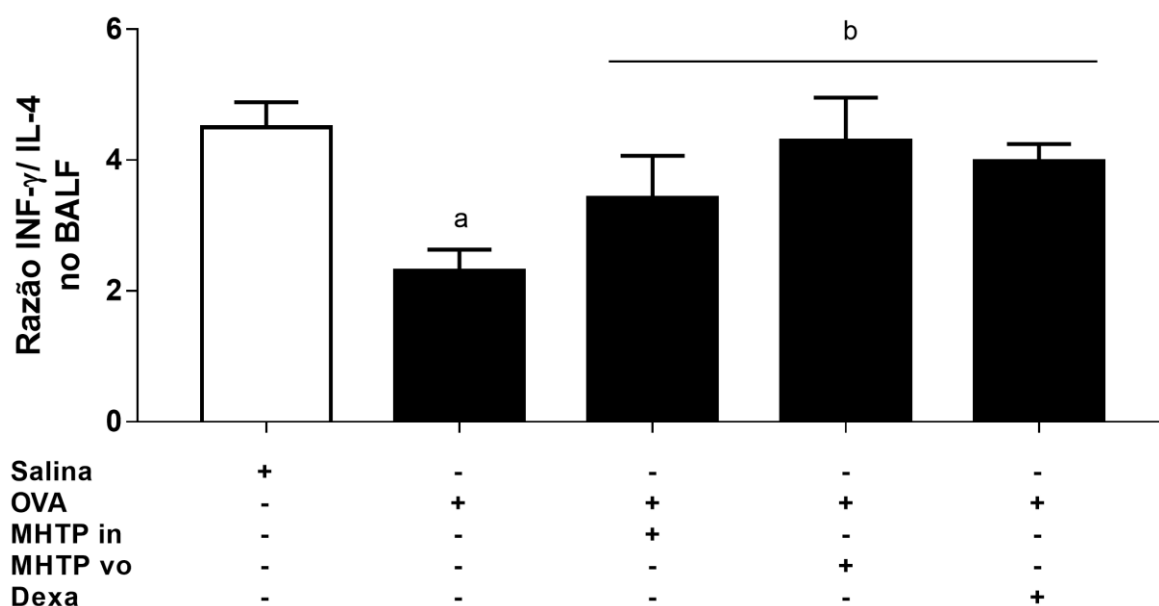
(a)



(b)



(c)



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último dia do protocolo experimental da CARAS o Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) foi coletado e o sobrenadante foi utilizado para dosagem das citocinas pelo método imunoenzimático do tipo ELISA sanduiche. **(a)** IL-10, **(b)** INF-γ e **(c)** Razão INF-γ/IL-4. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

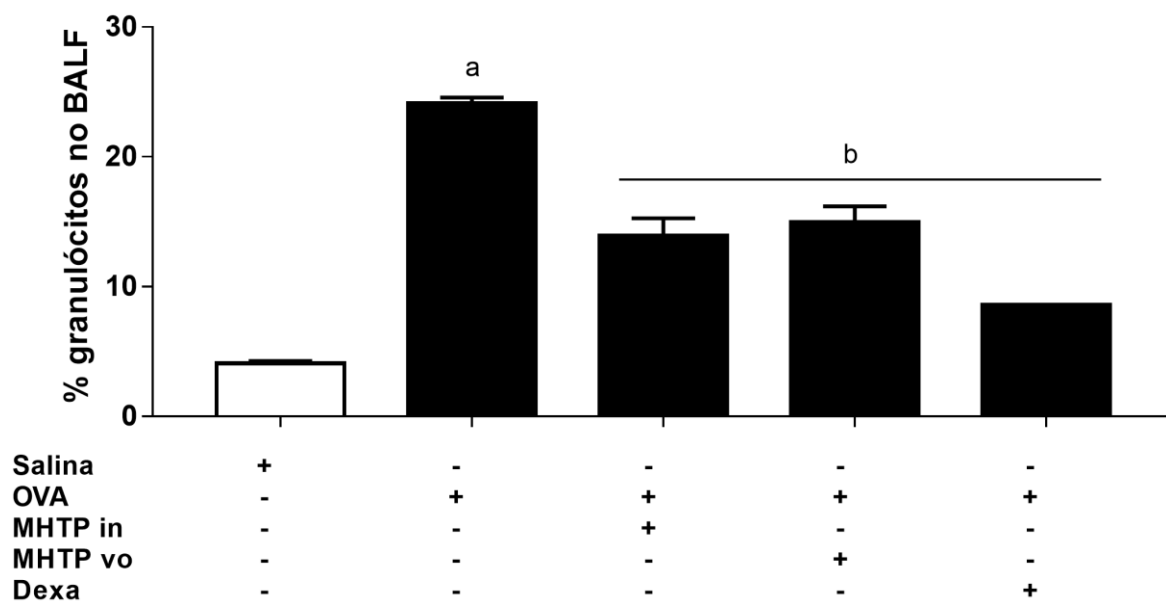
#### **4.13. Efeito do MHTP na porcentagem de granulócitos e linfócitos presentes no BALF de animais com CARAS**

Na análise por citometria de fluxo as populações celulares são distinguidas por seu tamanho e granularidade citoplasmática. As porcentagens de granulócitos (neutrófilos e eosinófilos) e linfócitos foram geradas a partir da análise por citometria de fluxo e representado nos Gráficos 13(a) e 13(b), respectivamente. Os animais doentes (grupo OVA) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de granulócitos ( $24,2 \pm 0,210$  e  $4,08 \pm 0,095$ , respectivamente) e de linfócitos ( $25,6 \pm 0,227$  e  $16,7 \pm 0,229$ ; respectivamente) quando comparado ao grupo Salina.

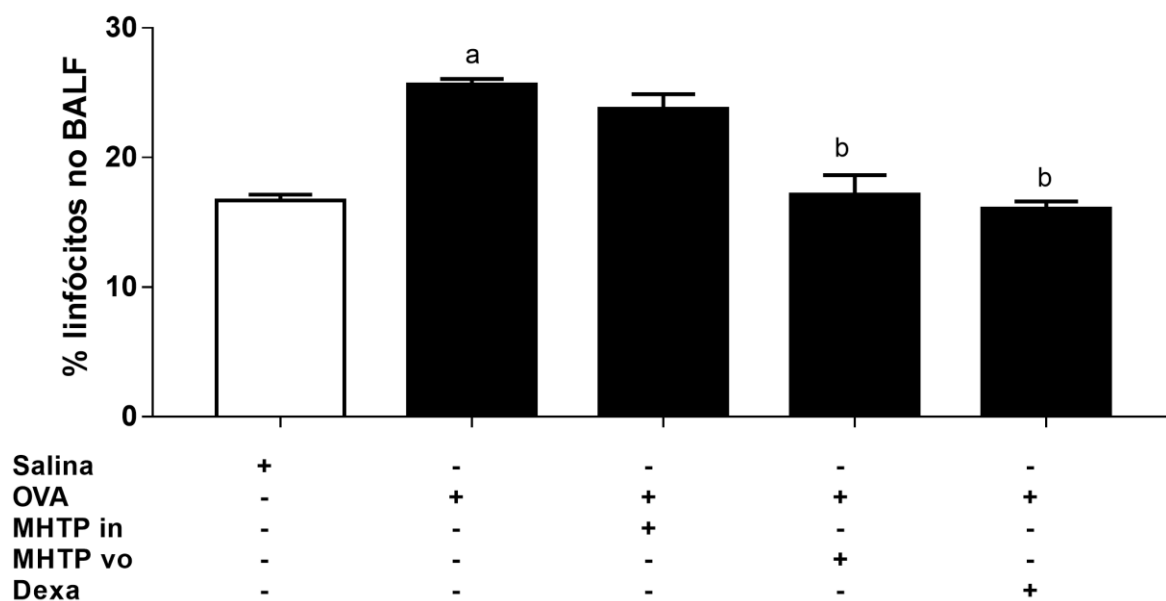
Os animais doentes tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexametasona, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de granulócitos quando comparados aos animais do grupo OVA em 42,1%, 38% e 64,5%, respectivamente. O tratamento com MHTP pela via oral e Dexametasona reduziram a porcentagem de linfócitos quando comparados aos animais do grupo OVA em 23,8% e 37,1% com  $p < 0,05$  respectivamente.

Gráfico 13. Efeito do MHTP na porcentagem de granulócitos e linfócitos presentes no BALF de animais com CARAS

(a)



(b)



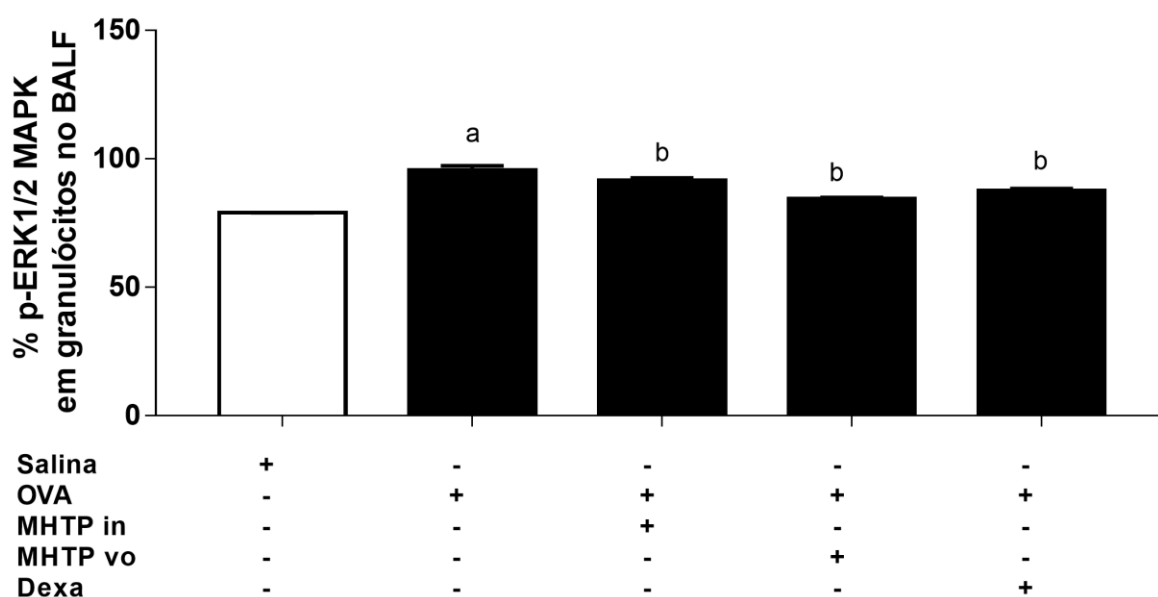
Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados (in) ou (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com Dexa, uma hora antes de cada desafio. 24 horas após o último desafio o pellet do BALF foi analisado para distinção de células pelo tamanho (FSC) e granularidade citoplasmática (SSC). **(a)** % de Granulócitos no BALF e **(b)** % de Linfócitos no BALF. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

#### 4.14. Efeito do MHTP na ativação da p-ERK1/2 MAPK em granulócitos no BALF de animais com CARAS

A frequência de ativação da p-ERK 1/2 MAPK em granulócitos no BALF de animais com CARAS experimental analisada pela técnica de citometria de fluxo está representada no Gráfico 14. Os animais doentes (grupo OVA) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) na frequência de ativação da p-ERK 1/2 MAPK em granulócitos no BALF quando comparado ao grupo Salina em 20,9% ( $95,7 \pm 0,902$  e  $79,1 \pm 0,05$ ; respectivamente).

Os animais doentes tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexa, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) na frequência de ativação da p-ERK 1/2 MAPK em granulócitos no BALF quando comparados aos animais do grupo OVA em 4,1%, 11,8% e 8,4%, respectivamente.

**Gráfico 14. Efeito do MHTP na frequência de ativação da p-ERK 1/2 MAPK em granulócitos no BALF de animais com CARAS**



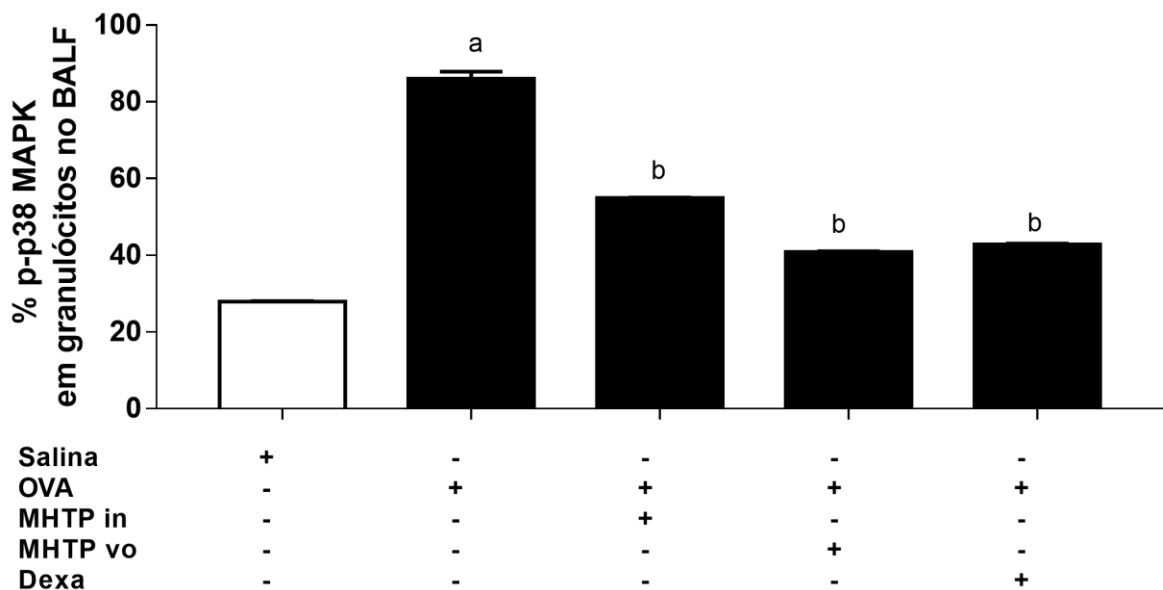
Camundongos BALB/c fêmeas ( $n=6$ ) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último dia do protocolo experimental da CARAS O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 24h após o último desafio e após sua centrifugação, o pellet foi utilizado para classificação dos leucócitos pela análise do tamanho celular (FSC- Forward Scatter, por difração de luz) e granularidade ou complexidade citoplasmática (SSC- Side Scatter, por difusão de luz) na citometria de fluxo). A ativação de p-ERK 1/2 (PE) foi analisada em granulócitos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

#### 4.15. Efeito do MHTP na ativação da p-p38 MAPK em granulócitos no BALF de animais com CARAS

A frequência de ativação da p-p38 MAPK em granulócitos no BALF de animais com CARAS experimental analisada pela técnica de citometria de fluxo está representada no Gráfico 15. Os animais doentes (grupo OVA) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) de três vezes quando comparado ao grupo Salina ( $86 \pm 1,11$  e  $27,9 \pm 0,15$ , respectivamente) na frequência de ativação da p-p38 MAPK em granulócitos no BALF.

Os animais doentes tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexa, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) na frequência de ativação da p-p38 MAPK em granulócitos no BALF quando comparados aos animais do grupo OVA em 36%, 52,5% e 50,2%, respectivamente.

**Gráfico 15. Efeito do MHTP na frequência de ativação da p-p38 MAPK em granulócitos no BALF de animais com CARAS**



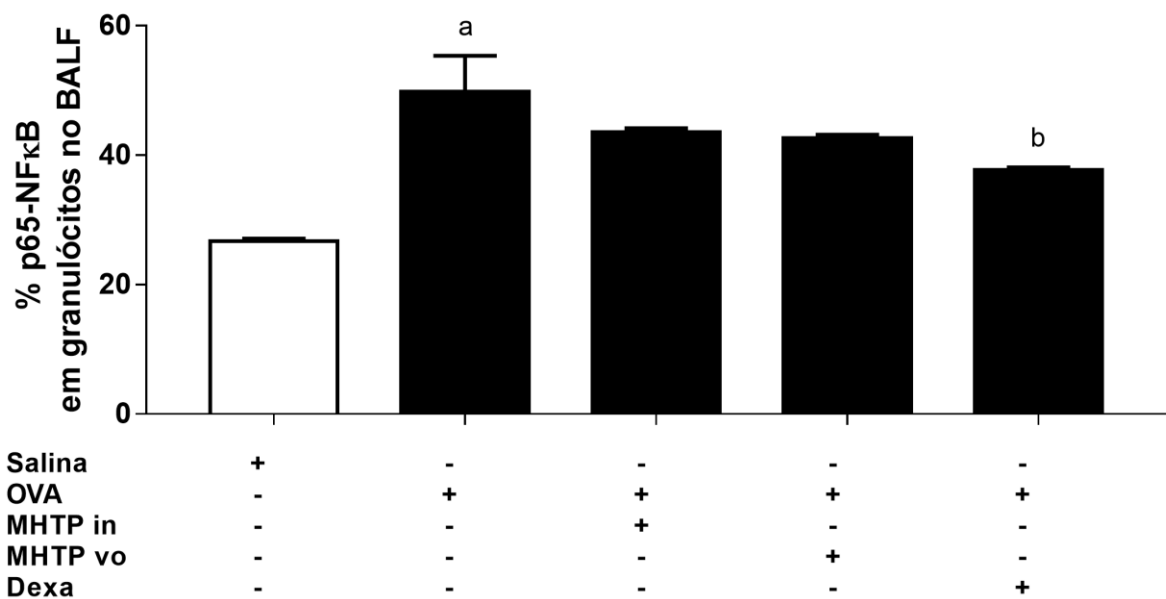
Camundongos BALB/c fêmeas ( $n=6$ ) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último dia do protocolo experimental da CARAS O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 24h após o último desafio e após sua centrifugação, o pellet foi utilizado para classificação dos leucócitos pela análise do tamanho celular (FSC- Forward Scatter, por difração de luz) e granularidade ou complexidade citoplasmática (SSC- Side Scatter, por difusão de luz) na citometria de fluxo. A ativação de p-p38 (PE-Cy7) foi analisada em granulócitos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

#### 4.16. Efeito do MHTP na porção p65 do Fator de Transcrição NF-κB em granulócitos no BALF de animais com CARAS

A presença da porção p65 do Fator de Transcrição NF-κB em granulócitos no BALF de animais com CARAS experimental analisada pela técnica de citometria de fluxo está representada no Gráfico 16. Os animais doentes (grupo OVA) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ), quando comparados aos do grupo Salina, na frequência de NF-κB(p65) em granulócitos no BALF de 86,5% ( $49,8 \pm 3,19$  e  $26,7 \pm 0,3$ ; respectivamente).

