

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

RAQUEL FRAGOSO PEREIRA CAVALCANTI

**Efeito antialérgico e imunomodulador dos alcaloides warifteina e
metilwarifteina em modelo murino de Síndrome da Asma e Rinite
Alérgicas Combinadas (CARAS)**

João Pessoa-PB

2020

RAQUEL FRAGOSO PEREIRA CAVALCANTI

Efeito antialérgico e imunomodulador dos alcaloides warifteina e metilwarifteina em modelo murino de Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)

Dissertação 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 **mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de concentração: **farmacologia**.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam

Coorientadora: Profa. Dra. Giciane Carvalho Vieira

João Pessoa-PB

2020

C376e Cavalcanti, Raquel Fragoso Pereira.

Efeito antialérgico e imunomodulador dos alcaloides
warifteina e metilwarifteina em modelo murino de
Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)
/ Raquel Fragoso Pereira Cavalcanti. - João Pessoa,
2020.

113 f. : il.

Orientação: Marcia Regina Piuvezam.

Coorientação: Giciane Carvalho Vieira.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Cissampelos sympodialis. 2. Warifteina. 3.
Metilwarifteina. 4. Alcaloides. 5. CARAS. 6. Rinite. 7.
Asma. I. Piuvezam, Marcia Regina. II. Vieira, Giciane
Carvalho. III. Título.

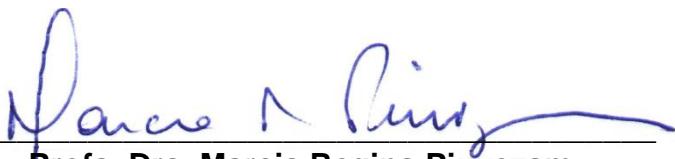
UFPB/BC

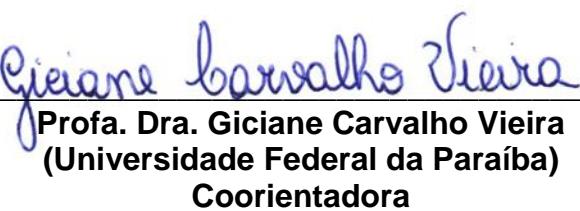
RAQUEL FRAGOSO PEREIRA CAVALCANTI

Efeito antialérgico e imunomodulador dos alcaloides warifteina e metilwarifteina em modelo murino de Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)

Aprovada em 07/02/2020

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora


Profa. Dra. Giciane Carvalho Vieira
(Universidade Federal da Paraíba)
Coorientadora


Profa. Dra. Joelma Rodrigues de Souza
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador externo


Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno

Dedicatórias

Aos meus pais, Auxiliadora Fragoso e Edson Pereira, e irmãs, Sinara Fragoso e Sara fragoso, por serem minha base, fonte de companheirismo e incentivadores em essência.

Ao meu querido esposo, Raphael Cavalcanti, por ser o símbolo de segurança do nosso lar e me conceder diariamente amor do Alto doado. Você é parte essencial desta conquista.

A princesa Rebeca por nos ensinar a essência da vida com seu jeito meigo.

Aos meus familiares, Helsom Bruno, Alexsandro Dantas, Socorro Fragoso, João Vitor e Filipe Fragoso que de forma tão próxima me mostram como prosseguir me ensinando o que já lhes foi ensinado.

A vocês eu dedico.

Agradecimentos

Deus em toda sua soberania, sempre se fez presente. Diariamente me transbordava de seu cuidado, proteção e esperança. Atrelado a isso, Ele providenciou pessoas maravilhosas para caminharem comigo e em conjunto realizarmos o necessário para conclusão deste trabalho. Antes de tudo, sou grata a Ele, doando tudo o que sou, minhas escolhas e conquistas.

A minha orientadora, Profa. Dra. Marcia Piuvezam, por todos os ensinamentos durante esses oito anos de convivência, tanto no âmbito profissional quanto pessoal, pela forma amável com a qual sempre me orientou, por vibrar junto a cada conquista, além de toda confiança em mim depositada.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Giciane Carvalho, por todo apoio e auxílio desde o planejamento até o desenvolvimento deste trabalho, pela disposição em ajudar constantemente e trazer a calma aos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho por gentilmente ceder as substâncias teste para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega e Profa. Dra. Joelma Rodrigues, incentivadores na busca pelo conhecimento. Obrigada por aceitar fazer parte e contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

Aos professores da graduação em farmácia e do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba (PPgPNSB). De fato, alguns se destacam por incentivarem a curiosidade dos alunos, dentre estes cito, Elisana Moura, Mariana Sobral, Robson Veras, Reinaldo Nóbrega, Joelma Rodrigues, Bagnólia Costa, Fabiana Cavalcante e Isabelle Santos.

A toda equipe que fez ou faz parte do Laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA), Fagner Leite, Luiz Agra, Laércia Karla, Tamires Gonçalves, Larissa Adilis, Talissa Mozzini, José Guilherme, Grasiella Costa, Larissa Rodrigues, Éssia Lima, Deyse Costa, Juliane Franca, Júlia Ondrusch e José Marreiro, por todos os momentos compartilhados durante os experimentos e rotina do laboratório.

Em especial a Allysson Gadelha, um amigo de longas datas, que se fez presente desde os primeiros passos da iniciação científica. Obrigada pela amizade, parceria, ajuda nos experimentos e nas decisões a serem tomadas. A Tamires Gonçalves pelo auxílio sempre que necessário e por sempre está disponível para realizar experimentos comigo.

A José Crispim Duarte, Roberta Paretoni e demais funcionários do biotério/IPeFarM, pela dedicação e disponibilidade em ajudar sempre que preciso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e suporte técnico; A Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) e ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba (PPgPNSB) pelo apoio físico e institucional.

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para esta dissertação de mestrado.

Agradeço.

Raquel Fragoso Pereira Cavalcanti

Resumo

RESUMO

A Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) é caracterizada por inflamações crônicas das vias aéreas superior e inferior e pela resposta imune celular adaptativa tipo 2 (T_{H2}), com aumento sérico de IgE-alérgeno específica, infiltração eosinofílica, além da hiperplasia e hipertrofia das células caliciformes. A farmacoterapia da CARAS é baseada em princípios ativos que apresentam uma vasta quantidade de efeitos colaterais e adversos relevantes. Dessa forma, visando à busca por novas alternativas terapêuticas, avaliou-se os possíveis efeitos dos tratamentos com a warifteina ou com a metilwarifteina, alcaloides da *Cissampelos sympodialis*, planta com potencial anti-inflamatório, em modelo murino de CARAS induzida por ovalbumina (OVA). Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB (CEUA Nº 2518050618) e os dados analisados por ANOVA One-way com significância estatística quando $p<0,05$. Os camundongos BALB/c foram separados em grupos ($n=5$) com animais saudáveis (Basal), sensibilizados e desafiados com OVA (OVA), sensibilizados, desafiados e tratados, via intranasal, com warifteina (War 2 mg/kg), metilwarifteina (Mwar 2 mg/kg) ou budesonida (BUD 0,9 mg/kg) após o último desafio alérgênico. Os animais tratados com warifteina ou metilwarifteina apresentaram diminuição ($p<0,05$) dos sinais clínicos, espirros e fricções nasais e redução ($p<0,05$) na hiper-reatividade nasal induzida por histamina a partir da dose de 1nmol. As células do Fluido do Lavado Nasal (NALF) e do Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos diferentes grupos experimentais foram quantificadas e se observou redução ($p<0,05$) no número de células totais e diferenciais, principalmente de eosinófilos nos grupos tratados com warifteina ou metilwarifteina quando comparados com o grupo OVA. No contexto sistêmico, apenas a metilwarifteina reduziu a eosinofilia. Os níveis séricos de IgE-OVA específica foram reduzidos ($p<0,05$) nos grupos de animais tratados com ambos os alcaloides. A análise histológica revelou que os grupos War e Mwar apresentaram diminuição da infiltração de células inflamatórias na região subepitelial e perivascular na cavidade nasal e na região peribronquiolar e perivascular no tecido pulmonar corado em hematoxilina eosina. A hiperplasia e a hipertrofia das células caliciformes nasais e pulmonares, ressaltadas após coloração do PAS, foram reduzidas nos grupos War e Mwar. Os alcaloides não alteraram o número de mastócitos nos tecidos nasal e pulmonar após coloração com o Azul de Toluidina. Em contraste, a quantidade de fibras colágenas nos grupos War e Mwar, observadas após coloração com o Tricomo de Gomori, foi reduzida. Em adição, os tratamentos com a warifteina ou com a metilwarifteina diminuíram ($p<0,05$) os níveis de citocinas do perfil T_{H2} (IL-4, IL-13 e IL-5) e do perfil T_{H17} (IL-17A) com aumento nos níveis de IFN- γ (perfil T_{H1}), indicando um efeito imunomodulador de ambos alcaloides em direção ao perfil T_{H1} em detrimento ao perfil T_{H2} . A expressão do fator de transcrição NF- κ B foi analisada em granulócitos e em linfócitos do BALF e foi observado que os grupos War e Mwar apresentaram redução na expressão de NF- κ B em ambas as populações. A integração de vias que favorecem a transcrição de citocinas do perfil T_{H2} via NF- κ B pode estar subjacente a alteração da expressão desse fator em granulócitos e linfócitos. Esses dados sugerem que a warifteina e a metilwarifteina apresentam efeito antialérgico e imunomodulador em modelo murino de CARAS.