Os animais doentes tratados com Dexa, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) na frequência de NF-κB(p65) em granulócitos no BALF quando comparados aos animais do grupo OVA em 24,2%. O tratamento com o MHTP não alterou a frequência de NF-κB(p65) em granulócitos no BALF quando comparados aos animais do grupo OVA.

Gráfico 16. Efeito do MHTP no NFκB(p65) em granulócitos presentes no BALF de animais com CARAS



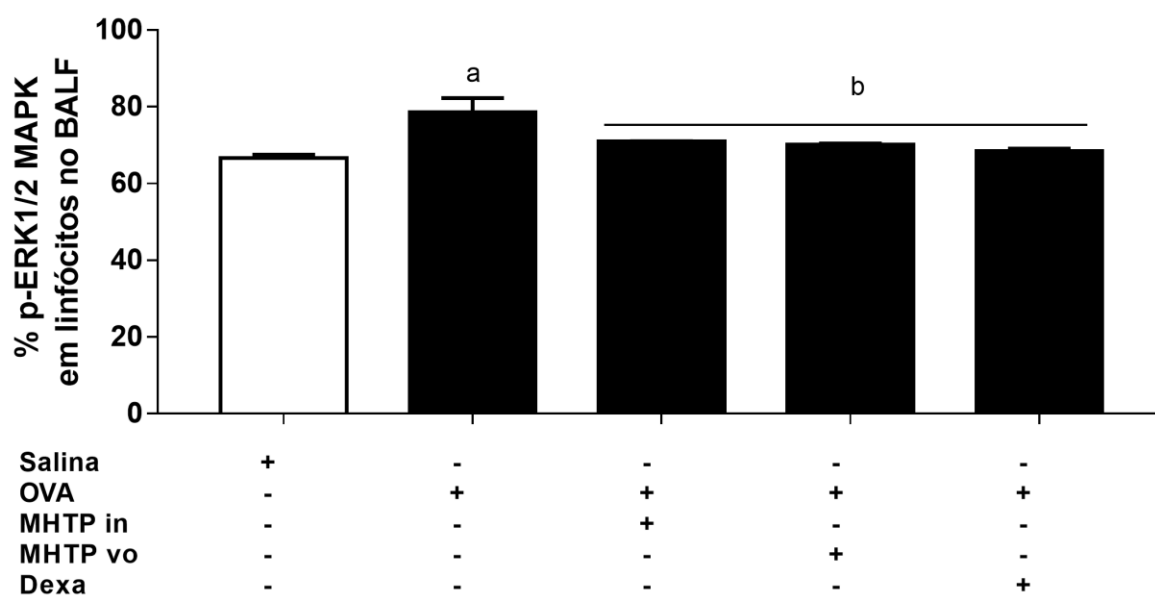
Camundongos BALB/c fêmeas ( $n=6$ ) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último dia do protocolo experimental da CARAS O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 24h após o último desafio e após sua centrifugação, o pellet foi utilizado para classificação dos leucócitos pela análise do tamanho celular (FSC- Forward Scatter, por difração de luz) e granularidade ou complexidade citoplasmática (SSC- Side Scatter, por difusão de luz) na citometria de fluxo). A porção p65 do Fator de Transcrição NFκB (PerCP-Cy5-5) foi analisada em granulócitos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

#### 4.17. Efeito do MHTP na ativação da p-ERK 1/2 MAPK em linfócitos no BALF de animais com CARAS

A frequência de ativação da p-ERK 1/2 MAPK em linfócitos no BALF de animais com CARAS experimental analisada pela técnica de citometria de fluxo está representada no Gráfico 17. Os animais doentes (grupo OVA) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) na frequência de ativação da p-ERK 1/2 MAPK em linfócitos no BALF em 17,6% quando comparados aos do grupo Salina ( $78,5 \pm 2,7$  e  $66,7 \pm 0,65$ ; respectivamente)

Os animais doentes tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexa, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) na frequência de ativação da p-ERK 1/2 MAPK em linfócitos no BALF quando comparados aos animais do grupo OVA, em 9,5%, 10,5% e 12,7%, respectivamente.

**Gráfico 17. Efeito do MHTP na frequência de ativação da p-ERK 1/2 MAPK em linfócitos no BALF de animais com CARAS**



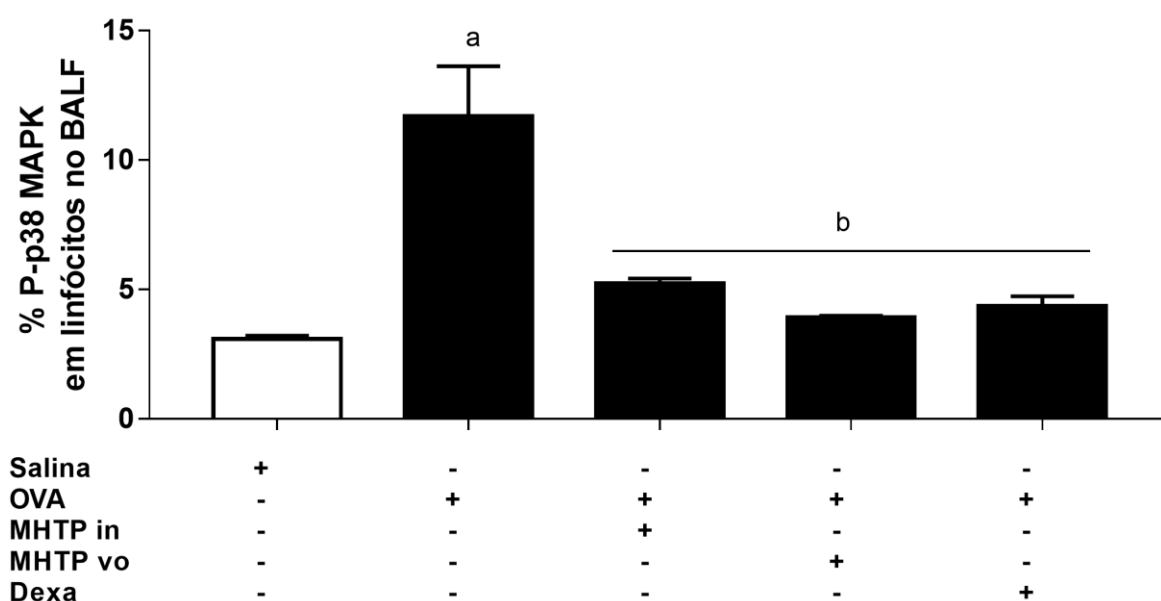
Camundongos BALB/c fêmeas ( $n=6$ ) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último dia do protocolo experimental da CARAS O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 24h após o último desafio e após sua centrifugação, o pellet foi utilizado para classificação dos leucócitos pela análise do tamanho celular (FSC- Forward Scatter, por difração de luz) e granularidade ou complexidade citoplasmática (SSC- Side Scatter, por difusão de luz) na citometria de fluxo). A ativação de p-ERK 1/2 (PE) foi analisada em linfócitos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

#### 4.18. Efeito do MHTP na ativação da p-p38 MAPK em linfócitos presentes no BALF de animais com CARAS

A frequência de ativação da p-p38 MAPK em linfócitos no BALF de animais com CARAS experimental analisada pela técnica de citometria de fluxo está representada no Gráfico 18. Os animais doentes (grupo OVA) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) na frequência de ativação da p-p38 MAPK em linfócitos no BALF em três vezes ( $11,7 \pm 1,11$  e  $3,1 \pm 0,085$ ; respectivamente) quando comparado ao grupo Salina.

Os animais doentes tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexa, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) na frequência de ativação da p-p38 MAPK em linfócitos no BALF quando comparados aos animais do grupo OVA em 55%, 52,5%, 66,2% e 62,6%, respectivamente.

**Gráfico 18. Efeito do MHTP na frequência de ativação da p-p38 MAPK em linfócitos no BALF de animais com CARAS**



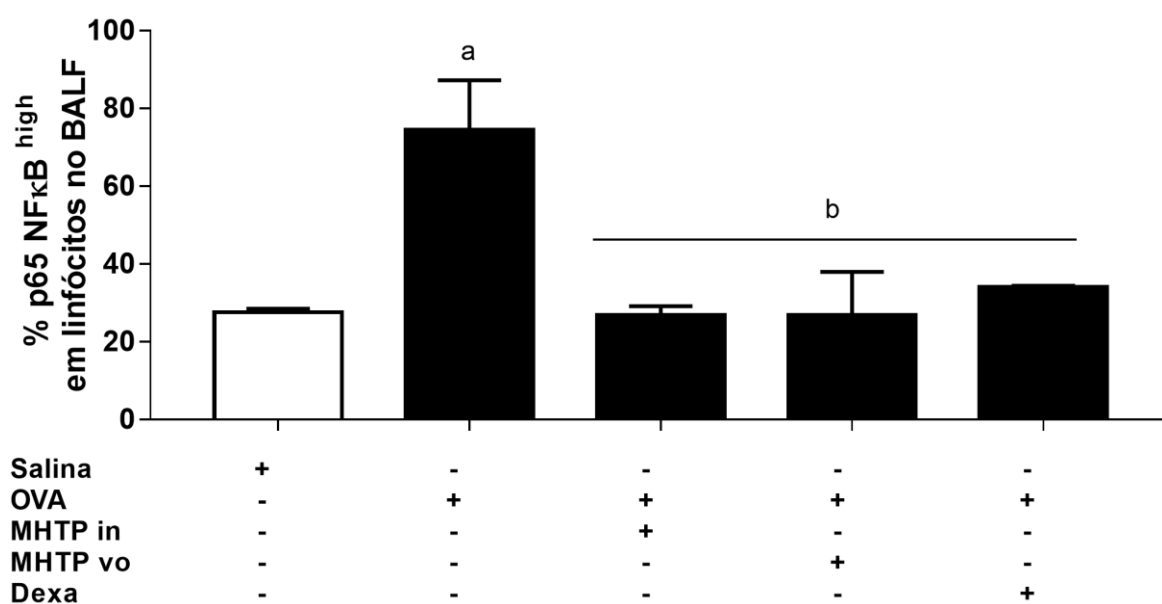
Camundongos BALB/c fêmeas ( $n=6$ ) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último dia do protocolo experimental da CARAS O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 24h após o último desafio e após sua centrifugação, o pellet foi utilizado para classificação dos leucócitos pela análise do tamanho celular (FSC- Forward Scatter, por difração de luz) e granularidade ou complexidade citoplasmática (SSC- Side Scatter, por difusão de luz) na citometria de fluxo). A ativação de p-p38 (PE-Cy7) foi analisada em linfócitos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

#### 4.19. Efeito do MHTP na porção p65 do Fator de Transcrição NF-κB em linfócitos presentes no BALF de animais com CARAS

A frequência de expressão da p65 do Fator de Transcrição NF-κB em linfócitos no BALF de animais com CARAS experimental analisada pela técnica de citometria de fluxo está representada no Gráfico 19. Os animais doentes (grupo OVA) apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) na frequência de expressão de NF-κB(p65) em linfócitos no BALF em duas vezes ( $74,6 \pm 6,33$  e  $27,7 \pm 0,65$ , respectivamente) quando comparados aos do grupo Salina.

Os animais doentes tratados com o MHTP (vias in ou vo) ou com Dexa, apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) na frequência de expressão de NF-κB(p65) em linfócitos no BALF quando comparados aos animais do grupo OVA, em 63,9%, 63,8% e 54,1%, respectivamente.

**Gráfico 19. Efeito do MHTP no NFκB(p65) em linfócitos presentes no BALF de animais com CARAS**



Camundongos BALB/c fêmeas ( $n=6$ ) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via intranasal (in) ou via oral (vo) com MHTP (5 mg/kg), ou com dexametasona (2 mg/kg), uma hora antes de cada desafio. No último dia do protocolo experimental da CARAS O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 24h após o último desafio e após sua centrifugação, o pellet foi utilizado para classificação dos leucócitos pela análise do tamanho celular (FSC- Forward Scatter, por difração de luz) e granularidade ou complexidade citoplasmática (SSC- Side Scatter, por difusão de luz) na citometria de fluxo). A porção p65 do Fator de Transcrição NFκB (PerCP-Cy5-5) foi analisada em granulócitos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo Salina e (b)  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo OVA.

## **5. DISCUSSÃO**

No presente estudo implantamos o modelo experimental de CARAS (Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas) no Laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA)/Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa/PB, Brasil. A CARAS é uma inflamação crônica das vias aéreas superior e inferior caracterizando, em humanos, a rinite alérgica e asma, respectivamente. Essas duas doenças, isoladas ou associadas, vêm sendo consideradas problemas de saúde pública em termos globais; pois, além de conferir uma baixa qualidade de vida aos pacientes, interferem nas atividades laborais dos indivíduos, acarretando prejuízos econômicos (CARDOSO et al., 2017; SAKANO et al., 2018). Em adição, a farmacoterapia atual para tais doenças, embora seja ampla, promove graves efeitos adversos, pois, os tratamentos são realizados a longo prazo (REGATEIRO; LUÍSA MOURA; FARIA, 2017; SAKANO et al., 2017) havendo a necessidade de se encontrar alternativas terapêuticas que aliviem os sintomas sem causar graves efeitos adversos.

Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os mecanismos de ação do alcaloide tetrahydroisoquinolínico sintético 2-metoxi-4-(7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-il) fenol denominado MHTP no modelo experimental de CARAS. O MHTP apresentou efeitos anti-inflamatórios promissores em modelos experimentais de inflamação aguda e de inflamação pulmonar alérgica (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019; PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015; PAIVA FERREIRA et al., 2018) sendo, portanto, um provável candidato a apresentar efeito imunorregulador benéfico nessa síndrome.

Para a implantação da CARAS, camundongos fêmeas da linhagem BALB/c foram sensibilizados, sistemicamente (i.p.) e desafiados com o alérgeno ovalbumina (OVA) por duas vias de administração, a saber: via instilação nasal por três semanas consecutivas, afim de se ter uma segurança da quantidade de alérgeno inalada pelo animal, e via aerossol por cinco dias consecutivos, afim de mimetizar o contato natural do homem com os aeroalérgenos (LI et al., 2015a, 2016a; TAKAHASHI et al., 2015; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Os resultados mostraram uma extensa infiltração de células inflamatórias, principalmente de eosinófilos, nas cavidades nasal e pulmonar, sugerindo um processo inflamatório mediado pelas células TH2. Tal comportamento foi confirmado pelo aumento nos níveis séricos de IgE OVA-específica e produção de IL-4, IL-13 e IL-5, das alarminas: IL-33 e TSLP,

bem como dos altos níveis de TGF- $\beta$  e IL-17 nos fluidos dos lavados nasal (NALF) e broncoalveolar (BALF). Portanto, esses resultados demonstram a apropriada implantação do protocolo experimental de CARAS nos animais de experimentação.

Os animais com CARAS foram tratados com o MHTP, por via intranasal (in) ou via oral (vo), devido a estas serem as vias mais comuns de escolha para o tratamento das doenças do trato respiratório, e apresentaram redução, em nível local, da migração de células inflamatórias, sobretudo de eosinófilos, tanto nos tecidos nasal e pulmonar quanto nos fluidos do NALF e do BALF; além de reduzir, em nível sistêmico do biomarcador alérgico IgE OVA-específica. O MHTP também reverteu o quadro da hiperprodução de muco nas cavidades nasal e pulmonar. Nas vias aéreas inferiores, o mesmo reduziu a hiperplasia e/ou hipertrofia da camada muscular lisa e, por conseguinte, a hiper-reatividade brônquica (BHR), bem como reduziu a deposição da matriz extracelular (MEC), inibindo o remodelamento tecidual e a perda da função pulmonar. O MHTP promoveu ainda uma reversão do perfil T<sub>H</sub>2 em resposta à OVA. Além disso, o tratamento com o MHTP aliviou a gravidade dos sinais clínicos, espirros e fricção nasal, tanto após o desafio com OVA pela via aerossol quanto após o último desafio via instilação nasal no modelo murino de CARAS. No mais, o MHTP inibiu a hiper-reatividade nasal induzida pela histamina nos animais com CARAS.

As vias de escolha para a administração do MHTP neste estudo foram as vias intranasal e oral com o intuito foi observar se os efeitos do alcaloide estariam relacionados a sua via de administração. Nossos achados, no entanto, demonstraram que o efeito anti-inflamatório do MHTP mediante a resposta imune da CARAS pouco está relacionado com a via de administração desse alcaloide. Tendo em vista as diferenças farmacocinéticas entre as duas vias de administração selecionadas no presente trabalho, e a utilização de cada uma no contexto farmacoterapêutico para os tratamentos da rinite e/ou asma, torna-se essencial a identificação de suas características para a melhor escolha da via de tratamento, a depender do estágio e intensidade das manifestações clínicas da síndrome ou até mesmo a escolha das duas em diferentes formulações farmacêuticas. No mercado farmacêutico é possível encontrar fármacos contidos em diferentes formulações para o tratamento de uma mesma doença a exemplo dos corticosteroides que podem ser administrados por vias oral, endovenosa e nasal para o tratamento de alergias (GOLDSTEIN; WEBER-SCHÖNDORFER; BERKOVITCH, 2015; LEUNG et al., 2017; TRAN; VICKERY; BLAISS, 2011).

A literatura nos mostra que a via oral é a mais adotada para a administração de medicamentos devido à viabilidade econômica, conveniência no modo de aplicação, o que implica na maior adesão do paciente e, por sua vez, o sucesso terapêutico (RUIZ; SCIOLI MONTOTO, 2018). Os fármacos administrados por via oral são absorvidos pelo trato gastrointestinal por diversos mecanismos, como: difusão passiva, transporte ativo, e endocitose; sendo afetado por dieta, hormônios, sistema nervoso autônomo, estados patológicos e outros fármacos. Desta forma, as características físico-químicas do fármaco, tais como o equilíbrio hidrofílico/lipofílico, mostram-se determinantes para a sua cinética de absorção (RUIZ; SCIOLI MONTOTO, 2018).

Por outro lado, a via nasal compreende a absorção de fármacos pela mucosa nasal e uma administração não invasiva, sendo escolhida para terapias locais no controle, por exemplo, da rinite. No entanto, os fármacos que atingem o epitélio nasal apresentam um contato restrito com a superfície das células devido à impulsão dos compostos do ar pelo muco, até ser engolido. Outra situação limitante é a possível lesão ou irritação da mucosa nasal causada pelo fármaco ou outros componentes de sua formulação (RUIZ; SCIOLI MONTOTO, 2018). Entretanto, apresenta algumas vantagens, entre elas a de agir diretamente no local e apresentar baixa absorção sistêmica e, consequentemente, menos efeitos adversos sistêmicos (CAPARROZ et al., 2016).

Portanto, diante do exposto acima decidimos dar continuidade aos estudos dos efeitos do MHTP no modelo de CARAS utilizando as duas vias de administração, oral e intranasal, tendo em vista o potencial da molécula em se tornar um fármaco e considerando que ambas as vias possam ser utilizadas em doenças respiratórias, a depender do estágio da doença e a clínica observada no momento de realizar a intervenção terapêutica.