Palavras chave: 1. *Cissampelos sympodialis*. 2. Warifteina. 3. Metilwarifteina. 4. Alcaloides. 5. CARAS. 6. Rinite 7. Asma.

Abstract

ABSTRACT

Combined Allergic Asthma and Rhinitis Syndrome (CARAS) is characterized by chronic inflammation of upper and lower airway and type 2 adaptive cellular immune response (T_{H2}), with serum IgE-allergen-specific elevation, eosinophilic infiltration, and hyperplasia and hypertrophy of goblet cells. The pharmacotherapy of CARAS is based on active drugs that have a wide range of relevant side and adverse effects. Thus, the aiming at the search for new therapeutic alternatives, we evaluated the possible effects of treatment with warifteine or methylwarifteine, *Cissampelos sympodialis* alkaloids, a plant with anti-inflammatory potential, in murine model of ovalbumin (OVA)-induced CARAS. The experimental procedures were approved by the Animal Use Ethics Committee of UFPB (CEUA Nº. 2518050618) and, the data were analyzed by ANOVA one-way with statistical significance of $p<0.05$. BALB/c mice were separated into groups ($n = 5$) with normal animals (Basal); sensitized and challenged with OVA (OVA) animals; sensitized, challenged and treated intranasally with warifteine (War 2 mg/kg), methylwarifteine (Mwar 2 mg / kg) or budesonide (BUD 0.9 mg / kg) animals after the last allergen challenge. Animals treated with warifteine or methylwarifteine showed a decrease ($p<0.05$) in clinical signs, sneezing and nasal friction, and reduction ($p <0.05$) in histamine-induced nasal hyperreactivity from the 1nmol dose. Nasal lavage fluid (NALF) and Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cells from the different experimental groups were quantified and there was a reduction ($p<0.05$) in the number of total and differential cells, main eosinophils in the groups in warifteine or methylwarifteine treatments when compared to the OVA group. In the systemic context, only methylwarifteine reduced eosinophilia. Serum levels of OVA-specific IgE were reduced ($p<0.05$) in the groups treated with both alkaloids. Histological analysis revealed that the War and Mwar groups showed decreased infiltration of inflammatory cells in the subepithelial and perivascular region in the nasal cavity and the peribronchiolar and perivascular region in hematoxylin-eosin-stained lung tissue. Nasal and pulmonary goblet cell hyperplasia and hypertrophy, highlighted after PAS staining, were reduced in the War and Mwar groups. Alkaloids did not change the number of mast cells in the nasal and pulmonary tissues after Toluidine Blue staining. In contrast, the number of collagen fibers in the War and Mwar groups observed after staining with Gomori's Trichome was reduced. Besides, treatments with warifteine or methylwarifteine decreased ($p<0.05$) the cytokine levels of T_{H2} (IL-4, IL-13 and IL-5) and T_{H17} (IL-17A) profiles with increased levels of IFN- γ (T_{H1} profile), indicating an immunomodulatory effect of both alkaloids towards the T_{H1} profile over the T_{H2} profile. The expression of the transcription factor NF- κ B was analyzed in granulocytes and lymphocytes of BALF and we observed that the groups War and Mwar showed reduction in NF- κ B expression in both populations. The integration of pathways that favor the transcription of T_{H2} profile cytokines via NF- κ B may underlie the alteration of the expression of this factor in granulocytes and lymphocytes. These data suggest that warifteine and methylwarifteine have antiallergic and immunomodulatory effects in CARAS murine model.

Keywords: 1. *Cissampelos sympodialis*. 2. Warifteine. 3. Metilwarifteine. 4. Alkaloids. 5. CARAS. 6.Rhinitis 7.Asthma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cavidade nasal definida em três regiões: o vestíbulo nasal, a região respiratória e a região olfatória.....	25
Figura 2 - Árvore respiratória das vias aéreas inferiores com fotomicrografias de regiões características: traqueia, brônquios, bronquíolos e alvéolos.....	27
Figura 3 - Mapa da prevalência mundial da asma em adolescentes entre 13 e 14 anos.....	30
Figura 4 - Mapa da prevalência mundial da asma em adultos entre 18 e 45 anos.....	30
Figura 5 - Mecanismo fisiopatológico da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) mediado pela resposta imune Th2.....	35
Figura 6 - Fotos da espécie <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl. (Menispermaceae).....	43
Figura 7 - Estruturas químicas dos alcaloides isolados da <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.: warifteina (A) metilwarifteina (B) simpodialina β ,N-óxido (C) milonina (D) laurifolina (E) e roraimina (F).....	44
Figura 8 - Esquema representativo do modelo experimental da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....	53
Figura 9 - Fotomicrografias representativas do tecido nasal dos camundongos tratados com warifteina ou metilwarifteina e corados com Hematoxilina Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS), Azul de Toluidina (AT) ou Tricromo de Gomori (TG).....	71
Figura 10 - Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar dos camundongos tratados com warifteina ou metilwarifteina nas colorações Hematoxilina Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS) ou Tricromo de Gomori (TG).....	73
Figura 13 - Mapa conceitual do mecanismo de ação imunomoduladora da warifteina e metilwarifteina em modelo de Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....	97

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Quantificação de espirros (A) e fricções nasais (B) de camundongos com CARAS.....	62
Gráfico 2 - Quantificação de espirros (A) e fricções nasais (B) de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) após administração de doses crescentes de histamina (0,1, 1, 10, 100 e 1000 nmol/camundongo).....	63
Gráfico 3 - Efeito do tratamento com warifteina ou metilwarifteina sobre o número de células totais (A) linfócitos (B) macrófagos (C) neutrófilos (D) e eosinófilos (E) no Fluido do Lavado Nasal (NALF) de camundongos com CARAS.....	64
Gráfico 4 - Efeito do tratamento com warifteina ou metilwarifteina sobre o número de células totais (A) linfócitos (B) macrófagos (C) neutrófilos (D) e eosinófilos (E) no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) de camundongos com CARAS.....	66
Gráfico 5 - Efeito do tratamento com warifteina ou metilwarifteina sobre o número de linfócitos (A) monócitos (B) neutrófilos (C) e eosinófilos (D) no sangue periférico de camundongos com CARAS.....	68
Gráfico 6 - Efeito do tratamento com warifteina ou metilwarifteina no título de IgE OVA específica no soro de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....	69
Gráfico 7 - Escore qualitativo das alterações morfológicas na cavidade nasal dos camundongos tratados warifteina ou metilwarifteina.....	72
Gráfico 8 - Escore qualitativo das alterações morfológicas no tecido pulmonar dos camundongos tratados warifteina ou metilwarifteina	74
Gráfico 9 - Efeito do tratamento com warifteina ou metilwarifteina nos níveis das citocinas IL-4 (A) IL-13 (B) IL-5 (C) IL-33 (D) IL-17 (E) IFN- γ (F) IL-10 (G) no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....	75
Gráfico 10 - Efeito dos tratamentos com os alcaloides warifteina ou metilwarifteina na expressão do fator de transcrição NF- κ B (p65) em granulócitos do BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....	77
Gráfico 11 - Efeito dos tratamentos com os alcaloides warifteina ou metilwarifteina na expressão do fator de transcrição NF- κ B (p65) em linfócitos do BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais.....	50
Tabela 2 - Composição da solução anestésica.....	51
Tabela 3 - Composição da solução descalcificadora EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) em tampão fosfato 0,1 M.....	51
Tabela 4 - Composição da formalina tamponada.....	52
Tabela 5 - Parâmetros analisados no escore histológico.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

A.T	Aumento Total
AFL	Extrato hidroalcoolico das folhas de <i>C. sympodialis</i>
AHR	hiperresponsividade das vias aéreas
APC	Célula Apresentadora de Antígenos
AT	Azul de Toluidina
BALF	Fluido do Lavado Broncoalveolar
BUD	Budesonida
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CARAS	Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas
CD 52	Grupo de diferenciação 52
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DCs	Células Dendríticas
ECP	Proteína Catiônica Eosinofílica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
Foxa 2	Gene <i>Forkhead Box A2</i>
G_{q/11}	Proteína G _q ou proteína G ₁₁
H1-4	Receptores de Histamina 1-4
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HE	Hematoxilina Eosina
IgE	Imunoglobulina E
IL-	Interleucina – (1 β , 2, 4, 5, 9, 10, 12, 13, 17, 25, 31,33)
ILC	Célula Linfoide Inata
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
LT_{reg}	Linfócitos T regulatório

M2	Macrófago tipo 2
MBP	Proteína Básica Principal (<i>Major Basic Protein</i>)
MHC II	Complexo Maior de Histocompatibilidade de Classe II
MHTP	[2-methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol
MP	Megapixels
Mwar	Metilwarifteina
NALF	Fluido do Lavado Nasal
OVA	Ovalbumina
PAS	Ácido Periódico de Schiff
STAT 6	Tradutor de sinal e ativador da transcrição 6
TG	Tricromo de Gomori
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta (<i>Transforming Growth Factor Beta</i>)
T_H	T <i>helper</i> (1, 2, 17)
TLR	Receptores Semelhantes ao Toll
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral – alfa
TRP	Receptores de Potencial Transitório
TSLP	Linfopoetina do estroma tímico
War	Warifteina

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
2.1 Sistema respiratório.....	24
2.1.1 Vias aéreas superiores	24
2.1.2 Vias aéreas inferiores	26
2.2 Rinite	28
2.2.1 Classificação fenotípica e endotipos da rinite.....	28
2.3 Asma.....	29
2.3.1 Classificação fenotípica e endotipos da asma	30
2.4 Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)	31
2.5 Fisiopatologia da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)	32
2.6 Mecanismos imunoregulatórios da CARAS.....	37
2.7 Diagnóstico da rinite e asma.....	37
2.7 Tratamento CARAS	39
2.7.1 Tratamento não farmacológico	39
2.7.2 Tratamento farmacológico	39
2.8 Produtos naturais.....	41
2.9 <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichler (Menispermaceae).....	42
3. OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo geral	47
3.2 Objetivos específicos.....	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Material.....	49
4.1.1 Material botânico	49
4.1.2 Animais	49
4.1.3 Substâncias e reagentes	50

4.1.4 Soluções	51
4.2 Métodos.....	52
4.2.1 Modelo da Síndrome de Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).52	
4.2.2 Quantificação dos sinais clínicos.....	53
4.2.3 Avaliação da hiper-reatividade nasal induzida pela histamina	53
4.2.4 Quantificação celular nos Fluidos do Lavado Nasal (NALF) e Broncoalveolar (BALF)	54
4.2.5 Quantificação celular no sangue periférico	55
4.2.7 Análises histológicas.....	56
4.2.7.1 Cavidade pulmonar	56
4.2.7.2 Cavidade nasal	56
4.2.7.3 Processamento histológico.....	57
4.2.7.4 Fotomicrografias	57
4.2.8 Quantificação de citocinas no BALF	58
4.2.9 Análise da expressão do fator de transcrição NFκB	58
4.2.10 Análise estatística	58
5. RESULTADOS.....	61
5.1 Efeito do tratamento com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar) nos sinais clínicos da rinite em camundongos com CARAS	61
5.2 Efeito do tratamento com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar) na hiper-reatividade nasal induzida por histamina em camundongos com CARAS.....	62
5.3 Efeito do tratamento com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar) na migração de células inflamatórias para o Fluido do Lavado Nasal (NALF) de camundongos com CARAS.....	64
5.4 Efeito do tratamento com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar) na migração celular para o Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) de camundongos com CARAS.....	65
5.5 Efeito do tratamento com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar) no perfil celular sistêmico de camundongos com CARAS.....	67

5.6 Efeito do tratamento com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar) na concentração sérica de IgE-OVA específica em camundongos com CARAS ...	69
5.7 Análise histológica da cavidade nasal de camundongos com CARAS e tratados com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar).	69
5.8 Análise histológica de pulmões de camundongos com CARAS e tratados com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar)	72
5.10 Efeito dos tratamentos com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar) na expressão do fator de transcrição NF-κB (p65) nas células do BALF de camundongos com CARAS.....	76
6. DISCUSSÃO	82
7. CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS.....	99
Apêndice	111
Anexo	113



Introdução

1. INTRODUÇÃO

A terminologia CARAS (Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas) vem sendo utilizada para descrever pacientes que apresentam manifestações concomitantes de rinite e de asma alérgicas devido à alta frequência de coexistência de ambas as doenças (TANG et al., 2019). A rinite e a asma alérgicas são distúrbios crônicos das vias aéreas e compartilham mecanismos fisiopatológicos semelhantes, como a resposta imune celular adaptativa tipo 2 ($T_{H}2$), aumento nos níveis séricos de imunoglobulinas alérgeno-específicas (IgE), com predomínio de infiltração eosinofílica além da hiperplasia e hipertrofia das células caliciformes, sendo classificadas como uma doença única das vias aéreas (BROZEK et al., 2017). A incidência dessas doenças vem aumentando mundialmente interferindo na qualidade de vida dos indivíduos que as possuem e gerando um impacto clínico e financeiro significativo (WHO, 2018).

Como opções farmacoterapêuticas para a CARAS estão os anti-histamínicos, anticolinérgicos, corticosteroides, antileucotrienos, estabilizadores de mastócitos além dos imunobiológicos (CARLSON, 2019). Os princípios ativos dessas classes farmacológicas podem causar efeitos colaterais e adversos relevantes incluindo sedação, comprometimento da aprendizagem, hiperglicemia, arritmias cardíacas além do uso crônico, em certas situações, induzir à tolerância. Além disso, a refratariiedade dos episódios alérgicos, aliada à preferência da utilização de produtos naturais pela população, em razão do resgate e da valorização do conhecimento popular, contribuem para a busca de novas alternativas para o tratamento da CARAS (CODEVILLA; CASTILHOS; BERGOLD, 2013). Portanto, novas moléculas com potencial terapêutico e que induzam menos efeitos colaterais devem ser estudados.

As plantas medicinais apresentam destaque pelo papel que assumem em nossa sociedade, constituindo um recurso biológico e cultural, além do seu aspecto etnofarmacológico (GUO et al., 2017). No Brasil, com sua vasta flora, torna-se importante a pesquisa por novas moléculas bioativas e consequentemente opções terapêuticas inovadoras. Nessa busca, a espécie *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) vem ganhando destaque. Essa planta é popularmente conhecida como “jarrinha”, “orelha de onça”, “abuteira” e “milona” é endêmica no Nordeste e Sudeste do Brasil. A infusão das folhas e o decocto das raízes são utilizados

popularmente no tratamento de asma, bronquite, resfriado e reumatismo, além de outras doenças inflamatórias (CORRÊA, 1984; BARBOSA-FILHO, AGRA, THOMAS, 1997).