Inicialmente, para nos certificarmos que os tratamentos com o MHTP pelas duas vias, por si só, não alterariam os padrões fisiológicos do animal, inserimos em nosso trabalho dois grupos experimentais essenciais, onde um grupo compreendeu os animais não sensibilizados e não desafiados com OVA, porém tratados com o MHTP por via intranasal e o outro grupo compreendeu os animais não sensibilizados e não desafiados com OVA, porém tratados com o MHTP por via oral. Ambos os grupos não apresentaram células inflamatórias no NALF e BALF e nem apresentaram os parâmetros histopatológicos mensurados no presente trabalho tais como: infiltração celular tecidual, perda da integridade epitelial, aumento da camada

muscular lisa e deposição da MEC demonstrando, claramente, que os tratamentos contínuos com o MHTP seja por via intranasal ou seja por via oral, na dose de 5 mg/kg, dose 200 vezes menor que a sua DL50 (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015), sem a instalação da CARAS, não alteraram os níveis fisiológicos, conferindo segurança terapêutica no uso do MHTP, independente da via de administração.

Vale salientar que o MHTP é um alcaloide produzido pelo método de condensação utilizando a reação química de *Pictet-Spengler* de baixo custo (STÖCKIGT et al., 2011) e apresenta rendimento de 93,45% (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015) tornando-o uma molécula viável para a produção em larga escala, favorecendo a ideia do MHTP ser um possível candidato a fármaco para o tratamento da CARAS. Os estudos no sentido de desvendar os mecanismos biológicos que são influenciados pelo MHTP durante o tratamento de processos inflamatórios agudos e crônicos são de fundamental importância e vêm sendo conduzidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Imunofarmacologia da UFPB (LIMFA/UFPB).

Nesse viés de raciocínio, o grupo de pesquisa iniciou, em meados de 2013-2014, os estudos sobre a toxicidade aguda não clínica do MHTP, o que resultou em baixa toxicidade aguda com  $DL50 > 1000$  mg/kg, sem atividade genotóxica (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015). A ausência de genotoxicidade do MHTP é de extrema relevância pois os tratamentos envolvendo inflamações crônicas, como é o caso da CARAS, ocorrem por longos períodos. No modelo experimental de CARAS, utilizado no presente trabalho, os animais foram submetidos a 14 dias de tratamento, uma hora antes de cada desafio, por três dias consecutivos em três semanas consecutivas, e por cinco dias consecutivos, após os três dias da terceira semana; conferindo um tratamento contínuo com o MHTP (vias intranasal ou oral). Tal procedimento foi, inicialmente, realizado em animais sadios e não foi observado influxo de células inflamatórias no NALF e BALF e nem processo inflamatório nos tecidos nasal e pulmonar. Portanto, esses resultados corroboraram com os descritos acima, isto é, o MHTP não apresenta toxicidade e/ou genotoxicidade demonstrando que o tratamento a longo prazo com o alcaloide não altera a fisiologia do animal.

Nesse mesmo trabalho os autores demonstraram o efeito anti-inflamatório do MHTP administrado por via oral em modelos experimentais de inflamação aguda induzida por agentes flogísticos. Os autores demonstram que o tratamento oral com o MHTP apresentou efeito antiedematogênico, reduziu a migração de polimorfonucleares e o extravasamento proteico para o peritônio de animais

estimulados com carragenina e, na cultura de macrófagos peritoneais estimulados com LPS (Lipopolissacarídeo Bacteriano), o tratamento com o MHTP inibiu a produção de Óxido Nítrico (NO) e das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6 (PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015).

Posteriormente, Do Nascimento Xavier e col. (2019) demonstram, no modelo de lesão pulmonar aguda (LPA) induzida por LPS, que o tratamento com o MHTP (via intranasal) foi capaz de inibir a migração de células inflamatórias para o pulmão, diminuir os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$ , bem como promoveu 100% de sobrevivência dos animais, cujos efeitos decorreram da regulação negativa da via de sinalização dependente de TLR4-p38MAPquinase/NF- $\kappa$ B(p65) em células inflamatórias no BALF (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019). Esses resultados confirmam uma proeminente atividade anti-inflamatória do MHTP nos diversos modelos murinos de inflamação aguda seja o tratamento por via oral ou por via intranasal.

Estudos com outros alcaloides sintéticos com núcleo tetrahydroisoquinolínico indicaram atividade anti-inflamatória destes em modelos murinos de inflamação aguda, por meio de mecanismos de ação envolvendo a inibição da citocina inflamatória TNF- $\alpha$ , e da expressão da Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS), bem como por meio de mecanismos intracelulares que envolvem a inibição das vias de sinalização da p38MAPK e do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (KANG et al., 2003; KIM et al., 2007; KO et al., 2017; PARK et al., 2013; TSOYI et al., 2008a).

Em 2018, Paiva Ferreira e col. demonstraram, no modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar induzida por OVA., que o tratamento intranasal com o MHTP (5 mg/kg) diminuiu o título sérico de IgE-alérgeno-específica; a migração de polimorfonucleares, majoritariamente eosinófilos, e de linfócitos TCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> no BALF com diminuição nos níveis das citocinas do perfil T<sub>H</sub>2 (IL-4 e IL-13); reduziu o padrão inflamatório histopatológico pulmonar e a produção de muco pelas células caliciformes presentes no pulmão. Nesse mesmo trabalho, os autores demonstraram o papel regulador do perfil T<sub>H</sub>2 de resposta do MHTP, pois, o mesmo promoveu aumento dos níveis de IFN- $\gamma$ , que participa da imunorregulação do perfil T<sub>H</sub>2 (PAIVA FERREIRA et al., 2018). Esses trabalhos e, principalmente, o de Paiva Ferreira e col. (2018) nortearam os objetivos do presente estudo

Em adição, na literatura científica, estudos envolvendo alcaloides no processo inflamatório da CARAS inexistem até o momento. Há apenas um estudo referente ao tratamento com alcaloide em modelo de rinite alérgica (VIEIRA et al., 2018), enquanto que trabalhos utilizando alcaloides em modelos experimentais de asma

são ocasionalmente encontrados (BEZERRA-SANTOS et al. 2012; FU et al., 2014; HUANG et al., 2014; ISHII et al., 2018; JI et al., 2014; KIM; HONG; LEE, 2015; KIM; LEE, 2009; LI et al., 2016b; RAYEES et al., 2015; SONG et al., 2018; ZHANG et al., 2015). Portanto, o presente estudo é pioneiro no Brasil e no mundo na busca de uma alternativa terapêutica para o tratamento da CARAS, utilizando para tanto o alcaloide sintético MHTP de alto rendimento, elucidando seus mecanismos de ação por diferentes vias de administração a fim de estabelecer uma base científica e terapêutica sólida para seus posteriores estudos clínicos na farmacoterapia da CARAS.

A rinite alérgica é caracterizada pelos sinais clínicos tais como: espirros, fricção nasal, prurido e rinorreia. No modelo murino é possível quantificar, principalmente, o espirro e a fricção nasal e no presente trabalho observamos que os animais com CARAS tratados com o MHTP (vias intranasal ou oral) apresentaram diminuição de tais sinais clínicos na terceira semana após o desafio intranasal e após o último desafio por aerossol com OVA. Sabe-se que a histamina é um dos principais mediadores responsável pelo quadro clínico da rinite alérgica, alergia alimentar, anafilaxia cutânea passiva (PCA) e anafilaxia sistêmica (KUBO, 2017) e um dos primeiros mediadores liberados durante a ativação de mastócitos teciduais e basófilos circulantes (AMIN, 2012; COSTA-PINTO et al., 2006; EIFAN; DURHAM, 2016).

A histamina, ao ser liberada pelos mastócitos e basófilos, ativa os nervos sensoriais gerando o prurido (ou fricção nasal) e vários reflexos centrais, como: reflexos motores, provocando espirros, e reflexos parassimpáticos, estimulando a hipersecreção da glândula nasal com consequente rinorreia. A inflamação alérgica provoca uma hiperresponsividade dos nervos sensoriais característica da rinite alérgica (WHEATLEY; TOGIAS, 2015). Para observar a ação do MHTP (intranasal e oral) na hiper-reatividade nasal induzida por histamina, camundongos doentes e tratados com o alcaloide apresentaram diminuição do número de espirros e de fricção nasal após a instilação com histamina exógena a partir da sua menor dose (0,1-1000 nmol) indicando redução na sensibilidade aos efeitos da histamina nesses animais provavelmente por proteger a barreira mucosa e epitelial nasal da destruição bem como a ativação neural.

Kuyama e col. (2010) demonstraram que a produção aumentada do fator de crescimento do nervo (NGF) em animais alérgicos leva a extensão da inervação sensitiva para a derme nasal ocasionando a hiperreatividade nasal (KUYAMA et al.,

2010). Em adição, observou-se que o aumento desse fator está diretamente associado à produção TNF- $\alpha$  por mastócitos ativados. Em estudos prévios demonstramos que o MHTP inibiu a produção de TNF- $\alpha$  em células imunes (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019), portanto podemos inferir que o MHTP esteja evitando a destruição da barreira epitelial nasal devido a provável inibição da produção de TNF- $\alpha$  e consequentemente diminuição da hiper-reatividade nasal induzida por histamina.

Um dos principais biomarcadores de alergias é a IgE-alérgeno específica (CASALE, 2017). A presença desse biomarcador na membrana de mastócitos durante a fase de sensibilização é essencial para que ocorra a ativação mastocitária e degranulação de histamina no contato posterior com o alérgeno (NAVINÉS-FERRER et al., 2016; PALOMARES et al., 2017b). O tratamento com o MHTP pelas vias intranasal ou oral também promoveu diminuição dos níveis de IgE total e de IgE OVA-específica nos animais com CARAS, em comparação com os animais do grupo OVA.

A diminuição dos níveis de IgE alérgeno específica, é um dado que confere aos alcaloides uma atividade antialérgica, como foi observado pelo tratamento com os alcaloides chelidonina, ligustrazina, oxymatrina, matrina, R8, sinomenina, piperina, berberina e protostemonina em modelos experimentais de asma (FU et al., 2014; HUANG et al., 2014; ISHII et al., 2018; JI et al., 2014; KIM; HONG; LEE, 2015; KIM; LEE, 2009; LI et al., 2016b; RAYEES et al., 2015; SONG et al., 2018; ZHANG et al., 2015) e com a warifteina em modelo de rinite alérgica (VIEIRA et al., 2018). Os dados desse estudo confirmam a atividade antialérgica do MHTP já descrita na literatura em modelo de inflamação pulmonar alérgica, já que o tratamento intranasal com o alcaloide diminuiu o título sérico de IgE-OVA específica utilizando o método de anafilaxia cutânea passiva (PAIVA FERREIRA et al., 2018).

Os nossos resultados assinalam que no mecanismo antialérgico do MHTP ocorre uma supressão da produção de IgE alérgeno específica pelos linfócitos B e consequente não ligação dessa imunoglobulina ao seu receptor Fc $\epsilon$ RI na membrana de mastócitos. Não havendo essa ligação, a presença sucessiva do alérgeno não promove os sinais clínicos característicos da rinite alérgica o que, por sua vez, não ocasiona o processo inflamatório com destruição epitelial da cavidade nasal. Assim sendo, os mastócitos não produziram o TNF- $\alpha$ , que participa da destruição epitelial e da mucosa nasal, impedindo então a sensibilidade nasal à histamina exógena.

No protocolo de CARAS utilizado nesse estudo foi avaliado a presença das alarminas IL-33 e TSLP com o objetivo de analisar a ativação das células epiteliais e a estimulação das células linfoides inatas de classe 2 (ILC2) e de células dendríticas, essas últimas atuando na indução da polarização do perfil T<sub>H</sub>2 durante a apresentação antigênica. Os camundongos com CARAS (grupo OVA) apresentaram aumento nos níveis dessas alarminas em comparação com os do grupo Salina (animais saudáveis). No entanto, o tratamento com o MHTP pelas vias intranasal ou oral promoveu uma redução dos níveis de ambas as alarminas. Tem sido descrito que o receptor de IL-33 (IL-33R), presente principalmente nas ILC-2 das vias aéreas, é um membro da superfamília de receptores do tipo *Toll like* (TLR/IL-1), onde a cascata de sinalização intracelular culmina na ativação dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e AP-1 através da via MyD88-IRAK1/4 e TRAF6/MAPK, respectivamente, com produção das citocinas do perfil T<sub>H</sub>2 (IL-5 e IL-13) (KUBO, 2017).

Outros estudos demonstraram que as proteases de alérgenos induzem o aumento de TSLP e IL-33 a partir do receptor PAR-2 (receptor 2 ativado por protease) acoplado a proteína G nas células epiteliais (GOON GOH et al., 2008). A ativação do PAR-2 leva ao recrutamento da proteína G, que induz o aumento dos níveis de fosfolipase C (PKC) e de Ca<sup>2+</sup> intracelular, a ativação das vias das MAPK e do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e, por sua vez, a produção das alarminas TSLP e IL-33 (KATO et al., 2007). O sinergismo entre STAT-6 e NF- $\kappa$ B induz a produção de TSLP em resposta a IL-4 pelas células epiteliais, já a acetilação de STAT-1 mediada por IFN- $\gamma$  inibe a ativação de NF- $\kappa$ B ao promover o sequestro desse no citosol, impedindo sua translocação para o núcleo (RALLABHANDI et al., 2008).

O tratamento com o alcaloide protostemonina em modelo experimental de asma foi capaz de reduzir os níveis de IL-33 no BALF de camundongos (SONG et al., 2018). Esse resultado corrobora com o do presente estudo, indicando que os alcaloides possuem ação inibidora dos processos iniciais e dos processos mantenedores da resposta imune tipo 2, característica da asma no contexto da CARAS, como doença única das vias aéreas. Os resultados do presente estudo permitem inferir que o MHTP atua, de um modo geral, na supressão da resposta imune tipo 2 nas vias aéreas, afetando a produção e liberação das alarminas (IL-33 e TSLP), indutoras da polarização e manutenção do perfil de resposta T<sub>H</sub>2.

Neste trabalho foi evidenciado que os processos de sensibilização e desafios com a OVA promovem aumento nos níveis das citocinas do perfil T<sub>H</sub>2 (IL-4, IL-13 e IL-5) no BALF, as quais orquestram toda a resposta fisiopatológica conhecida da

CARAS. No entanto, o tratamento com o MHTP pelas vias intranasal ou oral em camundongos com CARAS promoveu diminuição nos níveis dessas citocinas. Semelhantemente, estudos com os alcaloides warifteina, ligustrazina, oximatrina, matrinalina, R8, sinomenina, berberina e protostemonina também demonstraram o efeito supressor desses na produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 do perfil  $T_H2$  em modelos experimentais de asma (BEZERRA-SANTOS et al 2012; FU et al., 2014; HUANG et al., 2014; ISHII et al., 2018; JI et al., 2014; LI et al., 2016b; RAYEES et al., 2015; SONG et al., 2018; WEI et al., 2016; ZHANG et al., 2015).

Os resultados previamente mencionados corroboram com os de Paiva Ferreira e col. (2018), cujo tratamento com o MHTP por via intranasal em modelo de inflamação pulmonar alérgica reduziu os níveis de IL-4 e IL-13 presentes no BALF de animais sensibilizados com OVA (PAIVA FERREIRA et al., 2018). Isso demonstra que o MHTP pode atuar como uma provável molécula imunomoduladora do perfil  $T_H2$  de resposta, envolvido com a inibição da produção das citocinas IL-4, IL-13 e IL-5. Essas três citocinas exercem papéis essenciais nos processos iniciais de ativação da resposta imune tipo 2 e na manutenção do processo inflamatório, podendo esse provocar quadros irreversíveis de remodelamento tecidual. Assim, a inibição da produção exacerbada desses mediadores pelo MHTP deve promover uma reversão dos parâmetros inflamatórios gerais e característicos da fisiopatologia da CARAS.

A IL-4 exerce papel fundamental na estimulação dos linfócitos B via a ligação com seu receptor tipo I (IL-4R $\alpha$ / $\gamma$ c) levando à produção de IgE e IgG1 e na expressão de moléculas de adesão ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) e VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular-1) em nível endotelial, o que permite a migração e instalação de eosinófilos nas vias aéreas inflamadas (LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019). A IL-4 possui ainda um papel essencial na polarização das células  $T_H2$  e na manutenção desse perfil, uma vez que sua sinalização em células culmina na ativação de STAT-6 e do fator de transcrição GATA-3, responsáveis pela indução das citocinas clássicas do perfil  $T_H2$  (IL-4, IL-13 e IL-5) (GOUR; WILLS-KARP, 2015).

A IL-13 exerce um papel semelhante à IL-4 por compartilhar o mesmo receptor tipo II de IL-4 (IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1) e a mesma via de sinalização que ativa o STAT-6 nas células epiteliais, no músculo liso das vias aéreas, nos macrófagos tipo 2, ativados pela via alternativa (AAM), e nos fibroblastos. Estudos demonstraram que a IL-13 desempenha um papel crucial no controle da produção de muco; metaplasia das células caliciformes; hiper-reatividade brônquica (BRH), pela contração do

musculo liso das vias aéreas, e; fibrose subepitelial, pela ativação do receptor de alta afinidade à IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2) em fibroblastos, que depositam colágeno nas vias aéreas inferiores (GOUR; WILLS-KARP, 2015; LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019). Provavelmente devido a maior produção de IL-13 nas vias aéreas por T<sub>H</sub>2 e ILC2, em comparação à IL-4, essa citocina é relacionada como mantenedora dos processos inflamatórios durante a resposta imune tipo 2 (CHEN et al., 2017a; DELL'ARINGA; LEE REINHARDT, 2018; LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019).

A IL-13 induz vários genes epiteliais, tais como a Muc5ac e periostina, por mecanismos intracelulares envolvendo o STAT-6, que resulta na metaplasia das células caliciformes, aumento da produção de muco e consequente obstrução das vias aéreas e na BHR. A IL-13 aumenta a sensibilidade do músculo liso a vários agonistas contráteis, tais como a acetilcolina (Ach), histamina e leucotrienos pela ativação via ROCK-Rho, além de promover o aumento da fosforilação da cadeia leve de miosina e a liberação de cálcio mediada por CD38, que culmina na contração do músculo liso brônquico. Em adição, a IL-13 induz a deposição de colágeno o que leva, por sua vez, ao aumento da matriz extracelular via a produção de arginase I, poliaminas e prolina em macrófagos do tipo 2 (AAM), e da produção de TGF- $\beta$  por células epiteliais e monócitos/macrófagos (GOUR; WILLS-KARP, 2015; LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019). O TGF- $\beta$  induz a produção de colágeno pelos fibroblastos, culminando no enrijecimento da parede das vias aéreas (GOUR; WILLS-KARP, 2015; LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019).