Estudos científicos demonstraram que o extrato hidroalcoolico das folhas (AFL) da *Cissampelos sympodialis* e os seus alcaloides warifteina e metilwarifteina apresentaram atividade antialérgica, anti-inflamatória e imunomoduladora em modelo experimental de alergia alimentar e inflamação pulmonar (PIUVEZAM et al., 1999; BEZERRA-SANTOS et al., 2004; BEZERRA-SANTOS et al., 2006 e 2012; COSTA et al., 2008; VIEIRA et al., 2012). Além disso, recentemente, foi demonstrado que a warifteina atua como imunomodulador em modelo de rinite alérgica crônica experimental (VIEIRA et al., 2018). Entretanto, não há estudos do efeito dos alcaloides da planta em um modelo experimental da CARAS.

Diante do exposto, o tratamento com *C. Sympodialis* emerge como fonte potencial para o tratamento da CARAS. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos alcaloides da *C. sympodialis*, warifteina e metilwarifteina, em modelo experimental da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



Fundamentação teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Sistema respiratório

A condução do ar, sua filtração e trocas gasosas são as três funções principais do sistema respiratório. Além disso, a passagem de ar pela laringe é responsável pela produção da fala, originando a função de fonação e a passagem do ar pela mucosa olfatória nas cavidades nasais exerce estímulos para o olfato. O sistema respiratório também participa, em menor proporção, das funções endócrinas, bem como da regulação da resposta imune a antígenos inalados (CARLSON, 2019).

2.1.1 Vias aéreas superiores

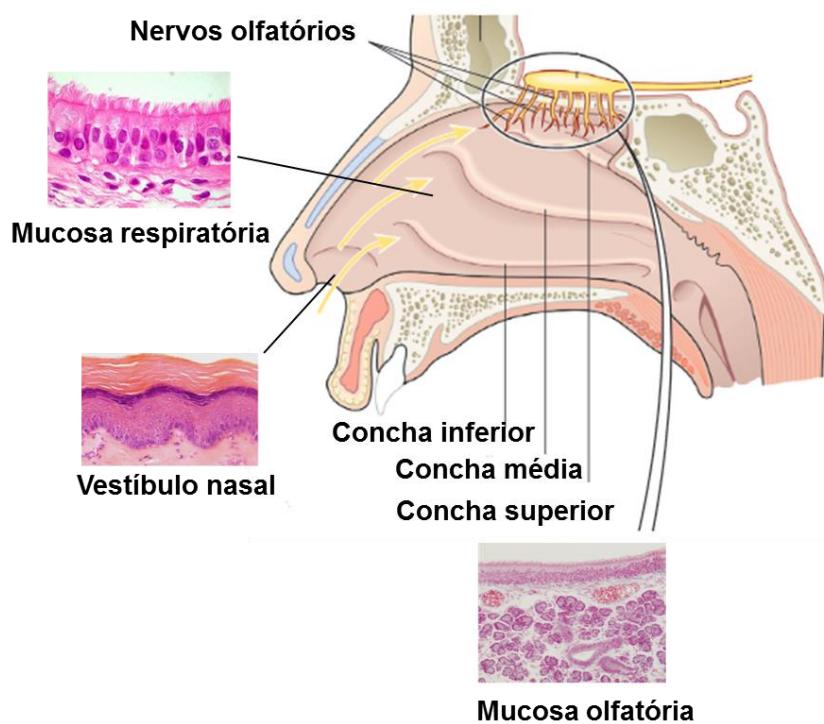
Anatomicamente, o nariz pode ser definido em nariz externo e cavidade nasal. O nariz externo é a porção do nariz que surge na face apresentando formato piramidal composto por um esqueleto osteofibrocartilagíneo. A abertura da via aérea ocorre pelo átrio ou vestíbulo nasal, recoberto por pele e vibrissas que atuam como primeira barreira de filtração do ar inspirado (GUIBAS et al., 2014).

O septo nasal subdivide a cavidade em direita e esquerda. A parede nasal lateral apresenta inúmeras saliências conhecidas como conchas que podem ser superiores, médias e inferiores (Figura 1). As conchas dividem cada cavidade nasal em câmaras de ar e desempenham um duplo papel. Elas aumentam a área de superfície e causam turbulência no fluxo de ar para permitir um condicionamento do ar inspirado. As conchas inferiores apresentam rica rede vascular submucosa que permitem variação de seu volume importante para fisiologia nasal. Nas porções superiores do septo e da parede lateral encontra-se a mucosa olfatória, região especializada que inter-relaciona o bulbo olfatório com estímulos gustativos. Sendo comum em situação de congestão nasal, decorrente de rinite alérgica e não alérgica, observar alterações de olfato e do paladar (CARLSON, 2019).

O epitélio que reveste a cavidade nasal desempenha um papel crítico na sua fisiologia. Com exceção do vestíbulo e da região próxima à faringe, a cavidade nasal é composta por um epitélio colunar pseudoestratificado ciliado altamente especializado (epitélio respiratório) (Figura 1). As superfícies externas da maioria dessas células epiteliais são cobertas por um grande número de cílios microscópicos.

Espalhadas entre essas células estão outras células que formam e secretam muco. Por causa de sua aparência sob o microscópio, eles são chamados de células caliciformes. As células caliciformes, junto com pequenas glândulas localizadas abaixo do epitélio, produzem uma fina camada de muco nasal que cobre toda a superfície das câmaras nasais. Além do muco, algumas das células das glândulas mucosas são especializadas para produzir uma secreção aquosa (serosa) que penetra nas câmaras nasais e desempenha um papel importante na umidificação do ar. Na mucosa e submucosa encontramos células basais, colunares, linfócitos T e B, mastócitos e eosinófilos (SAKANO et al., 2018).

Figura 1- Cavidade nasal definida em três regiões: o vestíbulo nasal, a região respiratória e a região olfatória.



Fonte: adaptado de CARLSON, 2019.

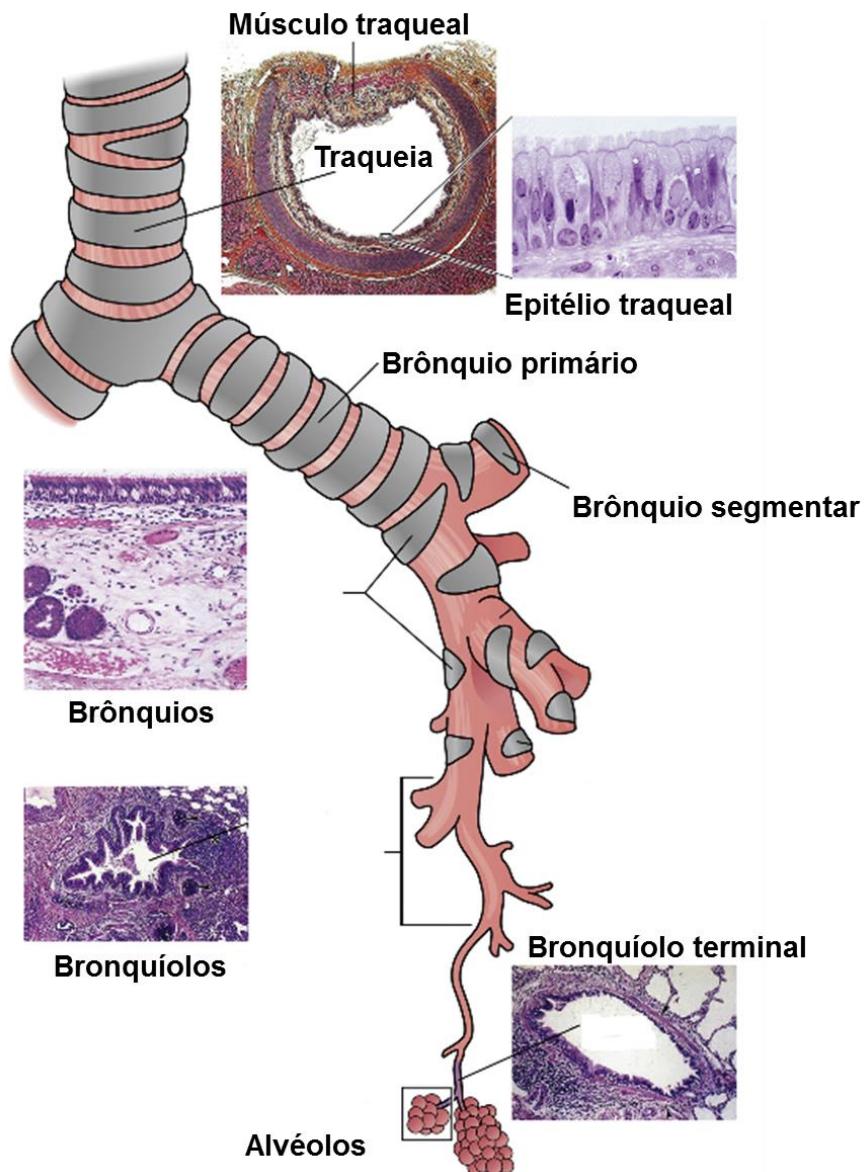
2.1.2 Vias aéreas inferiores

De forma complementar à porção das vias aéreas condutora, o condicionamento do ar (aquecimento e umidificação) também acontece nas vias aéreas inferiores (traqueia, brônquios e bronquíolos). Mais internamente observam-se as estruturas respiratórias que são os bronquíolos respiratórios, ductos e sacos alveolares (Figura 2). A extensa superfície do trato respiratório inferior facilita a remoção de patógenos, a produção e transporte de muco auxilia nesse processo de remoção (MANDHANE et al., 2011).

A traqueia e os brônquios apresentam vários tipos celulares, como, células basais, células caliciformes, células ciliadas, células em escova e células neuroendócrinas. Células transitórias em situação de migração celular também podem estar presentes no epitélio, tais como, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e mastócitos (ROSS; PAWLINA, 2012). Nos bronquíolos terminais, o epitélio é composto por células ciliadas e células de clara. O epitélio alveolar contém dois tipos de células: pneumócito tipo I e pneumócito tipo II. As células pavimentosas tipo I compõem a parede alveolar e revestem 80% da área de superfície alveolar; as células cúbicas tipo II recobrem a área restante e são responsáveis pela síntese e secreção de moléculas surfactantes que diminuem a tensão superficial e regulam o equilíbrio de fluidos no epitélio alveolar (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011).

No espaço extracelular e extravascular, denominado de interstício pulmonar, e entre as células do tecido, há uma variedade de células como, linfócitos, plasmócitos, fibroblastos, miofibroblastos, além de colágeno, fibras elásticas e fluido intersticial. Os vasos linfáticos compõem a principal via de drenagem para o fluido intersticial entre o epitélio e a membrana basal endotelial (TRONDE et al., 2007).

Figura 2 - Árvore respiratória das vias aéreas inferiores com fotomicrografias de regiões características: traqueia, brônquios, bronquíolos e alvéolos.



Fonte: adaptado de CARLSON, 2019.

2.2 Rinite

A Rinite Alérgica (RA) é definida como uma inflamação da mucosa nasal caracterizada pelos sintomas: congestão, rinorreia, prurido, espirros e hiposmia (MANDHANE et al., 2011). A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 500 milhões de pessoas apresentem a RA (GOMEZ et al., 2015). No Brasil, estudos populacionais avaliaram a prevalência a partir do protocolo clínico *Internacional Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC) e quantificaram cerca de 12,8% de adolescentes (13 - 14 anos) e 18,0% de crianças em fase escolar (6 - 7 anos) (SAKANO et al., 2018).

O seu impacto vai desde o ponto de vista financeiro como também afeta individualmente e de forma negativa a qualidade de vida, desempenho escolar, produtividade laboral além de interferir na vida social dos seus portadores (ZUBERBIER et al., 2014).

2.2.1 Classificação fenotípica e endotipos da rinite

A classificação fenotípica da rinite foi proposta pela Academia Europeia de Alergia e Imunologia baseada na avaliação clínica, padrão temporal, gravidade, duração, resposta terapêutica e, principalmente no agente etiológico. É constituída por quatro fenótipos: a) rinites infecciosas do tipo aguda, causada por vírus ou bactérias; b) rinite alérgica, a forma mais comum induzida por aeroalérgenos em indivíduos sensibilizados; c) rinite não alérgica não infecciosa ou heterogênea (rinite do idoso, hormonal, idiopática e outro; e d) rinite mista quando há mais de um agente etiológico (HELLINGS et al., 2017).

A classificação do endotipo visa identificar os mecanismos envolvidos na gênese da doença. Estes endotipos são baseados em complexas respostas celulares e moleculares, além da presença característica de biomarcadores (MURARO et al., 2016). Identificam-se quatro endotipos da rinite: a) com resposta imune tipo T_H2 caracterizada por resposta alérgica imediata mediada por IgE específica, com influxo de eosinófilos; b) com resposta imune não tipo T_H2 com presença de um influxo neutrofílico em resposta a um agente infeccioso; c) rinite neurogênica caracterizada pelo aumento da expressão de receptores transientes (TRP) e aumento da

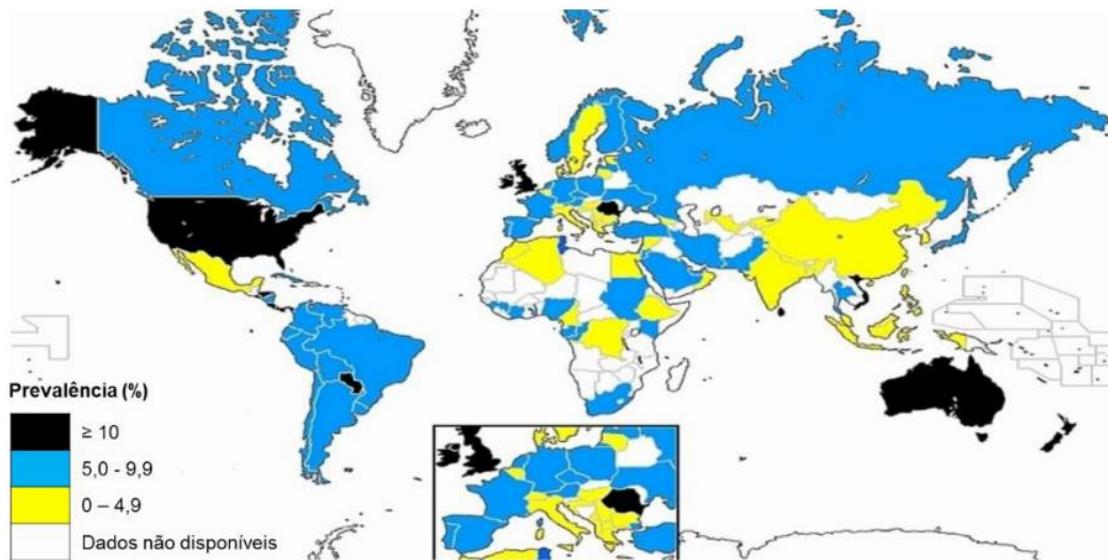
concentração de substância P, relacionada à rinite gustativa, do idoso e idiopática; d) disfunção epitelial decorrente de uma inflamação primária (resposta tipo TH1 ou TH2) tendo como consequência a disfunção ciliar ou disfunção da barreira oclusional (occludina-1), facilitando assim, a migração subepitelial de moléculas imunoestimulatórias (HELLINGS et al., 2017).

Atualmente, estudos afirmam que há uma complexidade em se definir os endotipos da doença e o entendimento dos processos celulares e moleculares. A definição do endotipo determina um fenótipo da doença, entretanto há necessidade maior entendimento envolvendo o papel de moduladores, ambiente, microbioma e anatomia nasal (SAKANO et al., 2018) para se definir o endotipo correto.