No presente estudo o tratamento com o MHTP pelas vias intranasal ou oral foi capaz de reduzir os níveis de muco nas cavidades nasal e pulmonar. Na via aérea inferior, o MHTP reduziu o espessamento da camada de músculo liso brônquico decorrente de um processo de hipertrofia e/ou hiperplasia das células musculares lisas, bem como reduziu o aumento da matriz extracelular. Esses dois parâmetros culminam na BHR e no remodelamento tecidual devido a deposição de colágeno na MEC em camundongos com CARAS. Esses resultados confirmam a instalação de um processo inflamatório em toda a via aérea superior e inferior, cujo tratamento com o MHTP pela via intranasal (via aérea superior) também atuou suprimindo o processo inflamatório na via aérea inferior no protocolo experimental de CARAS.

Em protocolos experimentais de asma, os tratamentos com outros alcaloides foram capazes de reverter os parâmetros analisados no presente estudo. Por exemplo, a warifteina diminuiu a hiper-reatividade das vias aéreas à metacolina, hiperprodução de muco, e a deposição de fibras colágenas no pulmão (BEZERRA-

SANTOS et al., 2012). A protostemonina inibiu a produção de muco ao diminuir a expressão e ativação de Muc5ac (SONG et al., 2018). A sinomenina atenuou os parâmetros histopatológicos, espessura do epitélio pulmonar, espessamento do músculo liso, e a hiperplasia e/ou hipertrofia das células caliciformes e mastócitos (ISJKA et al., 2018). O R8 reduziu a resistência pulmonar à metacolina, e a hiperprodução de muco pela supressão da Muc5ac (RAYEES et al., 2015). A matrinalina reduziu a resistência das vias aéreas e a produção de muco (HUANG et al., 2014). E o MHTP administrado por via intranasal diminuiu os níveis de muco no pulmão em modelo de inflamação pulmonar alérgica (PAIVA FERREIRA et al., 2018).

Os resultados obtidos nesse estudo, portanto, confirmam a atividade supressora do MHTP nos parâmetros histopatológicos, avaliados anteriormente no modelo de inflamação pulmonar alérgica. O MHTP não só induz a reversão do processo fisiopatológico nas vias aéreas inferiores, característico da asma, como também atuou na supressão do quadro fisiopatológico nas vias aéreas superiores, característico da rinite. Em adição, os resultados aqui demonstrados inferem que a supressão nos níveis de IL-4 e IL-13 em animais com CARAS tratados com MHTP, promoveu a inibição da hiperprodução de muco, remodelamento tecidual e hiper-reatividade brônquica.

No presente estudo os níveis de IL-5 no BALF de animais doentes aumentaram em comparação com os níveis dos animais saudáveis não expostos ao alérgeno. A presença de eosinófilos aumentou em ambos os fluidos (NALF e BALF) e tecidos (nasal e pulmonar), bem como o percentual de granulócitos observado por citometria de fluxo de animais com CARAS. Na análise de citometria, foi observado um aumento da ativação das MAPK (p-ERK1/2 e p-p38) e do fator de transcrição NF- $\kappa$ B(p65) nos granulócitos do BALF nos animais doentes (grupo OVA), em comparação aos saudáveis (grupo Salina). No entanto, o tratamento com MHTP administrado por via intranasal ou oral inibiu a produção de IL-5 e a presença de eosinófilos nas vias aéreas superior e inferior. Em adição, a ativação de granulócitos (majoritariamente eosinófilos) foi inibida devido a ação supressora do MHTP sobre a ativação das MAPK (p-ERK1/2 e p-p38), em comparação com os animais do grupo OVA (doentes).

Diversos estudos utilizando alcaloides no tratamento de animais oriundos de modelos experimentais da asma demonstraram que essa classe química de moléculas apresenta papel supressor da eosinofilia nas vias áreas, decorrente da

inibição dos níveis de IL-5 (HUANG et al., 2014; JI et al., 2014; KIM; LEE, 2009; LI et al., 2016b; RAYEES et al., 2015; SONG et al., 2018). O MHTP administrado por via intranasal promoveu diminuição da eosinofilia e de granulócitos no BALF de animais expostos a OVA e submetidos a um protocolo de inflamação pulmonar alérgica (PAIVA FERREIRA et al., 2018). Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com os da literatura ao confirmar a ação inibitória do MHTP sobre a migração de granulócitos, em sua maioria eosinófilos, nas vias aéreas superior e inferior, demonstrando rara presença dessa população de leucócitos nos tecidos nasal e pulmonar no protocolo experimental de CARAS.

Neste trabalho foi demonstrado que o MHTP diminuiu a ativação das MAPK (p-ERK1/2 e p-p38) nos granulócitos do BALF de animais com CARAS, sem alterar os níveis de NF- $\kappa$ B(p65). De modo similar, o alcaloide ligustrazina foi capaz de inibir seletivamente a p38MAPK em modelo de asma alérgica (WEI et al., 2016). Entretanto, nossos resultados diferem da literatura, cujo tratamento com o MHTP em modelo de LPA promoveu uma diminuição da sinalização intracelular envolvendo TLR4-p38MAPK/NF- $\kappa$ B(p65) nas células do BALF (DO NASCIMENTO XAVIER et al., 2019). No entanto, por se tratarem de dois protocolos de doenças distintas, um desencadeado por alérgeno (CARAS) outro induzido por LPS (LPA), os granulócitos presentes no BALF também são distintos; se por um lado, a presença de eosinófilos na CARAS é majoritária, na LPA, a população neutrofílica é proeminente. Demonstra-se com isso, a atuação seletiva do MHTP na inibição das vias de sinalização intracelulares em populações distintas de granulócitos.

Os efeitos biológicos da IL-5 são direcionados para os eosinófilos, de modo que: induz a maturação na medula óssea; retarda sua morte por apoptose; aumenta sua adesão às células endoteliais, possui atividade quimiotática, e; melhora sua função efetora (MCBRIEN; MENZIES-GOW, 2017; TAKATSU; NAKAJIMA, 2008). Estudos demonstraram que a proliferação celular eosinofílica é dependente de IL-5, que se liga ao receptor IL-5R $\alpha$  presente nos eosinófilos, e promove a ativação da ERK 1/2 (TAKATSU; NAKAJIMA, 2008). As MAPK, p38 e ERK1/2, estimulam os processos de diferenciação e ativação eosinofílica, sendo ativadas por: fatores de crescimento de eosinófilos; IL-5 e eotaxina. A diferenciação de eosinófilos na medula óssea em resposta a IL-5 decorre da ativação majoritária de p38 em relação a ERK1/2. Ambas as MAPK, p38 e ERK1/2, são importantes para ativação eosinofílica, participando portanto dos processos de degranulação, locomoção, e

produção de citocinas e leucotrienos (ALAM; GORSKA, 2011; KHORASANIZADEH et al., 2017).

Os mediadores inflamatórios nos eosinófilos produzidos pela ativação das MAPK (p38 e ERK1/2) atuam no processo de BRH e remodelamento tecidual. O fator de crescimento de células tronco (SCF) promove a proliferação e ativação de mastócitos, estes produzem TNF- $\alpha$ , que danifica as células epiteliais e estimula a produção de TGF- $\beta$  (MCBRIEN; MENZIES-GOW, 2017). Os leucotrienos atuam no espessamento da camada de musculo liso brônquico e fibrose subepitelial (MCBRIEN; MENZIES-GOW, 2017). As proteínas granulares específicas de eosinófilos, principalmente a MBP (proteína básica principal) e a ECP (proteína catiônica eosinofílica), são tóxicas para o epitélio das vias aéreas, estimulam assim a produção de TGF- $\beta$  pelas células epiteliais (MCBRIEN; MENZIES-GOW, 2017). Os eosinófilos produzem IL-13, essencial nos processos de hiperprodução de muco, fibrose subepitelial e BRH (GOUR; WILLS-KARP, 2015; MCBRIEN; MENZIES-GOW, 2017).

O TGF- $\beta$  atua sobre o espessamento da membrana basal, induzindo a hipertrofia e uma maior contratilidade da musculatura lisa brônquica, cuja principal fonte de TGF- $\beta$  nas biópsias brônquicas obtidas de asmáticos são os eosinófilos (MCBRIEN; MENZIES-GOW, 2017). O TGF- $\beta$  estimula positivamente sua produção pelas células epiteliais em *feedback* positivo, estando envolvido no remodelamento tecidual via estimulação da proliferação de fibroblastos, que aumenta a produção de colágeno e glicosaminoglicanos nas vias aéreas (BRANCHETT; LLOYD, 2019; MCBRIEN; MENZIES-GOW, 2017). A IL-17 é uma citocina clássica do perfil  $T_H17$ , durante o processo inflamatório das vias aéreas e, os eosinófilos também produzem extensivamente essa citocina (ANNUNZIATO; ROMAGNANI; ROMAGNANI, 2015; GUERRA et al., 2017; MCBRIEN; MENZIES-GOW, 2017). A IL-17 estimula a produção das citocinas pró-fibróticas IL-6 e IL-11 em fibroblastos, promovendo a proliferação de fibroblastos (LAMBRECHT; HAMMAD; FAHY, 2019).

Foi constatado, neste estudo, que o tratamento com o MHTP pelas vias intranasal ou oral inibiu os níveis de TGF- $\beta$  e de IL-17 presentes no BALF de animais com CARAS. Assim como o MHTP, outros alcaloides testados em protocolos experimentais de asma promoveram a redução desses mediadores clássicos envolvidos no remodelamento das vias aéreas (FU et al., 2014; IS, IKA et al., 2018; JI et al., 2014; KIM; HONG; LEE, 2015; LI et al., 2016b; WEI et al., 2016). Diante dos dados apresentados é possível inferir que os eosinófilos dos animais

doentes tratados com o MHTP não foram estimulados e recrutados para o sítio inflamatório após a inibição da IL-5 nas vias aéreas diante da resposta imune tipo 2, característica da CARAS. Logo, foi inibida a produção de mediadores eosinofílicos, principalmente TGF- $\beta$  e IL-17, responsáveis pela manutenção e intensificação do remodelamento tecidual das vias aéreas, devido a não estimulação da via MAPK (p38 e ERK1/2) nos eosinófilos.

Uma hipótese levantada nesse estudo foi que o MHTP reverte o quadro asmático e crise alérgica da rinite induzida por OVA induzindo desvio de resposta imune para o tipo 1 (perfil T<sub>H</sub>1) que devido a produção majoritariamente de IFN- $\gamma$  suprime a resposta imune tipo 2 (perfil T<sub>H</sub>2) essa responsável por coordenar a maioria das manifestações patológicas na CARAS. A partir dos resultados foi possível afirmar que o tratamento com o MHTP, independente da via de administração reduz a secreção das citocinas IL-33, TSLP, IL-4, IL-13, IL-5, TGF- $\beta$  e IL-17 no BALF de animais expostos OVA dependente do aumento nos níveis de IFN- $\gamma$ . Outra observação que corrobora com esses dados foi a determinação da razão IFN- $\gamma$ /IL-4 que confere uma representação do balanço entre os perfis T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 e que está aumentada nesses animais. Assim, nossos resultados mostram claramente que a administração do MHTP, em animais submetidos ao protocolo experimental de CARAS, reduziu a produção das citocinas T<sub>H</sub>2 por aumentar a produção da citocina IFN- $\gamma$ .

Outros estudos demonstraram que o tratamento com os alcaloides chelidonina e ligustrazina em modelos experimentais de asma promoveram o aumento na transcrição e expressão do fator transcricional T-bet (JI et al., 2014; KIM; HONG; LEE, 2015). Fator esse essencial para a polarização do perfil T<sub>H</sub>1 e, por sua vez, para a produção de IFN- $\gamma$  e portanto, promovendo *feedback* positivo para a resposta imune tipo 1 (ANNUNZIATO; ROMAGNANI; ROMAGNANI, 2015). A produção de IFN- $\gamma$  foi aumentada pelo tratamento com o alcaloide R8, análogo da vasicina, em modelo experimental de asma (RAYEES et al., 2015) e também pelo tratamento com o MHTP, administrado por via intranasal, em modelo de inflamação pulmonar alérgica (PAIVA FERREIRA et al., 2018).

Uma das funções do IFN- $\gamma$  é ativar o sinalizador da transdução STAT-1 que, por sua vez, ativa a transcrição de T-bet. Nesse contexto, o fator transcricional Runx3 é recrutado e se liga ao gene promotor de IFN- $\gamma$ , direcionando a expressão e produção de IFN- $\gamma$  em um circuito de *feedback* positivo na produção de IFN- $\gamma$  e consequentemente o silenciamento do gene da IL-4. Desta forma, o IFN- $\gamma$

desempenha um papel central no controle da produção de IL-4 e mantém a expressão sustentada de T-bet nos linfócitos (KAK; RAZA; TIWARI, 2018). Em adição, o STAT-1 promove inibição do NF- $\kappa$ B ao se ligar à sua forma inativa no citosol, capturando e impedindo sua translocação para o núcleo. Ainda, a sinalização IFN- $\gamma$ /STAT-1 inibe a ativação do fator de transcrição AP-1 ao bloquear a sua via de ativação pelas MAPK (HU; IVASHKIV, 2009). O presente estudo demonstrou que o MHTP aumentou os níveis de IFN- $\gamma$  e a razão IFN- $\gamma$ /IL-4 no BALF de camundongos com CARAS. Inferindo que esse alcaloide atua em mecanismos intracelulares que envolvem a ativação de STAT-1, T-bet e Runx3, bem como a inibição de NF- $\kappa$ B e MAPK em linfócitos, podendo promover a sobreposição do perfil T<sub>H</sub>1 em detrimento ao T<sub>H</sub>2.

Outro mecanismo regulador do perfil T<sub>H</sub>2 pelo MHTP poderia decorrer também do aumento na produção da IL-10 ( biomarcador do perfil de células T regulatórias - T<sub>reg</sub>) pois essa citocina está associada a supressão da resposta imune tipo 2 e consequente controle das respostas alérgicas de indivíduos atópicos, a inibição na produção de IgE antígeno específica e a diminuição na liberação de citocinas pró inflamatórias em mastócitos, eosinófilos e células T (ŞAHIN et al., 2016). Um estudo demonstrou que o tratamento com o alcaloide ligustrazina aumentou os níveis de IL-10 no BALF de animais asmáticos (JI et al., 2014), e o tratamento com o alcaloide chelidonina promoveu o aumento dos níveis de Foxp3, um dos fatores de transcrição responsáveis pela produção da IL-10, em protocolo experimental de asma (KIM; HONG; LEE, 2015). Nosso estudo demonstrou que os animais doentes tratados com o MHTP (via oral) apresentaram aumento nos níveis de IL-10 no BALF quando comparados aos animais doentes (grupo OVA). Esse resultado demonstra um efeito exclusivo do MHTP administrado por via oral. Diante do exposto inferimos que a farmacocinética (tempo de absorção, taxa de metabolização hepática, formação de metabolitos secundários inativos ou ativos, excreção, dentre outros fatores) do MHTP pode contribuir para efeitos específicos de uma determinada via de administração requerida. Assim, a via oral de administração do MHTP, além de regular a resposta T<sub>H</sub>2 por aumentar os níveis de IFN- $\gamma$ , atua também na supressão de células T<sub>H</sub>2 dependente da produção de IL-10.

Finalmente, o presente estudo demonstrou a interferência do MHTP em mecanismos intracelulares de ativação dos linfócitos no BALF de animais com CARAS via sinalização intracelular envolvendo as MAPK (p-ERK1/2 e p-p38) e o fator de transcrição NF- $\kappa$ B(p65). Os níveis de linfócitos após o tratamento com o

MHTP por via intranasal permaneceram semelhantes aos do grupo OVA, tanto na contagem de leucócitos em microscopia óptica como na análise dos eventos na citometria de fluxo. Todavia, o tratamento com o alcaloide MHTP por via oral foi capaz de reduzir os linfócitos em ambas as análises. Esses resultados divergem de Paiva Ferreira e col. (2018), que demonstraram a diminuição dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> no BALF de animais expostos a ovalbumina pelo tratamento com o MHTP por via intranasal, em protocolo de inflamação alérgica pulmonar, provavelmente, devido ao tempo de exposição ao alérgeno, uma vez que em Paiva Ferreira e col. (2018) os animais foram submetidos a quatro desafios alergênicos e no presente trabalho a 14 desafios; configurando, nesse último caso, um processo inflamatório crônico das vias aéreas inferiores.

No processo de exposição dos animais à OVA observou-se ativação das MAPK (p-ERK1/2 e p-p38) nos linfócitos provenientes do BALF, entretanto, o tratamento com o MHTP pelas vias intranasal ou oral foi capaz de modular negativamente a ativação das MAPK (p-ERK1/2 e p-p38) nesses animais. Do Nascimento Xavier e col. (2019) demonstraram o papel supressor do tratamento com o MHTP (via intranasal) da p38MAPK em granulócitos oriundos do BALF de animais desafiados com LPS no modelo experimental de lesão pulmonar aguda (LPA). Portanto o conjunto de resultados sobre o MHTP confirma o potencial inibitório das MAPK (p-ERK1/2 e p-p38) independente da via de administração escolhida (via intranasal ou oral).

Vale salientar que ambas as vias de transdução de sinais p38 e ERK1/2 estimulam a produção de citocinas do perfil T<sub>H</sub>2 (IL-4, IL-13 e IL-5) em linfócitos TCD4<sup>+</sup> (KHORASANIZADEH et al., 2017), nas células B, ambas as vias participam na produção de IgE (KHORASANIZADEH et al., 2017) e a via p38MAPK promove fosforilação do GATA-3 em decorrência de sua ativação durante a ativação de células T via TCR e seus co-estimuladores CD3 e CD28 após apresentação antigênica (MANEECHOTESUWAN et al., 2007). A fosforilação do GATA-3 resulta na sua importação para o núcleo e sua ligação à região promotora dos genes das citocinas do perfil T<sub>H</sub>2. Portanto, a inibição da p38MAPK inibe a produção das citocinas do perfil T<sub>H</sub>2 (MANEECHOTESUWAN et al., 2007).

A via de sinalização Ras-ERK1/2 também estimula a polarização T<sub>H</sub>2 no desenvolvimento da asma. A ERK1/2 estabiliza o GATA-3 por inibir sua ubiquitinação, favorecendo a ação prolongada desse fator de transcrição, essencial para produção das citocinas T<sub>H</sub>2 (GOPLIN et al., 2012). Foi demonstrado que a

ERK1/2 ativa a expressão de JunB, que se liga diretamente ao promotor do gene da IL-4 no núcleo celular, favorecendo a transcrição gênica dessa citocina e, ainda promove a expressão do receptor CD44, presente nas células T<sub>H2</sub> de memória (GOPLEN et al., 2012). Portanto, concluímos que o MHTP atua em mecanismos intracelulares de modulação negativa das MAPK (p-ERK1/2 e p-p38) em linfócitos resultando na supressão das citocinas clássicas do perfil T<sub>H2</sub>.