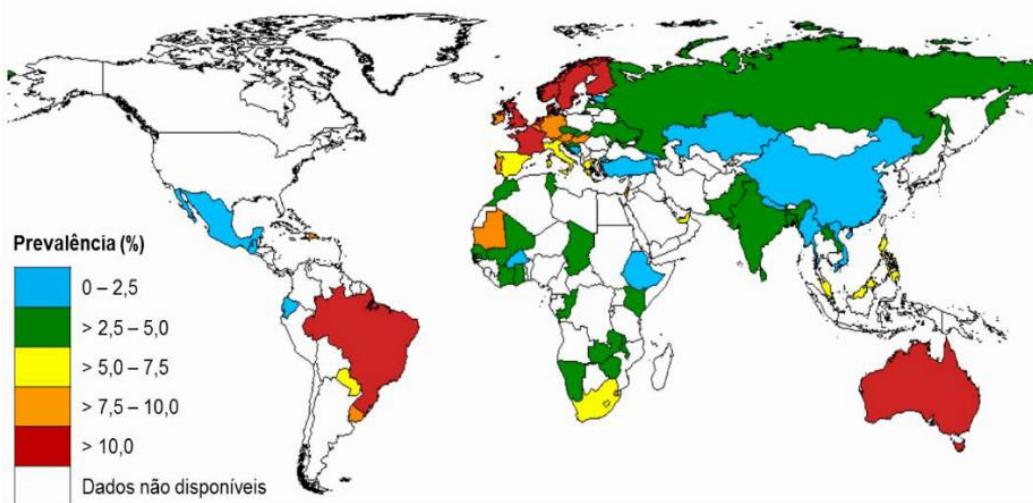
2.3 Asma

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas de natureza complexa, cujos fatores genéticos e ambientais podem contribuir para seu desenvolvimento (MASLAN; MIMS, 2014). Atualmente, há cerca de 300 milhões de asmáticos no mundo (OMS, 2018). Nos últimos 25 anos, a taxa de prevalência da doença dobrou mundialmente. Diariamente, só no Brasil, três pessoas morrem em decorrência da doença (GINA, 2017). Segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), a asma é considerada um grave problema de saúde pública, sendo a quarta maior causa de hospitalização no país, com cerca de 300 mil internações por ano, com um custo anual de cerca de R\$ 537 milhões para os cofres públicos.

Os mapas de prevalência costumam ser divididos por faixa etária como mostram as figuras 3 e 4 a seguir.

Figura 3 - Mapa da prevalência mundial da asma em adolescentes entre 13 e 14 anos.

Fonte: adaptado GINA, 2017.

Figura 4 - Mapa da prevalência mundial da asma em adultos entre 18 e 45 anos.

Fonte: adaptado TO et al., 2012.

2.3.1 Classificação fenotípica e endotipos da asma

Os fenótipos da asma mais frequentemente descritos na literatura compreendem: a) asma tipo 2; e b) asma não tipo 2. Já os endotipos descritos são: a)

inflamatório tipo 2 ou T_{H2} high (T_{H2}^{hi}) e b) inflamatório não tipo 2 ou T_{H2} low (T_{H2}^{lo}) (WENZEL, 2016).

A asma tipo 2 é caracterizada por uma inflamação dependente da sensibilização de mastócitos pela IgE alérgeno específica e um influxo eosinofílico no tecido pulmonar. Os níveis de citcinas IL-4, IL-5 e IL-13 bem como a quantidade de eosinófilos no sangue e no tecido pulmonar diferenciam os endótipos da asma. Altos níveis desses biomarcadores caracterizam o T_{H2} high, já quando os níveis de linfócitos T_{H2} são reduzidos, caracteriza-se o T_{H2} low (CHENG et al., 2014).

2.4 Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)

Um estudo com aproximadamente 3.000 adolescentes quantificou a proporção de asmáticos com rinite alérgica e situou em torno de 50%. Por outro lado, estudos refletem a alta frequência de hiper-responsividade brônquica entre pacientes com rinite (SOLE et al., 2015).

Além dessa associação clínico-epidemiológica, estudos comprovam uma íntima ligação da rinite e asma alérgicas no que se refere à gênese patológica e ao desenvolvimento de ambas as doenças. Ambas acometem o sistema respiratório, podem ser desencadeadas pelos mesmos agentes etiológicos, apresentam o mesmo perfil celular predominante que medeia os processos inflamatórios, e compartilham o mesmo raciocínio farmacoterapêutico (LI et al., 2016).

Diante dessa relação, a Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS – *Combined Allergic Rhinitis and Asthma Syndrome*) se caracteriza por ser uma única doença das vias aéreas. Sendo de extrema importância pesquisas experimentais que, ao desenvolver em animais a CARAS, contribuam na construção e atualização do entendimento da patogênese e tragam ao mercado farmacêutico novas moléculas, prováveis candidatas a serem utilizadas como fármacos para as duas doenças e contribuam para o arsenal terapêutico no tratamento dessa síndrome alérgica (BOUSQUET et al., 2016).

Uma busca realizada na base de dados *Science direct* constatou a existência de apenas oito artigos (2015-2019) que desenvolveram protocolo da CARAS e analisaram o efeito de substâncias promissoras para o tratamento dessa síndrome. No Brasil, o laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba

/João Pessoa/PB é pioneiro no estudo da CARAS e se empenha na busca de novas opções terapêuticas a partir de produtos naturais e sintéticos bioativos.

2.5 Fisiopatologia da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)

A Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) é caracterizada pela resposta imune tipo II (T_{H2}) mediada pela imunoglobulina E (IgE) específica para o alérgeno. Essa resposta imunológica ocorre quando os indivíduos atópicos, geneticamente predisponentes, entram em contato com alérgenos encontrados facilmente dispersos no ar e que são provenientes de baratas, fungos, pelos de animais e, principalmente, os ácaros do pó domiciliar sendo o *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. fariane* e *Blomia tropicalis* os principais agentes etiológicos da CARAS (RUBINI et al., 2017).

Na fase da sensibilização, o alérgeno entra em contato com o epitélio respiratório sendo reconhecido por Receptores de Reconhecimento Padrão (PRR) como, por exemplo, os Receptores Semelhantes ao Toll (TLR), ativando as células epiteliais que passarão a secretar moléculas sinalizadoras do tipo alarminas (IL-33, IL- 25 e TSLP - Linfopoetina do Estroma Tímico) (EIFAN; DURHAM, 2016). Na região da submucosa, essas moléculas sinalizadoras irão atuar nas Células Linfoides Inata do tipo 2 (ILCs 2) ativando a produção de citocinas clássicas da resposta imune tipo 2 como a IL-13 e a IL-5 (NASR et al., 2018).

Além disso, as Células Apresentadoras de Antígenos (APCs), principalmente as células dendríticas (DCs), também são ativadas por citocinas e alarminas epiteliais que induzem a expressão do ligante OX40 (OX40L). As DCs reconhecem o alérgeno e se direcionam para o linfonodo de drenagem onde após o processamento do antígeno haverá a apresentação do peptídeo antigênico, via molécula do Complexo Maior de Histocompatibilidade de classe II (MHC II) para o receptor de célula T (TCR) presente na membrana dos linfócitos T CD4⁺ virgens. Após a apresentação antigênica ocorre a polarização para o perfil T_{H2} , caracterizado pela ativação dos fatores de transcrição GATA-3 e STAT-6. Os linfócitos T_{H2} produzem as citocinas clássicas do perfil de resposta tipo 2 (IL-4, IL-13 e IL-5), a partir da ação de fatores de transcrição como o NF-κB (Figura 5) (HOLGATE et al., 2011).

O Fator Nuclear-kappaB (NF-κB) está envolvido em um amplo espectro de redes inflamatórias que regulam a produção de citocinas. A sinalização intracelular via NF-κB na CARAS é evidenciada pelo aumento da localização nuclear de NF-κB ou ligação ao DNA, fosforilação ou degradação de IκB e expressão de IKK-β nas células presentes nas vias aéreas de asmáticos. O aumento da ligação ou coloração nuclear do NF-κB também é detectado nas células inflamatórias do escarro induzido de asmáticos (MIYAKE et al., 2016).

As citocinas IL-4 e IL-13 compartilham os receptores celulares e atuam ativando os linfócitos B, os quais se diferenciam em plasmócitos produtores de anticorpos específicos do tipo IgE para o determinado alérgeno. A IgE específica para o alérgeno se ligará aos seus receptores de alta afinidade I (FcεRI) presentes na membrana citoplasmática de mastócitos teciduais, basófilos e eosinófilos circulantes. Esse processo é denominado de sensibilização alérgica (EVANS et al., 2015).

No momento da subsequente exposição do indivíduo sensibilizado ao alérgeno, esse se ligará à IgE-FcεRI presente na membrana dos mastócitos, basófilos e eosinófilos. A ligação cruzada irá ativar essas células ocasionando a liberação dos grânulos contendo mediadores pré-estocados, como a histamina e, formação de outros mediadores como prostagladinas e leucotrienos (BOULET, 2018). A histamina, nas vias aéreas superiores, possui um papel fundamental nas terminações nervosas sensoriais, na estimulação reflexa parassimpática das secreções glandulares e na vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, sendo responsável por desencadear os sintomas nasais da rinite (prurido nasal, espirros, rinorreia). Nas vias aéreas inferiores, a histamina promove vasodilatação local, aumento da permeabilidade vascular e edema, além da migração de células inflamatórias e broncoconstricção (XU; ZHANG; WANG, 2007).

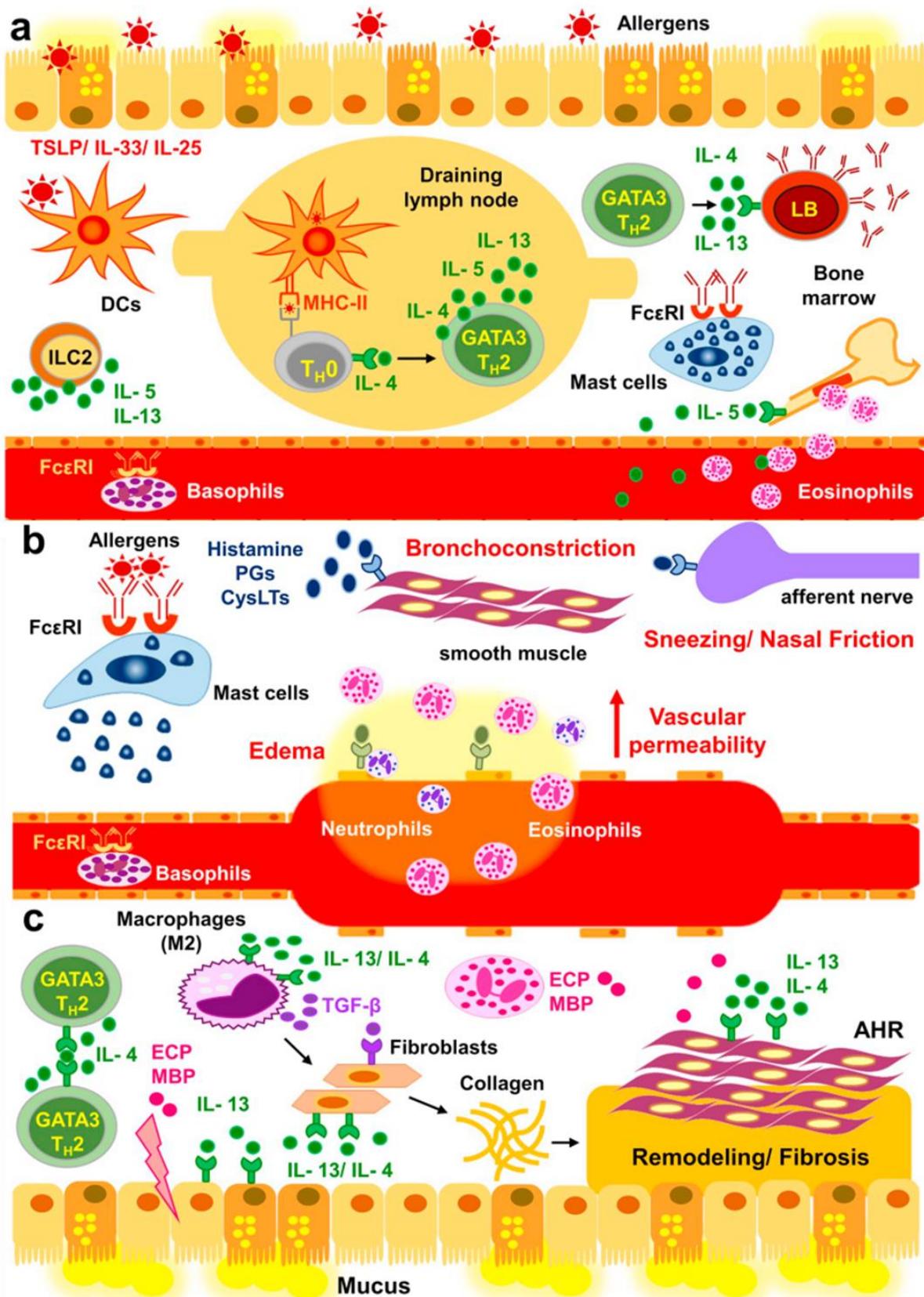
O processo inflamatório é mantido pela ação de diversos mediadores que formam o microambiente da resposta alérgica. A IL-4 atua em *feedback* positivo na manutenção da resposta tipo 2 (WYNN, 2014). Juntamente com a IL-13 ativam os macrófagos tipo 2 (M2), os quais passam a produzir a citocina TGF-β (Fator de crescimento e transformação – β) que ativa os fibroblastos a produzirem fibras colágenas, as quais se depositam nas vias aéreas, levando um quadro de fibrose e remodelamento tecidual. Em células musculares lisas, essas duas citocinas

desencadeam o processo de hipertrofia e hiperplasia muscular, levando a um quadro de hiper-reatividade das vias aéreas (HOLGATE et al., 2011).

A IL-13 ativa o processo de hiperplasia, hipertrofia e metaplasia de células ciliadas epiteliais que se diferenciam em células produtoras de muco (GOUR; WILLS-KARP, 2015). Promove ainda a hipersecreção de muco (água, glicoproteínas, enzimas e imunoglobulinas) pelas células caliciformes presentes no epitélio colunar pseudoestratificado ciliado das vias aéreas (Figura 5) (SAKANO et al., 2018).

A IL-5 está relacionada ao processo de eosinopoese. O recrutamento de eosinófilos decorre da atuação de quimiocinas, como eotaxina 1, 2 e 3. Além disso, eosinófilos ativados nas vias aéreas geram quimiocinas pró-inflamatórias e enzimas citolíticas, incluindo a Proteína Catiônica Eosinofílica (ECP) e Proteína Básica Principal (MBP) que participam da inflamação persistente das vias aéreas, e têm sido associadas a exacerbações e declínio da função pulmonar. Os eosinófilos ainda são capazes de liberar o TGF-β provocando o espessamento da membrana basal reticular contribuindo para o remodelamento das vias aéreas presente na CARAS (Figura 5) (ELTBOLI et al., 2015).

Figura 5 - Mecanismo fisiopatológico da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) mediado pela resposta imune T_H2



Fonte: adaptado FERREIRA et al., 2019.

Fases da fisiopatologia da CARAS. **a)** Primeira fase (sensibilização). Os alérgenos estimulam as células epiteliais a liberarem as alarminas como TSLP, IL-33 e IL -25 que estimulam as ILCs2 a produzirem IL-13 e IL-5. As alarminas estimulam as APCs (DCs) a migrarem para o linfonodo de drenagem para ativar $T_{H}0$ via MHC-II e polarizar para o perfil $T_{H}2$ com a produção de IL-4, IL-5 e IL-13. IL-5 é uma importante indutora de eosinofilia atuando na medula óssea e provocando a produção, maturação e migração de eosinófilos para o local de inflamação. IL-4 e IL-13 estimulam a produção de IgE pelas células B que se ligam aos receptores Fc ϵ RI na membrana dos mastócitos, basófilos e eosinófilos circulantes, conferindo o primeiro estágio de sensibilização a alérgenos. **b)** Segunda fase da reação alérgica (fase de desafio). A reexposição aos alérgenos resulta em ligação cruzada alérgeno-IgE 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 cisteinil-leucotrienos (CysLTs). Esses mediadores serão responsáveis pela reação de fase imediata que atua nos nervos aferentes, causando sinais clínicos de espirros e fricção nasal (rinite), nas células endoteliais, promovendo aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de líquidos e formação de edema, nos músculos lisos promovem broncoconstricção (asma). **c)** Terceira fase tardia da reação alérgica (manutenção do perfil $T_{H}2$). A polarização do perfil $T_{H}2$ é mantida pela produção constante de IL-4 e IL -13. Essas citocinas atuam nas células caliciformes, promovendo a hiperprodução de muco, a hiperplasia das células musculares lisas e a hipertrofia e a hiper-responsividade das vias aéreas (AHR). Além disso, ativam macrófagos (M2), que produzem fator de crescimento e renovação β (TGF- β), associado à hiperprodução de fibroblastos. Os eosinófilos são as células efetoras do processo inflamatório crônico, liberando mediadores como a Proteína Catiônica Eosinofílica (ECP) e a Proteína Principal Básica (MBP), que atuam diretamente na destruição epitelial, na remodelação de tecidos e na hiper-responsividade das vias aéreas. TSLP (Linfopoetina do Estroma Tímico), IL (interleucinas), ILC (Célula Linfóide Inata), APC (Célula Apresentadora de Antígeno), DC (Células Dendríticas), MHC-II (complexo principal de histocompatibilidade da classe 2), IgE (imunoglobulina E), Fc ϵ RI (receptor de Alta afinidade para a porção Fc da IgE).