Outro fator de transcrição importante relacionado à produção de diversas citocinas em linfócitos é o NF-κB, portanto, esse fator transcricional também foi avaliado nesse trabalho. A sensibilização e desafios com a OVA nos animais induziu aumento na expressão de NF-κB(p65) em linfócitos do BALF. Entretanto, o tratamento com o MHTP (vias intranasal ou oral) promoveu redução de NF-κB(p65), indicando que o MHTP modulou negativamente a população de linfócitos com alta expressão de NF-κB(p65) (*high*). Esses dados corroboram com os descritos por Do Nascimento Xavier e col. (2019), que demonstraram o papel supressor do MHTP (via intranasal) sobre o NF-κB(p65) em granulócitos do BALF em modelo de LPA. A berberina, outro alcaloide com o núcleo isoquinolínico também apresentou mecanismo supressor sobre o NF-κB(p65) em células do BALF de animais com asma alérgica (LI et al., 2016b).

A sinalização intracelular orientada pelo NF-κB está diretamente associada aos processos inflamatórios com transcrições gênicas de citocinas inflamatórias tais como IL-6 e IL-1β bem como de citocinas do perfil T<sub>H2</sub> tais como IL-4, IL-13 e IL-5 (LI et al., 2016b) e esses efeitos são promovidos quando o seu regulador IκB é fosforilado pela IκB quinase (IKK), que ao se dissociar de IκB, o NF-κB ativado transloca-se para o núcleo e estimula a transcrição de genes direcionados (LI et al., 2016b).

O fator de transcrição NF-κB regula vários mecanismos de desenvolvimento, ativação, diferenciação e sobrevivência das células T. Esse fator é composto por cinco subunidades: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 e NF-κB2; que podem estar homodimerizadas ou heterodimerizadas (OH; GHOSH, 2013). As subunidades p65, c-Rel e RelB contêm um domínio de ativação de transcrição e são, portanto, capazes de conduzir a transcrição gênica (OH; GHOSH, 2013). Os linfócitos T ativados via TCR/CD28 ativa a via do NF-κB inicialmente por complexos NF-κB contendo p65, sendo sustentada através de complexos contendo c-Rel (OH; GHOSH, 2013). Ainda, as vias STAT-6, NFAT, AP-1 e NF-κB induzem a expressão do GATA-3 em células T<sub>H2</sub> em um microambiente rico em IL-4. Vale, portanto,

ressaltar que o NF- $\kappa$ B é essencial para a expressão do gene GATA-3 (OH; GHOSH, 2013) que, por mecanismo de *feedback* positivo, induz a produção de IL-4 na células T<sub>H</sub>2 ativadas (OH; GHOSH, 2013).

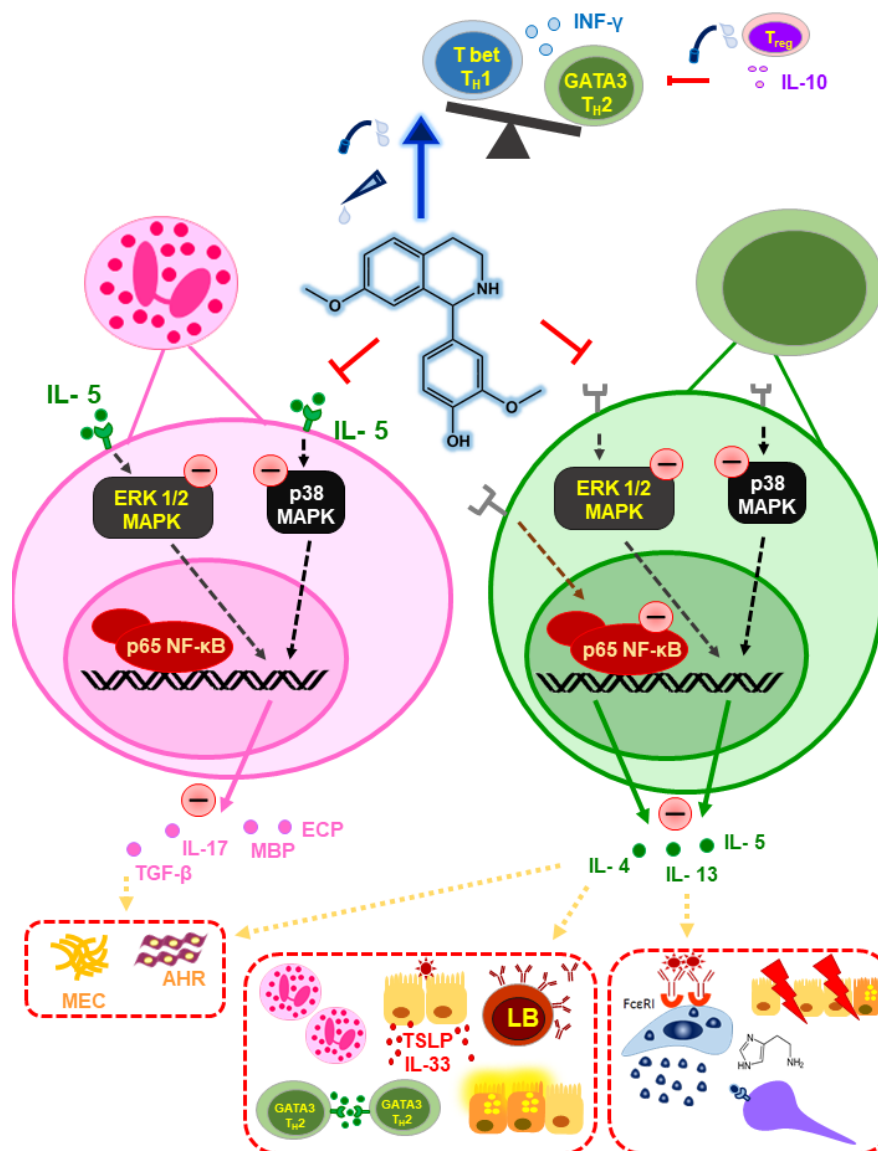
Embora sejam necessários estudos adicionais na busca de elucidar os mecanismos intracelulares do MHTP em células chaves do processo inflamatório alérgico característico na CARAS, o presente estudo apresenta bases científicas sólidas que comprovam o efeito imunomodulador do MHTP no modelo experimental de CARAS. Em resumo, o tratamento com MHTP, independente da via de administração, modulou negativamente as vias de sinalização intracelular das MAPK (p38 e ERK1/2) e do NF- $\kappa$ B(p65) em linfócitos, promovendo supressão na produção das citocinas T<sub>H</sub>2, hiperprodução de muco nas vias aéreas, diminuição dos níveis séricos de IgE OVA-específica, o que consequentemente promoveu redução dos sinais clínicos característicos da rinite alérgica e da sensibilidade à histamina. Em adição, ao modular negativamente as vias de sinalização intracelular das MAPK (p38 e ERK1/2) em granulócitos, majoritariamente eosinófilos, o tratamento com o MHTP inibiu a produção de TGF- $\beta$  e IL-17, o que levou a redução nos quadros de hiper-reatividade brônquica e remodelamento tecidual. Ademais, o MHTP atuou na redução das alarminas responsáveis pela indução da resposta imune tipo 2, característica da CARAS. Em adição, a regulação negativa do perfil T<sub>H</sub>2 induzido pelo MHTP, independente das vias de administração (via intranasal ou oral), está associada ao desvio do balanço T<sub>H</sub>1/ T<sub>H</sub>2 para T<sub>H</sub>1 pelo aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  bem como à produção de IL-10 induzida pelo tratamento com o MHTP por via oral.

Portanto, esse trabalho demonstra clara e cientificamente, de forma surpreendente, que o tratamento com o alcaloide tetrahidroisoquinolínico MHTP, independente da via de administração (intranasal ou oral) em animais com CARAS, promove melhoras clínica e histopatológica de ambas as doenças (rinite e asma) concomitantemente apresentadas e esclarece os mecanismos de imunomodulação e de sinalização intracelular que o respaldam para ser um candidato promissor a fármaco a ser testado em ensaios clínicos no controle da CARAS.

## **6. CONCLUSÃO**

O presente estudo demonstrou os mecanismos imunomoduladores do alcaloide sintético MHTP administrado pelas vias intranasal ou oral no protocolo experimental da CARAS. Tais mecanismos envolvem a supressão das vias de sinalização intracelular ERK1/2 e p38 MAPK e NF- $\kappa$ B em linfócitos e ERK1/2 e p38 MAPK em granulócitos, essencialmente eosinófilos. Com a supressão dessas vias de sinalização em linfócitos e granulócitos foi suprimido todo o quadro patológico mensurado nos fluidos biológicos e histologia (Figura 7). Além disso, foram demonstradas duas vias de regulação do perfil T<sub>H</sub>2 na resposta imune tipo 2, característica da CARAS, ativadas pelo MHTP, a regulação pelo IFN- $\gamma$  e pela IL-10 (Figura 7). Diante do exposto, conclui-se que o MHTP se apresenta como uma molécula promissora para futura inclusão no arsenal terapêutico como terapia alternativa dentro do contexto da CARAS, doença única das vias aéreas.

Figura 7. Esquema representativo dos resultados sobre os mecanismos imunomoduladores do MHTP apresentados no presente trabalho.



Os mecanismos imunomoduladores do MHTP envolvem a supressão das MAPK (p-ERK1/2 e p-p38) e p65NF-κB em linfócitos, ativadas pelo TCR; inibição da produção das citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-13 e IL-5) envolvidas nos processos fisiopatológicos da CARAS, tais como: produção de IgE pelos linfócitos B; sensibilização mastocitária (IgE-FcεRI), degranulação de histamina e indução dos sinais clínicos da Rinite; destruição do epitélio nasal e sensibilização a histamina; hiperprodução de muco; manutenção do perfil Th2; manutenção das alarminas (TSLP e IL-33) indutoras da resposta imune tipo 2, e; eosinofilia. A supressão das MAPK (p-ERK1/2 e p-p38) nos eosinófilos, via IL-5, inibiu a produção de citocinas (IL-17 e TGF-β) e proteínas (MBP e ECP) responsáveis pela manutenção da hiper-reatividade das vias aéreas (AHR) e espessamento da matriz extracelular (MEC). Por fim, como mecanismos reguladores do Th2, o MHTP induz a polarização do perfil Th1 pela produção INF-γ pelas vias de administração intranasal ou oral, esta última também induz a produção de IL-10. Fonte: Ferreira, 2020.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABE, K. et al. Synthesis and neurotoxicity of tetrahydroisoquinoline derivatives for studying Parkinson's disease. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 28, n. 8, p. 1355–62, ago. 2005.
- AGACHE, I.; AKDIS, C. A. Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine. **Allergy International**, v. 65, n. 3, p. 243–252, jul. 2016.
- ALAM, R.; GORSKA, M. M. **Mitogen-activated protein kinase signalling and ERK1/2 bistability in asthma***Clinical and Experimental Allergy*, fev. 2011.
- ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCEIRO, A. Smart drug delivery systems: from fundamentals to the clinic. **Chem. Commun.**, v. 50, n. 58, p. 7743–7765, 24 jun. 2014.
- ALVES DE ALMEIDA, A. C. et al. Recent Trends in Pharmacological Activity of Alkaloids in Animal Colitis: Potential Use for Inflammatory Bowel Disease. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2017, p. 8528210, 2017.
- AMAT, M. et al. Enantioselective, protecting group-free synthesis of 1S-ethyl-4-substituted quinolizidines. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 34, p. 6866, 8 ago. 2012.
- AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory Medicine**, v. 106, n. 1, p. 9–14, 2012.
- ANDUJAR, S. et al. Tetrahydroisoquinolines acting as dopaminergic ligands. A molecular modeling study using MD simulations and QM calculations. **Journal of Molecular Modeling**, v. 18, n. 2, p. 419–431, 27 fev. 2012.
- ANNUNZIATO, F.; ROMAGNANI, C.; ROMAGNANI, S. **The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity***Journal of Allergy and Clinical Immunology* Mosby Inc., , 1 mar. 2015.
- ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. et al. The mechanism of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines neuroprotection: the importance of free radicals scavenging properties and inhibition of glutamate-induced excitotoxicity. **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 3, p. 846–856, maio 2006.
- ASBAI. **ASBAI - Associação Brasileira de Alergia e Imunologia**. Disponível em: <<http://www.asbai.org.br/secao.asp?s=81&id=940>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- AUN, M. V. et al. Animal models of asthma: utility and limitations. **Journal of asthma and allergy**, v. 10, p. 293–301, 2017.
- BAGNASCO, D. et al. A Critical Evaluation of Anti-IL-13 and Anti-IL-4 Strategies in Severe Asthma. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 170, n. 2, p. 122–131, 2016.
- BARLOW, J. L. et al. Innate IL-13–producing nuocytes arise during allergic lung inflammation

- and contribute to airways hyperreactivity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 1, p. 191- 198.e4, jan. 2012.
- BARNES, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 183–192, 15 mar. 2008.
- BARNES, P. J. Biochemical Basis of Asthma Therapy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 38, p. 32899–32905, 23 set. 2011.
- BARNES, P. J. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 131, n. 13, p. 1541–1558, 1 jul. 2017.
- BARRETT, N. A. et al. Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 2, p. 1119–28, 15 jan. 2009.
- BERENGUER, I. et al. Tetrahydroisoquinolines as dopaminergic ligands: 1-Butyl-7-chloro-6-hydroxy-tetrahydroisoquinoline, a new compound with antidepressant-like activity in mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 14, p. 4968–4980, 15 jul. 2009.
- BEZERRA-SANTOS, C. R. et al. Effectiveness of Cissampelos sympodialis and its isolated alkaloid warifteine in airway hyperreactivity and lung remodeling in a mouse model of asthma. **International Immunopharmacology**, v. 13, n. 2, p. 148–155, 2012.
- BHATTACHARYA, S. et al. Galantamine Slows Down Plaque Formation and Behavioral Decline in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89454, 21 fev. 2014.
- BHUTADA, P. et al. Anticonvulsant activity of berberine, an isoquinoline alkaloid in mice. **Epilepsy & Behavior**, v. 18, n. 3, p. 207–210, jul. 2010.
- BLUME, C.; DAVIES, D. E. In vitro and ex vivo models of human asthma. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 2, p. 394–400, jun. 2013.
- BONAMICHI-SANTOS, R. et al. Microbiome and Asthma: What Have Experimental Models Already Taught Us? **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–8, 2015.
- BOULET, L.-P. Airway remodeling in asthma. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 24, n. 1, p. 56–62, jan. 2018.
- BOUSQUET, J. et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 108, n. 5 Suppl, p. S147-334, nov. 2001.
- BOUSQUET, J. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008\*. **Allergy**, v. 63, p. 8–160, abr. 2008.
- BOUSQUET, J. et al. MACVIA-ARIA Sentinel Network for allergic rhinitis (MASK-rhinitis): the new generation guideline implementation. **Allergy**, v. 70, n. 11, p. 1372–1392, nov. 2015.
- BOUSQUET, J. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) Phase 4 (2018): Change management in allergic rhinitis and asthma multimorbidity using mobile technology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 3, p. 864–879, 1 mar. 2019.

- BRANCHETT, W. J.; LLOYD, C. M. **Regulatory cytokine function in the respiratory tract***Mucosal Immunology*Nature Publishing Group, , 1 maio 2019.
- BRIGHTLING, C. E. et al. Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma. **Thorax**, v. 58, n. 6, p. 528–32, jun. 2003.
- BROŽEK, J. L. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines—2016 revision. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 4, p. 950–958, out. 2017.
- CALLIARI, V. M. **Princípios de Morfometria Digital Ks300 para Iniciantes - Marcelo Vidigal Caliar** | Estante Virtual. Editora da ed. Belo Horizonte: [s.n.].
- CANNING, B. J.; CHOU, Y. Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 21, n. 5, p. 702–20, out. 2008.
- CAPARROZ, F. A. et al. **Rhinitis and pregnancy: Literature review***Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*Elsevier Editora Ltda, , 1 jan. 2016.
- CARDOSO, T. DE A. et al. Impacto da asma no Brasil: análise longitudinal de dados extraídos de um banco de dados governamental brasileiro. **Jornal Brasileiro de pneumologia**, v. 43, n. 3, p. 163–168, 2017.
- CASALE, T. B. Biologics and biomarkers for asthma, urticaria, and nasal polyposis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 5, p. 1411–1421, 2017.
- CHAPMAN, D. G. et al. Animal models of allergic airways disease: where are we and where to next? **Journal of cellular biochemistry**, v. 115, n. 12, p. 2055–64, dez. 2014.
- CHEN, T. et al. PPAR- promotes type 2 immune responses in allergy and nematode infection. **Science Immunology**, v. 2, n. 9, 2017a.
- CHEN, Z. et al. Immunosuppressive effect of sinomenine in an allergic rhinitis mouse model. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 5, p. 2405–2410, 2017b.
- CHENG, S. et al. A class of novel N-(3S-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carbonyl)-l-amino acid derivatives: their synthesis, anti-thrombotic activity evaluation, and 3D QSAR analysis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 12, p. 4904–4919, 1 dez. 2009.
- CHERVINSKY, P. et al. Efficacy and safety of desloratadine/pseudoephedrine tablet, 2.5/120 mg two times a day, versus individual components in the treatment of patients with seasonal allergic rhinitis. **Allergy and asthma proceedings**, v. 26, n. 5, p. 391–6, 2005.
- CORDEIRO, M. B. **Aplicação da reação de Pictet-Spengler na síntese de alcaloides fenil tetrahidroisoquinolínicos inéditos**. [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 2012.
- COSTA-PINTO, F. A. et al. Neural Correlates of IgE-Mediated Allergy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1088, n. 1, p. 116–131, 1 nov. 2006.
- DELL'ARINCA, M.; LEE REINHARDT, R. Notch signaling represents an important checkpoint between follicular T-helper and canonical T-helper 2 cell fate article. **Mucosal Immunology**, v. 11, n. 4, p. 1079–1091, 1 jul. 2018.

- DERENDORF, H. et al. Clinical development of an advanced intranasal delivery system of azelastine hydrochloride and fluticasone propionate. **Drugs of Today**, v. 50, n. 1, p. 15, jan. 2014.
- DERENDORF, H.; MELTZER, E. O. Molecular and clinical pharmacology of intranasal corticosteroids: clinical and therapeutic implications. **Allergy**, v. 63, n. 10, p. 1292–1300, out. 2008.
- DO NASCIMENTO XAVIER, B. M. et al. MHTP, a synthetic tetratetrahydroisoquinoline alkaloid, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via p38MAPK/p65NF- $\kappa$ B signaling pathway-TLR4 dependent. **Inflammation Research**, 17 out. 2019.
- DUBOUZET, J. G. et al. Production of indole alkaloids by metabolic engineering of the tryptophan pathway in rice. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, n. 9, p. 1103–1111, dez. 2013.
- EIFAN, A. O. et al. Reduced T-bet in addition to enhanced STAT6 and GATA3 expressing T cells contribute to human allergen-induced late responses. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 42, n. 6, p. 891–900, jun. 2012.
- EIFAN, A. O.; DURHAM, S. R. Pathogenesis of rhinitis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 46, n. 9, p. 1139–1151, set. 2016.
- EL AOUAD, N. et al. Structure–activity relationship of dopaminergic halogenated 1-benzyl-tetrahydroisoquinoline derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 4616–4621, 1 nov. 2009.
- ELTBOLI, O. et al. Relationship between blood and bronchial submucosal eosinophilia and reticular basement membrane thickening in chronic obstructive pulmonary disease. **Respirology (Carlton, Vic.)**, v. 20, n. 4, p. 667–70, maio 2015.
- FAHY, J. V. Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 1, p. 57, 2015.
- FAJT, M. L.; WENZEL, S. E. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: The next steps toward personalized care. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 2, p. 299–310, fev. 2015.
- FERREIRA, L. K. D. P. **Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda e genotoxicidade do alcaloide sintético MHTP [1-(3- metoxi- 4- hidroxifenil)-7-metoxi-1, 2, 3, 4, - tetrahydroisoquinolina]**. [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, Brasil, 26 fev. 2014.
- FLOOD-PAGE, P. et al. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 7, p. 1029–1036, out. 2003.
- FORNHEM, C. et al. Allergen-induced late-phase airways obstruction in the pig: mediator release and eosinophil recruitment. **Eur Respir J**, v. 8, n. 8, p. 1100–1109, 1995.
- FRAGA RIGHETTI, R. et al. New Pharmacological Targets for Asthma Drug Development. **Journal of Allergy & Therapy**, v. 05, n. 02, p. 1–13, 25 mar. 2014.

- FU, Q. et al. Anti-asthmatic effects of matrine in a mouse model of allergic asthma. **Fitoterapia**, v. 94, p. 183–189, 2014.
- GAVETT, S. H. et al. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 5, p. 1527–36, nov. 1995.
- GEORGE, L.; BRIGHTLING, C. E. Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Therapeutic advances in chronic disease**, v. 7, n. 1, p. 34–51, jan. 2016.
- GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF- $\kappa$ B and Rel proteins: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 16, n. 1, p. 225–260, abr. 1998.
- GINA. A Pocket Guide for Health Professionals (for Adults and Children Older than 5 Years). **GINA**, p. 1–36, 2019.
- GITTO, R. et al. Synthesis and Structure–Active Relationship of 1-Aryl-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline Anticonvulsants. **CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN**, v. 58, n. 12, p. 1602–1605, 1 dez. 2010.
- GOLDSTEIN, L. H.; WEBER-SCHÖNDORFER, C.; BERKOVITCH, M. Antiasthmatic and cough medication. In: **Drugs During Pregnancy and Lactation**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 65–74.
- GÓMEZ, E. et al. Initial immunological changes as predictors for house dust mite immunotherapy response. **Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 45, n. 10, p. 1542–53, out. 2015.
- GOON GOH, F. et al. G-protein-dependent and -independent pathways regulate proteinase-activated receptor-2 mediated p65 NF $\kappa$ B serine 536 phosphorylation in human keratinocytes. **Cellular Signalling**, v. 20, n. 7, p. 1267–1274, jul. 2008.
- GOPLEN, N. et al. ERK1 is important for Th2 differentiation and development of experimental asthma. **FASEB Journal**, v. 26, n. 5, p. 1934–1945, maio 2012.
- GOULD, H. J.; SUTTON, B. J. IgE in allergy and asthma today. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 205–217, mar. 2008.
- GOUR, N.; WILLS-KARP, M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. **Cytokine**, v. 75, n. 1, p. 68–78, set. 2015.
- GOYAL, M.; SASMAL, D. CNS depressant and anticonvulsant activities of the alcoholic extract of leaves of *Zizyphus nummularia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 536–542, jan. 2014.
- GREEN, B. T. et al. Plant alkaloids that cause developmental defects through the disruption of cholinergic neurotransmission. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 99, n. 4, p. 235–246, dez. 2013.
- GREEN, R. H. et al. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of

- subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. **Thorax**, v. 57, n. 10, p. 875–9, out. 2002.
- GUERRA, E. S. et al. Central Role of IL-23 and IL-17 Producing Eosinophils as Immunomodulatory Effector Cells in Acute Pulmonary Aspergillosis and Allergic Asthma. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2017.
- GUIBAS, G. V et al. Relationship of Allergy with Asthma: There Are More Than the Allergy "Eggs" in the Asthma "Basket". **Frontiers in pediatrics**, v. 5, p. 92, 2017.
- GURISH, M. F.; AUSTEN, K. F. Developmental Origin and Functional Specialization of Mast Cell Subsets. **Immunity**, v. 37, n. 1, p. 25–33, 27 jul. 2012.
- HAENUKI, Y. et al. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 1, p. 184- 194.e11, jul. 2012.
- HAN, G.; LIU, Y.; WANG, Q. Total Synthesis of Phenanthroindolizidine Alkaloids through an Amidyl Radical Cascade/Rearrangement Reaction. **Organic Letters**, v. 15, n. 20, p. 5334–5337, 18 out. 2013.
- HELLINGS, P. W. et al. Non-allergic rhinitis: Position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. **Allergy**, v. 72, n. 11, p. 1657–1665, nov. 2017.
- HENS, G. et al. Original article: Sinonasal pathology in nonallergic asthma and COPD: ‘united airway disease’ beyond the scope of allergy. **Allergy**, v. 63, n. 3, p. 261–267, 5 dez. 2007.
- HOLGATE, S. T. et al. Asthma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15025, 10 set. 2015.
- HU, X.; IVASHKIV, L. B. **Cross-regulation of Signaling Pathways by Interferon-γ: Implications for Immune Responses and Autoimmune Diseases** **Immunity**, 16 out. 2009.
- HUANG, W. C. et al. Matrine attenuates allergic airway inflammation and eosinophil infiltration by suppressing eotaxin and Th2 cytokine production in asthmatic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 470–477, 2014.
- HUMBERT, M. et al. Omalizumab in Asthma: An Update on Recent Developments. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 2, n. 5, p. 525- 536.e1, set. 2014.
- IBIAPINA, C. DA C. et al. Rhinitis, sinusitis and asthma: hard to dissociate? **Jornal brasileiro de pneumologia: publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisilogia**, v. 32, n. 4, p. 357–66, 2006.
- IS, IKA, S. et al. Sinomenine ameliorates the airway remodelling , apoptosis of airway epithelial cells , and Th2 immune. **Allergologia et immunopathologia (Madri)**, v. 46, n. 1, p. 67–75, 2018.
- ISHIDA, W. et al. Adjuvants determine the contribution of basophils to antigen sensitization in

- vivo. **Immunology Letters**, v. 136, n. 1, p. 49–54, 30 abr. 2011.
- JATAKANON A, LIM S, B. P. Changes in Sputum Eosinophils Predict Loss of Asthma Control. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 1, p. 64–72, jan. 2000.
- JI, N. et al. Ligustrazine corrects Th1 / Th2 and Treg / Th17 imbalance in a mouse asthma model. **International Immunopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 76–81, 2014.
- JOHNSON, J. R. et al. Continuous Exposure to House Dust Mite Elicits Chronic Airway Inflammation and Structural Remodeling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 169, n. 3, p. 378–385, 1 fev. 2004.
- KAK, G.; RAZA, M.; TIWARI, B. K. **Interferon-gamma (IFN-γ): Exploring its implications in infectious diseases**Biomolecular ConceptsWalter de Gruyter GmbH, , 2018.
- KALINER, M. A. Classification of Nonallergic Rhinitis Syndromes With a Focus on Vasomotor Rhinitis, Proposed to be Known henceforth as Nonallergic Rhinopathy. **The World Allergy Organization journal**, v. 2, n. 6, p. 98–101, 15 jun. 2009.
- KALINER, M. A. et al. The efficacy of intranasal antihistamines in the treatment of allergic rhinitis. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 106, n. 2, p. S6–S11, fev. 2011.
- KAMETANI, T.; SUGI, H.; SHIBUYA, S. The absolute configuration of cryptostyline—III: Studies on the syntheses of heterocyclic compounds—CCCXC VII. **Tetrahedron**, v. 27, n. 12, p. 2409–2414, 1 jan. 1971.
- KANG, Y. J. et al. Suppression of tumor necrosis factor-α and inducible nitric oxide synthase gene expression by THI 52, a new synthetic naphthyl-benzylisoquinoline alkaloid. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 457–464, 2003.
- KATO, A. et al. TLR3- and Th2 Cytokine-Dependent Production of Thymic Stromal Lymphopoietin in Human Airway Epithelial Cells. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 2, p. 1080–1087, 15 jul. 2007.
- KAY, A. B. The early history of the eosinophil. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 45, n. 3, p. 575–582, 1 mar. 2015.
- KAY, A. B.; PHIPPS, S.; ROBINSON, D. S. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 9, p. 477–482, set. 2004.
- KHORASANIZADEH, M. H. et al. **Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for asthma**Pharmacology and TherapeuticsElsevier Inc., , 1 jun. 2017.
- KIM, C. H. et al. Co-Administration of Vaccination with DNA Encoding T Cell Epitope on the Der p and BCG Inhibited Airway Remodeling in a Murine Model of Chronic Asthma. **Journal of Asthma**, v. 43, n. 5, p. 345–353, 2 jan. 2006.
- KIM, H. J. et al. Regulation of lipopolysaccharide-induced inducible nitric-oxide synthase expression through the nuclear factor-κB pathway and interferon-beta/tyrosine kinase 2/Janus tyrosine kinase 2-signal transducer and activator of transcription-1 signaling cascades by 2-naphthylethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (THI 53), a new

- synthetic isoquinoline alkaloid. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 320, n. 2, p. 782–9, 1 fev. 2007.
- KIM, S. H.; HONG, J. H.; LEE, Y. C. Chelidonine, a principal isoquinoline alkaloid of *Chelidonium majus*, attenuates eosinophilic airway inflammation by suppressing IL-4 and eotaxin-2 expression in asthmatic mice. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 6, p. 1168–1177, 2015.
- KIM, S.; LEE, Y. Piperine inhibits eosinophil infiltration and airway hyperresponsiveness by suppressing T cell activity and Th2 cytokine production in the ovalbumin-induced asthma model. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 353–359, 2009.
- KIRSCHVINK, N. et al. Functional, inflammatory and morphological characterisation of a cat model of allergic airway inflammation. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 174, n. 3, p. 541–53, nov. 2007.
- KIRSCHVINK, N.; REINHOLD, P. Use of alternative animals as asthma models. **Current drug targets**, v. 9, n. 6, p. 470–84, jun. 2008.
- KO, Y. S. et al. A limited series of synthetic tetrahydroisoquinoline alkaloids reduce inflammatory gene iNOS via inhibition of p-STAT-1 and suppress HMGB1 secretion in LPS-treated mice lung tissue. **International Immunopharmacology**, v. 52, p. 297–304, nov. 2017.
- KRIEGER, S. M. et al. Assessment of the respiratory sensitization potential of proteins using an enhanced mouse intranasal test (MINT). **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 59, p. 165–76, set. 2013.
- KUBO, M. **Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation** *Immunological Reviews* Blackwell Publishing Ltd, , 1 jul. 2017.
- KUMAR, R. K. et al. Role of interleukin-13 in eosinophil accumulation and airway remodelling in a mouse model of chronic asthma. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 32, n. 7, p. 1104–11, jul. 2002.
- KUMAR, R. K.; HERBERT, C.; FOSTER, P. S. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. **Current drug targets**, v. 9, n. 6, p. 485–94, jun. 2008.
- KUYAMA, S. et al. Effect of 5-aminosalicylate on allergic rhinitis model in mice. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 6, p. 713–716, 2010.
- LACCOURREYE, O. et al. Benefits, limits and danger of ephedrine and pseudoephedrine as nasal decongestants. **European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases**, v. 132, n. 1, p. 31–4, fev. 2015.
- LAFORCE, C. F. et al. Efficacy of azelastine nasal spray in seasonal allergic rhinitis patients who remain symptomatic after treatment with fexofenadine. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 93, n. 2, p. 154–159, ago. 2004.

- LAMBRECHT, B. N. et al. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 1, p. 23–29, fev. 2009.
- LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The immunology of asthma. **Nature Immunology**, v. 16, n. 1, p. 45–56, 2015.
- LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H.; FAHY, J. V. The Cytokines of Asthma. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 975–991, abr. 2019.
- LEANDER, K.; LUNING, B.; RUUSA, E. Studies on Orchideaceae Alkaloids XI. Three 1-Phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines from *Cryptostylis fulva* Schltr. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 23, n. 1, p. 244–148, 1969.
- LEANDER, K.; LUNING, B.; WESTIN, L. The absolute configuration of Cryptostylis I, II and III, three 1-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines from *Cryptostylis fulva* Schltr. **Acta Chem. Scand.**, v. 27, n. 2, p. 710, 1973.
- LEDFORD, D. Inadequate diagnosis of nonallergic rhinitis: assessing the damage. **Allergy and asthma proceedings**, v. 24, n. 3, p. 155–62, 2003.
- LEUNG, J. S. et al. A systematic review of adverse drug events associated with administration of common asthma medications in children. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0182738, 9 ago. 2017.
- LI, H. et al. Intranasal administration of CpG oligodeoxynucleotides reduces lower airway inflammation in a murine model of combined allergic rhinitis and asthma syndrome. **International Immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 390–398, 2015a.
- LI, H. et al. Treatment of allergic rhinitis with CpG oligodeoxynucleotides alleviates the lower airway outcomes of combined allergic rhinitis and asthma syndrome via a mechanism that possibly involves in TSLP airway outcomes of combined allergic rhinitis and asthma sy. **Experimental Lung Research**, v. 2148, n. August, 2016a.
- LI, H. TAO et al. CpG-ODNs and Budesonide Act Synergistically to Improve Allergic Responses in Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome Induced by Chronic Exposure to Ovalbumin by Modulating the TSLP-DC-OX40L Axis. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1304–1320, 1 ago. 2018.
- LI, J.-Y. et al. Seasonal Variation of Alkaloid Contents and Anti-Inflammatory Activity of *Rhizoma coptidis* Based on Fingerprints Combined with Chemometrics Methods. **Journal of Chromatographic Science**, v. 53, n. 7, p. 1131–1139, 1 ago. 2015b.
- LI, Z. et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Berberine in the Treatment of Diabetes Mellitus. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–12, 2014.
- LI, Z. et al. Berberine improves airway inflammation and inhibits NF- $\kappa$ B signaling pathway in an ovalbumin-induced rat model of asthma. **Journal of Asthma**, v. 53, n. 10, p. 999–1005, 2016b.
- LICARI, A. et al. The Nose and the Lung: United Airway Disease? **Frontiers in Pediatrics**,

- v. 5, p. 44, mar. 2017.
- LICONA-LIMÓN, P. et al. Corrigendum: TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. **Nature Immunology**, v. 15, n. 1, p. 109–109, 18 dez. 2013.
- LUDWIG, M. et al. Affinity of 1-aryl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives to the ion channel binding site of the NMDA receptor complex. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1003–1010, ago. 2006.
- MANEECHOTESUWAN, K. et al. Regulation of Th2 Cytokine Genes by p38 MAPK-Mediated Phosphorylation of GATA-3. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 4, p. 2491–2498, 15 fev. 2007.
- MANIKANDAN A; SIVAKUMAR A. Analgesic, Anti-inflammatory and Antipyretic Evaluations of new isoquinoline derivatives. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 4, p. 339–343, 2016.
- MCBRIEN, C. N.; MENZIES-GOW, A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. **Frontiers in medicine**, v. 4, p. 93, jun. 2017.
- MEHROTRA, S. et al. Overexpression of a Catharanthus tryptophan decarboxylase (tdc) gene leads to enhanced terpenoid indole alkaloid (TIA) production in transgenic hairy root lines of Rauwolfia serpentina. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 115, n. 3, p. 377–384, 15 dez. 2013.
- MELTZER, E. et al. Clinically Relevant Effect of a New Intranasal Therapy (MP29-02) in Allergic Rhinitis Assessed by Responder Analysis. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 161, n. 4, p. 369–377, 2013.
- MELTZER, E. O. et al. Burden of allergic rhinitis: Allergies in America, Latin America, and Asia-Pacific adult surveys. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 33, n. 5, p. 113–141, 1 set. 2012.
- MELUM, G. R. et al. A thymic stromal lymphopoietin–responsive dendritic cell subset mediates allergic responses in the upper airway mucosa. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 3, p. 613– 621.e7, set. 2014.
- MURARO, A. et al. Precision medicine in patients with allergic diseases: Airway diseases and atopic dermatitis—PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 5, p. 1347–1358, maio 2016.
- NASR, W. et al. The Role of the Level of Interleukin-33 in the Therapeutic Outcomes of Immunotherapy in Patients with Allergic Rhinitis. **International Archives of Otorhinolaryngology**, 28 ago. 2017.
- NAVINÉS-FERRER, A. et al. IgE-Related Chronic Diseases and Anti-IgE-Based Treatments. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–12, 21 dez. 2016.
- NIALS, A. T.; UDDIN, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. **Disease Models and Mechanisms**, v. 1, n. 4–5, p. 213–220, 1 nov. 2008.

- OH, H.; GHOSH, S. NF- $\kappa$ B: Roles and regulation in different CD4<sup>+</sup> T-cell subsets. **Immunological Reviews**, v. 252, n. 1, p. 41–51, mar. 2013.
- OHRUI, T. et al. Vascular permeability and airway narrowing during late asthmatic response in dogs treated with Metopirone. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 89, n. 5, p. 933–43, maio 1992.
- OMS. **OMS | Asma**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/es/>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- ORTEGA, H. G. et al. Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 13, p. 1198–1207, set. 2014.
- PACHECO DE OLIVEIRA, M. T. et al. Synthesis, toxicity study and anti-inflammatory effect of MHTP, a new tetrahydroisoquinoline alkaloid. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 37, n. 4, p. 400–412, jul. 2015.
- PAIVA FERREIRA, L. K. D. et al. MHTP, 2-Methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol, a Synthetic Alkaloid, Induces IFN- $\gamma$  Production in Murine Model of Ovalbumin-Induced Pulmonary Allergic Inflammation. **Inflammation**, 2018.
- PAIVA FERREIRA, L. K. D. et al. Combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS). **International Immunopharmacology**, v. 74, p. 105718, 1 set. 2019.
- PALOMARES, O. et al. Mechanisms of immune regulation in allergic diseases: the role of regulatory T and B cells. **Immunological Reviews**, v. 278, n. 1, p. 219–236, 1 jul. 2017a.
- PALOMARES, Ó. et al. dIvergEnt: How IgE Axis Contributes to the Continuum of Allergic Asthma and Anti-IgE Therapies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1328, 21 jun. 2017b.
- PAPADOPOULOS, N. G. et al. Phenotypes and endotypes of rhinitis and their impact on management: a PRACTALL report. **Allergy**, v. 70, n. 5, p. 474–494, maio 2015.
- PARK, E. J. et al. The Heme Oxygenase-1 Inducer THI-56 Negatively Regulates iNOS Expression and HMGB1 Release in LPS- Activated RAW 264 . 7 Cells and CLP-Induced Septic Mice. v. 8, n. 10, 2013.
- PARK, J. E. et al. Enantiomers of higenamine inhibit LPS-induced iNOS in a macrophage cell line and improve the survival of mice with experimental endotoxemia. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 226–233, fev. 2006.
- PÁRRAGA, J. et al. 2,3,9- and 2,3,11-Trisubstituted tetrahydroprotoberberines as D2 dopaminergic ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 68, p. 150–166, 1 out. 2013.
- PERA, T.; PENN, R. B. Bronchoprotection and bronchorelaxation in asthma: New targets, and new ways to target the old ones. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 164, p. 82–96, ago. 2016.
- PETERS, M. et al. Influence of an Allergen-Specific Th17 Response on Remodeling of the

- Airways. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 54, n. 3, p. 350–358, mar. 2016.
- POSSA, S. S. et al. Eosinophilic inflammation in allergic asthma. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, p. 46, 2013.
- POUWER, R. H. et al. Total Synthesis of Thiaplakortone A: Derivatives as Metabolically Stable Leads for the Treatment of Malaria. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 2, p. 178–182, 13 fev. 2014.
- PRATA, L. O. et al. Original Research: ACE2 activator associated with physical exercise potentiates the reduction of pulmonary fibrosis. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 242, n. 1, p. 8–21, jan. 2017.
- PYO, M. K. et al. Enantioselective synthesis of (R)-(+)- and (S)-(-)-higenamine and their analogues with effects on platelet aggregation and experimental animal model of disseminated intravascular coagulation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 14, p. 4110–4114, 15 jul. 2008.
- RALLABHANDI, P. et al. Analysis of proteinase-activated receptor 2 and TLR4 signal transduction: A novel paradigm for receptor cooperativity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 36, p. 24314–24325, 5 set. 2008.
- RATNER, P. H. et al. Use of intranasal cromolyn sodium for allergic rhinitis. **Mayo Clinic proceedings**, v. 77, n. 4, p. 350–4, abr. 2002.
- RAYEES, S. et al. Therapeutic effects of R8, a semi-synthetic analogue of Vasicine, on murine model of allergic airway inflammation via STAT6 inhibition. **International Immunopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 246–256, 2015.
- REGATEIRO, F.; LUÍSA MOURA, A.; FARIA, E. Novel biologicals for the treatment of asthma. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, v. 25, n. 2, p. 99–113, 2017.
- REN, M. et al. *Mahuang Fuzi Xixin* Decoction Attenuates Th1 and Th2 Responses in the Treatment of Ovalbumin-Induced Allergic Inflammation in a Rat Model of Allergic Rhinitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1–12, 2017.
- ROBERTS, G. et al. Paediatric rhinitis: position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. **Allergy**, v. 68, n. 9, p. n/a-n/a, ago. 2013.
- ROSARIA GITTO, \*,† et al. Novel Potent Anticonvulsant Agent Containing a Tetrahydroisoquinoline Skeleton. 2006.
- RUBINI, N. D. P. M. et al. Guia prático sobre controle ambiental para pacientes com rinite alérgica. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 1, n. 1, p. 7–22, 2017.
- RUIZ, M. E.; SCIOLI MONTOTO, S. Routes of Drug Administration. In: **ADME Processes in Pharmaceutical Sciences**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 97–133.
- SAGAR, S.; AKBARSHAHI, H.; ULLER, L. Translational value of animal models of asthma: Challenges and promises. **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 272–277, 15 jul. 2015.

- ŞAHİN, E. et al. Mechanism of Action of Allergen Immunotherapy. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v. 30, n. 5\_suppl, p. S1–S3, set. 2016.
- SAKANO, E. et al. IV Consenso Brasileiro sobre Rinites 2017. **Documento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia, Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial e Sociedade Brasileira de Pediatria.**, p. 1–43, 2017.
- SAKANO, E. et al. Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY IV Brazilian Consensus on Rhinitis-an update on allergic rhinitis. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 84, n. 1, p. 3–14, 2018.
- SAMOLIŃSKI, B.; NOWICKA, A. Is the use of intranasal glucocorticosteroids (inGCSS) in children safe? **Otolaryngologia Polska**, v. 69, n. 1, p. 6–6, 1 jan. 2015.
- SANO, K. et al. Ovalbumin (OVA) and *Mycobacterium tuberculosis* Bacilli Cooperatively Polarize Anti-OVA T-helper (Th) Cells toward a Th1-Dominant Phenotype and Ameliorate Murine Tracheal Eosinophilia. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 20, n. 6, p. 1260–1267, 14 jun. 1999.
- SASTRE, J.; MOSGES, R. Local and systemic safety of intranasal corticosteroids. **Journal of investigational allergology & clinical immunology**, v. 22, n. 1, p. 1–12, 2012.
- SCHULIGA, M.; MICHAEL. NF-kappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease. **Biomolecules**, v. 5, n. 4, p. 1266–1283, 26 jun. 2015.
- SHAKOORY, B. et al. The Role of Human Mast Cell-Derived Cytokines in Eosinophil Biology. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 24, n. 5, p. 271–281, maio 2004.
- SHAPIRO, S. D. The use of transgenic mice for modeling airways disease. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 21, n. 5, p. 699–701, out. 2008.
- SIDDIQUI, S. et al. Airway hyperresponsiveness is dissociated from airway wall structural remodeling. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 122, n. 2, p. 335–41, 341.e1–3, ago. 2008.
- SIMONS, F. E. R.; SIMONS, K. J. Histamine and H1-antihistamines: Celebrating a century of progress. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 6, p. 1139–1150.e4, dez. 2011.
- SINGH, I. P.; SHAH, P. Tetrahydroisoquinolines in therapeutics: a patent review (2010–2015). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 1, p. 17–36, 2 jan. 2016.
- SIVA, R. et al. Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD: a randomised controlled trial. **European Respiratory Journal**, v. 29, n. 5, p. 906–913, 1 maio 2007.
- SOLÉ, D. et al. III Consenso Brasileiro sobre Rinites. **Otorhinolaryngology Otorhinolaryngology Otorhinolaryngology Brazilian Journal of Brazilian Journal of Brazilian Journal**, v. 75, n. 6, p. 1–52, 2012.
- SONG, Y. et al. Protostemonine attenuates alternatively activated macrophage and DRA-induced asthmatic inflammation. **Biochemical Pharmacology**, v. 155, p. 198–206, 1 set.

- 2018.
- SOUTO, A. L. et al. Anti-inflammatory activity of alkaloids: An update from 2000 to 2010. **Molecules**, v. 16, n. 10, p. 8515–8534, 2011.
- STOCK, P. et al. CD8+ T cells regulate immune responses in a murine model of allergen-induced sensitization and airway inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 7, p. 1817–1827, jul. 2004.
- STÖCKIGT, J. et al. The pictet-spengler reaction in nature and in organic chemistry. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 37, p. 8538–8564, 2011.
- SUN, D. et al. Matrine suppresses airway inflammation by downregulating SOCS3 expression via inhibition of NF-κB signaling in airway epithelial cells and asthmatic mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 477, n. 1, p. 83–90, 2016.
- SZELENYI, I. Animal models of bronchial asthma. **Inflammation Research**, v. 49, n. 12, p. 639–654, 1 dez. 2000.
- TADEUSZ ANISZEWSKI. **Alkaloids Chemistry, Biology, Ecology, and Applications**. [s.l.] Elsevier B.V., 2015.
- TAKAHASHI, G. et al. Effect of the potent and selective DP1 receptor antagonist, asapiprant (S-555739), in animal models of allergic rhinitis and allergic asthma. **European Journal of Pharmacology**, v. 765, p. 15–23, 15 out. 2015.
- TAKATSU, K.; NAKAJIMA, H. **IL-5 and eosinophilia** *Current Opinion in Immunology*, jun. 2008.
- TAKAZONO, T.; SHEPPARD, D. C. *Aspergillus* in chronic lung disease: Modeling what goes on in the airways. **Medical Mycology**, v. 55, n. 1, p. 39–47, 1 jan. 2017.
- TANG, H. et al. TLR4 antagonist ameliorates combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) by reducing inflammatory monocytes infiltration in mice model. **International Immunopharmacology**, v. 73, p. 254–260, 1 ago. 2019.
- TANG, Y. et al. Antigen-specific effector CD8 T cells regulate allergic responses via IFN-γ and dendritic cell function. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 6, p. 1611- 1620.e4, jun. 2012.
- TOHIDINIK, H. R.; MALLAH, N.; TAKKOUICHE, B. History of allergic rhinitis and risk of asthma; a systematic review and meta-analysis. **World Allergy Organization Journal**, v. 12, n. 10, 1 out. 2019.
- TRAN, N. P.; VICKERY, J.; BLAISS, M. S. Management of rhinitis: allergic and non-allergic. **Allergy, asthma & immunology research**, v. 3, n. 3, p. 148–56, jul. 2011.
- TSOYI, K. et al. HO-1 and JAK-2/STAT-1 signals are involved in preferential inhibition of iNOS over COX-2 gene expression by newly synthesized tetrahydroisoquinoline alkaloid, CKD712, in cells activated with lipopolysacchride. **Cellular Signalling**, v. 20, p. 1839–1847, 2008a.

- TSOYI, K. et al. Upregulation of PTEN by CKD712, a synthetic tetrahydroisoquinoline alkaloid, selectively inhibits lipopolysaccharide-induced VCAM-1 but not ICAM-1 expression in human endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 207, n. 2, p. 412–9, 1 dez. 2008b.
- TULLY, J. E. et al. Epithelial NF-κB orchestrates house dust mite-induced airway inflammation, hyperresponsiveness, and fibrotic remodeling. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 191, n. 12, p. 5811–21, 15 dez. 2013.
- UMETSU, D. T.; DEKRUYFF, R. H. The regulation of allergy and asthma. **Immunological Reviews**, v. 212, n. 1, p. 238–255, ago. 2006.
- VAN DER WERP, H. B. et al. Can Animal Models of Disease Reliably Inform Human Studies? **PLoS Medicine**, v. 7, n. 3, p. e1000245, 30 mar. 2010.
- VAN HELDEN, M. J.; LAMBRECHT, B. N. Dendritic cells in asthma. **Current Opinion in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 745–754, 2013.
- VAN RIJT, L. S. et al. Airway eosinophils accumulate in the mediastinal lymph nodes but lack antigen-presenting potential for naive T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 7, p. 3372–8, out. 2003.
- VAN RIJT, L. S. et al. A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. **Journal of Immunological Methods**, v. 288, n. 1–2, p. 111–121, maio 2004.
- VIEIRA, G. C. et al. Warifteine, an alkaloid of *Cissampelos sympodialis*, modulates allergic profile in a chronic allergic rhinitis model. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 1, p. 50–56, 2018.
- VUURMAN, E. F. P. M. et al. Allergic rhinitis is a risk factor for traffic safety. **Allergy**, v. 69, n. 7, p. 906–912, jul. 2014.
- WAGERS, S. et al. The allergic mouse model of asthma: normal smooth muscle in an abnormal lung? **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 6, p. 2019–2027, jun. 2004.
- WANG, X. et al. Potent ameliorating effect of Hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) antagonist YC-1 on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) in Rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 788, p. 343–350, 2016.
- WANGCHUK, P. et al. Anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-acetylcholinesterase activities of two isoquinoline alkaloids-scoulerine and cheilanthifoline. **Natural Product Communications: an international journal for communications and reviews**, v. 11, n. 12, p. 1801–1804, 2016.
- WEI, C. The efficacy and safety of H1-antihistamine versus Montelukast for allergic rhinitis: A systematic review and meta-analysis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 989–997, out. 2016.
- WEI, Y. et al. Ligustrazine attenuates inflammation and the associated chemokines and receptors in ovalbumine-induced mouse asthma model. **Environmental Toxicology and**

- Pharmacology**, v. 46, p. 55–61, 2016.
- WHEATLEY, L. M.; TOGIAS, A. Allergic Rhinitis. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 5, p. 456–463, 29 jan. 2015.
- WHITE, M. V. The role of histamine in allergic diseases. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 86, n. 4 PART 2, p. 599–605, 1990.
- WHO. **WHO | Asthma (World Health Organization)**. Disponível em: <<http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- WYNN, T. A. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 5, p. 271–282, 17 maio 2015.
- XU, Y.; ZHANG, J.; WANG, J. The efficacy and safety of selective H1-antihistamine versus leukotriene receptor antagonist for seasonal allergic rhinitis: a meta-analysis. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112815, 2014.
- YOSHIMOTO, T. et al. Basophils contribute to TH2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide–MHC class II complexes to CD4+ T cells. **Nature Immunology**, v. 10, n. 7, p. 706–712, 24 jul. 2009.
- YOUSEFI, S.; SIMON, D.; SIMON, H.-U. Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 6, p. 736–739, dez. 2012.
- YUN-CHOI, H. S. et al. Antithrombotic effects of YS-49 and YS-51--1-naphthylmethyl analogs of higenamine. **Thrombosis research**, v. 104, n. 4, p. 249–55, 15 nov. 2001.
- ZANGARA, A. The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 75, n. 3, p. 675–86, jun. 2003.
- ZHANG, T. Z. et al. Anti-asthmatic effects of oxymatrine in a mouse model of allergic asthma through regulating CD40 signaling. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 5, p. 368–374, 2015.
- ZHANG, Z. et al. Higenamine promotes M2 macrophage activation and reduces Hmgb1 production through HO-1 induction in a murine model of spinal cord injury. **International Immunopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 681–687, dez. 2014.
- ZHANG, Z. et al. Dietary fiber intake regulates intestinal microflora and inhibits ovalbumin-induced allergic airway inflammation in a mouse model. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2016.
- ZOSKY, G. R.; SLY, P. D. Animal models of asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 37, n. 7, p. 973–988, jul. 2007.
- ZUBERBIER, T. et al. Economic burden of inadequate management of allergic diseases in the European Union: a GA<sup>2</sup> LEN review. **Allergy**, v. 69, n. 10, p. 1275–1279, out. 2014.

## ANEXO 1: CERTIFICADO CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Efeito do alcaloide sintético tetrahydroisoquinolinico MHTP em modelo experimental de CARAS (Síndrome da Asma e Rinite Alérgica Combinada)”, protocolo nº 165/2015 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. **Marcia Regina Piuvezam** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado *ad referendum* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

|                     |                                                                                        |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Vigência do Projeto | 2015 a 2019                                                                            |
| Espécie/linhagem    | Camundongos BALB/C ( <i>Mus musculus</i> )<br>Rato Wistar ( <i>Rattus norvegicus</i> ) |
| Número de animais   | 234 camundongos<br>47 ratos                                                            |
| Idade/Peso          | Camundongos 6 a 8 semanas/ 20 a 25 g<br>Ratos 6 a 8 semanas/ 150 a 170 g               |
| Sexo                | Fêmeas                                                                                 |
| Origem              | Biotério Prof. Thomas George                                                           |

*Islandia Giselia Albuquerque Gonçalves*  
Prof. Dra. Islandia Giselia Albuquerque Gonçalves  
Coordenadora da CEUA-UFPB  
Prof. Dr. Islandia G. A. Gonçalves  
Coordenadora CEUA-UFPB  
SIAPE 3366301

**ANEXO 2: PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO (2016-2020)**

**1. TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS INDEXADOS  
= 6 trabalhos, dos quais 2 é de primeira autoria.**

**1.1.** Bianka Márcia do Nascimento Xavier, Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira, **Laércia Karla Diega Paiva Ferreira**, Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha, Talissa Mozzini Monteiro, Luiz André de Araújo Silva, Luís Cesar Rodrigues, Marcia Regina Piuvezam. MHTP, a synthetic tetrahydroisoquinoline alkaloid, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via p38MAPK/p65NF- $\kappa$ B signaling pathway-TLR4 dependent. *Inflammation Research*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01291-3>. **October 2019. F.I. 3.061.**

**1.2.** **Laércia K.D. Paiva Ferreira**, Larissa A.M. Paiva Ferreira, Talissa M. Monteiro, Grasiela Costa Bezerra, Larissa Rodrigues Bernardo, Marcia Regina Piuvezam. Combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS). *International Immunopharmacology*. DOI: [doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105718](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105718), v. 74, 105718, **September 2019. F.I. 3,361.**

**1.3.** **Laércia K. D. Paiva Ferreira**, Larissa A. M. Paiva Ferreira, Adriano Francisco Alves, Fagner Carvalho Leite, Luiz A. de Araújo Silva, Giciane Carvalho Vieira, Luís Cesar Rodrigues and Marcia Regina Piuvezam. MHTP, 2-Methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol, a Synthetic Alkaloid Induces IFN- $\gamma$  Production in Murine Model of Ovalbumin-Induced Pulmonary Allergic Inflammation. *Inflammation*. DOI:10.1007/s10753-018-0855-y, **2018. F.I. 2,939.**

**1.4.** Giciane C. Vieira, Francisco A.A.F. Gadelha, Raquel F. Pereira, **Laércia K.D.P. Ferreira**, José M. Barbosa-Filho, Patricia T. Bozza, Marcia R. Piuvezam. Warifteine, an alkaloid of *Cissampelos sympodialis*, modulates allergic profile in a chronic allergic rhinitis model. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.10.009>. (28):50-56, **2018. F.I. 1,754.**

**1.5.** José Guilherme F. M. Galvão; Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva; Deyse Cristina M. Carvalho; **Laércia Karla D. P. Ferreira**; Talissa Mozzini Monteiro; Adriano Francisco Alves; Larissa Adilis M. P. Ferreira; Francisco Allysson A. F.

Gadelha; Marcia Regina Piuvezam; Sandra Rodrigues-Mascarenhas. Ouabain attenuates ovalbumin-induced airway inflammation. *Inflammation Research*. DOI: 10.1007/s00011-017-1092-9. v. 66, p. 1117, **2017. F.I. 3,061.**

**1.6.** Mateus Feitosa Alves, Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira, Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha, **Laércia Karla Diega Paiva Ferreira**, Mayara Barbalho Felix, Marcus Tullius Scotti, Luciana Scotti, Kardilândia Mendes de Oliveira, Sócrates Golzio dos Santos & Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz. Toxicological evaluation in silico and in vivo of secondary metabolites of *Cissampelos sympodialis* in Mus musculus mice following inhalation. *Natural Product Research*. DOI: 10.1080/14786419.2017.1410805. Dec 4:1-7, **2017. F.I.1,828.**

## **2. CAPÍTULOS DE LIVRO COM ISBN = 12**

**2.1.** OLIVEIRA, J. B.; VIEIRA, C. I. D.; DE LIMA, L. M.; **FERREIRA, L. K. D. P.;** PIUVEZAM, M. R. AVALIAÇÃO DE PARAMÊTROS INFLAMATÓRIOS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICA COMBINADAS (CARAS). Submetido a FARMÁCIA: TECNOLOGIA A SERVIÇO DA SAÚDE, 1. 1ed.: v. 1, (13):p. 240-257. ISBN: 978-85-53005-25-3, **2020.**

**2.2.** BEZERRA, G. C.; **FERREIRA, L. K. D. P.;** FERREIRA, L. A. M. P.; BERNARDO, L. R.; MONTEIRO, T. M.; FATORES DE TRANSCRIÇÃO E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULARES ENVOLVIDAS NA ASMA ALÉRGICA. Submetido a FARMÁCIA: TECNOLOGIA A SERVIÇO DA SAÚDE, 1. 1ed.: v. 1, (24):p. 459-482. ISBN: 978-85-53005-25-3, **2020.**

**2.3.** **FERREIRA, L. K. D. P.;** MONTEIRO, T. M.; BEZERRA, G. C.; FERREIRA, L. A. M. P.; PIUVEZAM, M. R. QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS NA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA. Submetido a FARMÁCIA INTERATIVA 1. 1ed.: v. 1, (1):p. 20-38. ISBN: 978-85-53005-16-1, **2019.**

**2.4.** FERREIRA, L. A. M. P.; MONTEIRO, T. M.; **FERREIRA, L. K. D. P.;** BEZERRA, G. C.; PIUVEZAM, M. R. AVALIAÇÃO DA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL QUANTO À PARÂMETROS DE ANSIEDADE. Submetido a

FARMÁCIA INTERATIVA 1. 1ed.: v. 1, (12):p. 245-263. ISBN: 978-85-53005-16-1, **2019**.

**2.5.** MONTEIRO, T. M.; **FERREIRA, L. K. D. P.**; FERREIRA, L. A. M. P.; BEZERRA, G. C.; PIUVEZAM, M. R. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PELO DESAFIO COM OVALBUMINA EM MODELO MURINO DE ASMA ALÉRGICA. Submetido a FARMÁCIA INTERATIVA 1. 1ed.: v. 1, (65):p. 1294-1311. ISBN: 978-85-53005-16-1, **2019**.

**2.6.** **LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA**; BIANKA MARCIA DO NASCIMENTO XAVIER, LARISSA ADILIS MARIA PAIVA FERREIRA, JOSE MARIA BARBOSA FILHO, CLAUDIO ROBERTO BEZERRA-SANTOS and MARCIA REGINA PIUVEZAM. Biological and Immunological roles of Alkaloids. Submetido a NATURAL PRODUCTS AND DRUG DISCOVERY. 1ed.: v. 1, (11). ISBN: 978-85-237-1360-7, **2018**.

**2.7.** **FERREIRA, L. K. D. P.**; FERREIRA, L. A. M. P.; MONTEIRO, T. M.; ALVES, A. F.; PIUVEZAM, M. R. ANÁLISE COMPARATIVA DOS PARÂMETROS ENVOLVIDOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE ASMA ALÉRGICA. Submetido a SAÚDE OS DESAFIOS DO MUNDO CONTEMPORÂNEO 3. 2ed.: v. 3, (2):p. 34-52. ISBN: 978-85-53005-08-6, **2018**.

**2.8.** FERREIRA, L. A. M. P.; **FERREIRA, L. K. D. P.**; MONTEIRO, T. M.; ALVES, A. F.; PIUVEZAM, M. R. IMPLANTAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE RINITE ALÉRGICA NO LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA DA UFPB. Submetido a SAÚDE OS DESAFIOS DO MUNDO CONTEMPORÂNEO 3. 2ed.: v. 3, (5):p. 94-115. ISBN: 978-85-53005-08-6, **2018**.

**2.9.** CAVALCANTE-SILVA, L. H. A; **FERREIRA, L. K. D. P.**; DIAS, C. N.S; SILVA, B.A. PAPEL DOS RECEPTORES COLINÉRGICOS NICOTÍNICOS EM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO. Submetido a SAÚDE OS DESAFIOS DO MUNDO CONTEMPORÂNEO 3. 2ed.: v. 3, (7):p. 132-151. ISBN: 978-85-53005-08-6, **2018**.

**2.10.** MONTEIRO, T. M.; **FERREIRA, L. K. D. P.**; FERREIRA, L. A. M. P.; BEZERRA, G. C.; PIUVEZAM, M. R. RINITE: NOVAS ABORDAGENS E SEUS

ENDOTIPOS. Submetido a SAÚDE OS DESAFIOS DO MUNDO CONTEMPORÂNEO 3. 2ed.: v. 3, (13):p. 254-268. ISBN: 978-85-53005-08-6, **2018**.

**2.11.** FERREIRA, L. A. M. P.; LEITE, F. C.; **FERREIRA, L. K. D. P.**; MONTEIRO, T. M.; PIUVEZAM, M. R. EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO MONOTERPENO 1,4-CINEOL. EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO MONOTERPENO 1,4-CINEOL. Submetido a Saúde e Meio Ambiente 4. 1ed.: v. 4, (20) p. 355-371. ISBN: 978-85-92522-14-8, **2017**.

**2.12.** MONTEIRO, T. M.; **FERREIRA, L. K. D. P.**; FERREIRA, L. A. M. P.; LEITE, F. C.; PIUVEZAM, M. R. ASMA: NOVAS ABORDAGENS E ASPECTOS NEUROIMUNOLÓGICOS. Submetido a Saúde e Meio Ambiente 4. 1ed. João Pessoa: v. 4, (23) p. 412-428. ISBN: 978-85-92522-14-8, **2017**.

### **3. CAPÍTULO DE LIVRO COM DOI = 1**

**3.1.** MARCIA REGINA PIUVEZAM, **LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA**, TALISSA MOZZINI MONTEIRO, GICIANE CARVALHO VIEIRA AND CLAUDIO ROBERTO BEZERRA-SANTOS. Severe Asthma: Updated Therapy Approach Based on Phenotype and Biomarker. DOI: doi.org/10.5772/intechopen 74775, Chapter 8, p.125-146. **2018**.

### **4. PATENTES = 1**

**4.1.** BIANKA MÁRCIA DO NASCIMENTO XAVIER, LUIS CEZAR RODRIGUES, **LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA**, MARCIA REGINA PIUVEZAM, MARIA TALITA PACHECO DE OLIVEIRA, LUIZ ANDRÉ DE ARAÚJO SILVA, MANUELA BARBOSA CORDEIRO. ALCALOIDE SINTÉTICO DENOMINADO MHTP PARA O TRATAMENTO DE INFLAMAÇÃO. Registrado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) em 27/07/2016. Nº BR102016018225-5. Universidade Federal da Paraíba, **2016**.

### **5. COMUNICAÇÕES ORAIS EM EVENTOS CIENTÍFICOS**

**5.1. INTERNACIONAIS = 5**

**5.1.1.** OLIVEIRA, J. B.; VIEIRA, C. I. D.; DE LIMA, L. M.; **FERREIRA, L. K. D. P.**; PIUVEZAM, M. R. AVALIAÇÃO DE PARAMÊTROS INFLAMATÓRIOS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICA COMBINADAS (CARAS). In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2019.

**5.1.2.** BEZERRA, G. C.; **FERREIRA, L. K. D. P.**; FERREIRA, L. A. M. P.; BERNARDO, L. R.; MONTEIRO, T. M.; FATORES DE TRANSCRIÇÃO E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULARES ENVOLVIDAS NA ASMA ALÉRGICA. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2019.

**5.1.3.** **FERREIRA, L. K. D. P.**; MONTEIRO, T. M.; BEZERRA, G. C.; FERREIRA, L. A. M. P.; PIUVEZAM, M. R. QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS NA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2018.

**5.1.4.** FERREIRA, L. A. M. P.; MONTEIRO, T. M.; **FERREIRA, L. K. D. P.**; BEZERRA, G. C.; PIUVEZAM, M. R. AVALIAÇÃO DA ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL QUANTO À PARÂMETROS DE ANSIEDADE. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2018.

**5.1.5.** MONTEIRO, T. M.; **FERREIRA, L. K. D. P.**; FERREIRA, L. A. M. P.; BEZERRA, G. C.; PIUVEZAM, M. R. ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PELO DESAFIO COM OVALBUMINA EM MODELO MURINO DE ASMA ALÉRGICA. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, 2018.

**5.2. NACIONAIS = 6**

**5.2.1.** JOÃO BATISTA DE OLIVEIRA, COSMO ISAÍAS DUVIRGENS, LOUISE MANGUEIRA DE LIMA, RITA DE CÁSSIA DE SENA DOS SANTOS e **orientado por LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA**. ALCALOIDES NATURAIS DE PLANTAS PARAIBANAS E ALCALOIDES SINTÉTICOS COMO PERSPECTIVA TERAPÊUTICA PARA MANEJO DA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICA COMBINADAS (CARAS). In: IV Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências, CAMPINA GRANDE, 2019.

**5.2.2. FERREIRA, L. K. D. P.;** FERREIRA, L. A. M. P.; MONTEIRO, T. M.; ALVES, A. F.; PIUVEZAM, M. R. ANÁLISE COMPARATIVA DOS PARÂMETROS ENVOLVIDOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE ASMA ALÉRGICA. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, **2017**.

**5.2.3. FERREIRA, L. A. M. P.;** **FERREIRA, L. K. D. P.;** MONTEIRO, T. M.; ALVES, A. F.; PIUVEZAM, M. R. IMPLANTAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE RINITE ALÉRGICA NO LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA DA UFPB. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, **2017**.

**5.2.4. MONTEIRO, T. M.;** **FERREIRA, L. K. D. P.;** FERREIRA, L. A. M. P.; BEZERRA, G. C.; PIUVEZAM, M. R. RINITE: NOVAS ABORDAGENS E SEUS ENDOTIPOS. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, **2017**.

**5.2.5. FERREIRA, L. A. M. P.;** LEITE, F. C.; **FERREIRA, L. K. D. P.;** MONTEIRO, T. M.; PIUVEZAM, M. R. EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO MONOTERPENO 1,4-CINEOL. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, **2016**.

**5.2.6. MONTEIRO, T. M.;** **FERREIRA, L. K. D. P.;** FERREIRA, L. A. M. P.; LEITE, F. C.; PIUVEZAM, M. R. ASMA: NOVAS ABORDAGENS E ASPECTOS NEUROIMUNOLÓGICOS. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, **2016**.

## **6. COMUNICAÇÕES EM PÔSTER EM EVENTOS CIENTÍFICOS**

### **6.1. INTERNACIONAIS = 10**

**6.1.1. LUIS RODRIGUES, MARCIA PIUVEZAM, LAERCIA FERREIRA,** LARISSA FERREIRA, TALISSA MONTEIRO, GRASIELA BEZERRA, LARISSA BERNARDO, LUIZ SILVA, RAMON PEREIRA, LOUISE DE LIMA, JOÃO DE OLIVEIRA, ADRIANO ALVES. MHTP, SYNTHETIC TETRAHYDROISOQUINOLINE ALKALOID, INHIBITS EOSINOPHIL FUNCTION VIA MAP KINASES (P38 AND ERK1 / 2) PATHWAY IN EXPERIMENTAL COMBINED ALLERGIC RHINITIS AND ASTHMA SYNDROME (CARAS). In: 12th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), RIBEIRÃO PRETO, **2019**.

**6.1.2.** LARISSA BERNARDO, **LAERCIA FERREIRA**, LARISSA FERREIRA, COSMO VIEIRA, LOUISE DE LIMA, JOÃO DE OLIVEIRA, GRASIELA BEZERRA, ADRIANO ALVES, MARCIA PIUVEZAM. 4-CARVOMENTHENOL, A MONOTERPENE OF ESSENTIAL OILS, ATTENUATES THE ANAPHYLACTIC SHOCK REACTION BY DECREASING THE MAST CELL DEGRANULATION PROCESS IN MICE. In: 12th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), RIBEIRÃO PRETO, **2019**.

**6.1.3.** GRASIELA BEZERRA, LARISSA FERREIRA, **LAERCIA FERREIRA**, TALISSA MONTEIRO, LARISSA BERNARDO, LOUISE DE LIMA, JOÃO DE OLIVEIRA, COSMO VIEIRA, ADRIANO ALVES, RAMON PEREIRA, MARCIA PIUVEZAM. 4-CARVOMENTHENOL, A MONOTERPENE OF ESSENTIAL OILS, REDUCES AIRWAY INFLAMMATION BY INCREASING IL-10 LEVEL, IN EXPERIMENTAL MODEL OF COMBINED ALLERGIC RHINITIS AND ASTHMA SYNDROME (CARAS). In: 12th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), RIBEIRÃO PRETO, **2019**.

**6.1.4.** FERREIRA, L. A. M. P.; **FERREIRA, L. K. D. P.**; MONTEIRO, T. M.; ALVES, A. F.; XAVIER, B. M. N.; BEZERRA, G. C.; SILVA, L. A. A.; RODRIGUES, L. C.; PIUVEZAM, M. R. NASAL INSTILLATION OF MHTP, A SYNTHETIC ALKALOID, ON ALLERGIC AIRWAY INFLAMMATORY PROCESS DECREASED THE PULMONARY INFLAMMATION. In: 11th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), RIBEIRÃO PRETO, **2017**.

**6.1.5.** MOZZINI-MONTEIRO, T.; FERREIRA, L. A. M. P.; **PAIVA-FERREIRA, L. K. D.**; BEZERRA, G. C.; PIUVEZAM, M.R. GAMMA-TERPINENE: A POTENTIAL MOLECULE FOR THE TREATMENT OF RHINITIS. In: 11th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), RIBEIRÃO PRETO, **2017**.

**6.1.6.** FERREIRA, L. A. M. P.; **FERREIRA, L. K. D. P.**; ALVES, A. F.; GADELHA, F. A. A. F.; PEREIRA, R. F.; PIUVEZAM, M. R. INSTILAÇÃO NASAL COM O ALCALOIDE MHTP EM CAMUNDONGOS BALB/C SENSIBILIZADOS COM OVALBUMINA DIMINUI OS PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS PULMONAR. In: VI Congresso Luso Brasileiro de Patologia Experimental, GARANHUNS, **2016**.

**6.1.7. FERREIRA, L. K. D. P.;** FERREIRA, L. A. M. P.; MONTEIRO, T. M.; LEITE, F. C.; RODRIGUES, L. C.; PIUVEZAM, M. R. MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE TIPO 2 PELO ALCALOIDE SINTÉTICO MHTP EM MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA. In: VI CONGRESSO LUSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL, GARANHUNS, **2016**.

**6.1.8. MOZZINI-MONTEIRO, T.;** **PAIVA-FERREIRA, L.K.D.**; FERREIRA, L.A.M.P.; SALGADO, P.R.R.; ALMEIDA, R.N.; PIUVEZAM, M.R. GAMATERPINENE PREVENTS ANXIETY-LIKE BEHAVIER IN OVA-SINSITEZED MICE. In: VI CONGRESSO LUSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL, GARANHUNS, **2016**.

**6.1.9. MOZZINI-MONTEIRO, T.;** LEITE, F.C.; **PAIVA-FERREIRA, L.K.D.**; FERREIRA, L.A.M.P.; BEZERRA, G.C.; PIUVEZAM, M.R. 4- CARVOMENTHENOL MINIMIZED THE ACUTE LUNG INJURE BY DECREASING POLIMORPHONUCLER CELLS INTO THE INFLAMED SITE. In: VI CONGRESSO LUSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL, GARANHUNS, **2016**.

**6.1.10. PEREIRA RF, GADELHA FAAF, PAIVA-FERREIRA LKD, VIEIRA GC, BOZZA PT, PIUVEZAM MR. WARIFTEINE, AN ALKALOID OF CISSAMPELOS SYMPODIALIS, INHIBITS HISTOLOGICAL PARAMETERS IN AN ALLERGIC RHINITIS MODEL. In 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics and the 21st Latin American Congress of Pharmacology (SBFTE), FOZ DO IGUAÇU, 2016.**

## **6.2. NACIONAIS = 1**

**6.2.1. GICIANE CARVALHO VIEIRA, RAQUEL FRAGOSO PEREIRA, FRANCISCO ALLYSSON A. F. GADELHA, TAMIRES G. DE JESUS, FAGNER L. CARVALHO, LAERCIA K. D. PAIVA, MARCIA REGINA PIUVEZAM. DETECTION OF TISSUE MORPHOLOGICAL ALTERATIONS OF AIRWAYS IN RESPIRATORY DISEASE MODELS BY HISTOLOGICAL STAINS. In XLII Congress of the Brazilian Society of Immunology 2017 - X Extra Section of Clinical Immunology, SALVADOR, 2017.**

## **7. TRABALHOS PREMIADOS = 3**

**7.1.** OLIVEIRA, J. B.; VIEIRA, C. I. D.; DE LIMA, L. M.; **FERREIRA, L. K. D. P.**; PIUVEZAM, M. R. AVALIAÇÃO DE PARAMÊTROS INFLAMATÓRIOS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DA SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICA COMBINADAS (CARAS). In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, **2019**.

**7.2.** **LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA**. INVENTOR DA PATENTE UTILIZAÇÃO DE UM ALCALOIDE SINTÉTICO DENOMINADO MHTP PARA O TRATAMENTO DE INFLAMAÇÃO. Registrado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) em 27/07/2016. Nº BR102016018225-5. 3ª PREMIAÇÃO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA PROFESSOR DELBY FERNANDES DE MEDEIROS. Universidade Federal da Paraíba, **2017**.

**7.3.** FERREIRA, L. A. M. P.; **FERREIRA, L. K. D. P.**; MONTEIRO, T. M.; ALVES, A. F.; PIUVEZAM, M. R. IMPLANTAÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL DE RINITE ALÉRGICA NO LABORATÓRIO DE IMUNOFARMACOLOGIA DA UFPB. In: CINASAMA, JOÃO PESSOA, **2017**.

## **8. EXPERIÊNCIA EM BANCAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO = 1**

**8.1.** ESTUDO COMPARATIVO DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS NOS MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA AGUDA E CRÔNICA. Aluna: Grasiela Costa Bezerra; curso: **Farmácia**; Orientadora: Profa Dra Marcia Regina Piuvezan. Membros da banca: Profa Dra Daniele Idalino Janebro e **Laércia Karla Diega Paiva Ferreira**. Defesa: 05 de junho de 2018.