2.6 Mecanismos imunoregulatórios da CARAS

As células T regulatórias caracterizam o perfil T_{reg} , elas produzem a citocina IL-10 cuja ação é supressora sobre outras células T CD4 $^{+}$. A IL-10 se destaca por suas propriedades anti-inflamatórias oferecendo assim perspectivas terapêuticas para o manejo de alergia como observado no estudo que utilizou uma molécula murina recombinante IL-10 para o tratamento de camundongos sensibilizados com ovalbumina (AYAKANNU, et al., 2019).

Estudos recentes sugerem que durante a doença, juntamente com o aumento da resposta T_{H2} , desequilíbrios ocorrem nas respostas imunes T_{H17} e T regulatório marcada com altos níveis da IL-17 e diminuição da citocina IL-10 (SHI et al., 2011). Outros estudos corroboram indicando que as células T_{H17} , produtores de IL-17, podem recrutar neutrófilos para o pulmão contribuindo para o agravamento da doença (ANATRIELLO et al., 2019).

Outra população de célula T capaz de modular a resposta imune tipo 2 na CARAS é a população celular do tipo T_{H1} com a produção das citocinas IL-2, IFN- γ , e TNF- α . O IFN- γ impede a ativação do fator de transcrição GATA 3 responsável pela diferenciação das células T_{H2} . Estudos comprovam que o processo alérgico pode ser suprimido pela indução de células T_{H1} ou pela administração de IL-12, citocina responsável pela ativação do fator de transcrição T-bet que induz a produção das citocinas do perfil de resposta T_{H1} (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015). Além disso, um tratamento eficaz para a asma pode ser induzindo a resposta imune T_{H1} e simultaneamente inibindo a resposta imune T_{H2} / T_{H17} para restaurar o equilíbrio T_{H1} / T_{H2} (ANATRIELLO et al., 2019).

2.7 Diagnóstico da rinite e asma

O diagnóstico da rinite alérgica é baseado na história clínica, antecedentes pessoais e familiares de atopia, exames físicos e exames complementares. O diagnóstico é essencialmente clínico, com detecção dos sintomas cardinais: espirros, prurido nasal intenso, coriza clara e abundante e obstrução nasal e da identificação do possível alérgeno desencadeante pelo teste cutâneo de hipersensibilidade imediata ou IgE específica (OKUBO et al., 2017).

Para um diagnóstico preciso, os marcadores de endotipos devem idealmente ser complementados por avaliação da função nasal, como a permeabilidade e fluxo nasal, para confirmar a obstrução nasal e provação nasal com ar frio para determinação da hiperreatividade nasal. Assim como a medição do óxido nítrico para medir a inflamação nasal e provação nasal com o alérgeno para confirmar a relevância dos alérgenos, e a avaliação do olfato em pacientes que relatam a redução da capacidade olfativa (RUBINI et al., 2017).

A obstrução nasal é a queixa mais frequente, podendo ser intermitente ou persistente, bilateral ou unilateral. Em casos mais graves, a congestão nasal pode interferir com a aeração e com a drenagem dos seios paranasais e da tuba auditiva, resultando em cefaleia ou otalgia, com queixas de diminuição da acuidade auditiva. Podem ocorrer relatos de respiração oral, roncos, voz anasalada e alterações no olfato. Astenia, irritabilidade, diminuição da concentração, anorexia, alteração do sono, náuseas e desconforto abdominal podem ocorrer (SAKANO et al., 2018).

Fisicamente características faciais típicas estão presentes em grande número de pacientes com rinite alérgica, tais como: olheiras, dupla linha de Dennie-Morgan e prega nasal horizontal causada pelo frequente hábito de coçar a narina com movimento para cima. O exame das cavidades nasais é essencial, mostrando uma mucosa nasal geralmente pálida, edemaciada e com abundante secreção clara ou mucoide. Em casos crônicos observa-se hipertrrofia importante de conchas inferiores (BOUSQUET et al., 2016).

A intensidade e a frequência dos sintomas, assim como a sua evolução e fatores desencadeantes e agravantes (tabagismo ativo/passivo, natação), medicamentos em uso, presença de comorbidades (sinusites e otites de repetição) e outras doenças alérgicas (asma, conjuntivite alérgica e eczema atópico) devem fazer parte da anamnese (GINA, 2018).

Quanto à asma, o diagnóstico clínico é sugerido por um ou mais sintomas: tosse crônica, desconforto torácico, dispneia e sibilância principalmente à noite ou nas primeiras horas da manhã, considerado os horários de temperaturas amenas responsáveis pela ativação de terminações nervosas sensitivas (WENZEL, 2016). O exame físico é inespecífico uma vez que nem todos os pacientes seguirão uma regra de sintomas apresentados, como por exemplo o sibilo, indicativo de obstrução do fluxo aéreo, pode não ocorrer em todos os pacientes. Considerando os sinais e sintomas

não exclusivos da asma, a confirmação diagnóstica deve ser feita por um método objetivo e padronizado. Os testes diagnósticos disponíveis na clínica são: espirometria, testes de broncoprovocação e medida de pico do fluxo expiratório (GINA, 2018).

2.7 Tratamento CARAS

2.7.1 Tratamento não farmacológico

As proposições de medidas não farmacológicas para o controle das doenças alérgicas se baseiam em consensos de asma e rinite os quais recomendam as medidas de afastamento de alérgenos como uma etapa da estratégia terapêutica (BOUSQUET et al., 2016).

As principais medidas para o controle do ambiente são: optar por dormir em quarto bem ventilado e ensolarado. Evitar travesseiro e colchão de paina ou pena, do contrário, optar pelos de espuma, fibra ou látex; afastar o indivíduo do ambiente enquanto se faz limpeza, evitar uso de vassouras e espanadores, optar por passar pano úmido ou usar aspiradores de pó com filtros especiais; Dar preferência às pastas e sabões em pó para limpeza de banheiro e cozinha. Evitar talcos, perfumes, desodorantes, principalmente na forma de sprays; não fumar e nem deixar que fumem dentro da casa ou do automóvel do paciente. O tabagismo pré-natal, perinatal e pós-natal está associado a problemas respiratórios futuros na prole; evitar banhos extremamente quentes e oscilação brusca de temperatura. A temperatura ideal da água varia em torno 37°C (temperatura corporal); dar preferência à vida ao ar livre. Esportes podem e devem ser praticados, evitando-se dias com alta exposição aos poléns ou poluentes em determinadas áreas geográficas (RUBINI et al., 2017).

2.7.2 Tratamento farmacológico

Os anti-histamínicos (anti-H1) são considerados medicamentos de primeira escolha para o tratamento dos sintomas nasais evidentes na rinite alérgica. Eles atuam sobre receptores de histamina subtipo 1 acoplado às proteínas G_{q/11}, interferindo na ação da histamina sobre as terminações nervosas sensoriais, na

estimulação reflexa parassimpática das secreções glandulares, na vasodilatação e aumento da permeabilidade, alivando assim, o prurido nasal, espirros, rinorreia e sintomas oculares. Ainda, são capazes de regular o processo inflamatório por meio da redução da expressão de citocinas inflamatórias, de moléculas de adesão, da ativação de células epiteliais, mastócitos, linfócitos T e eosinófilos (MANDAHANE et al., 2011). Os anti-H1 clássicos ou de primeira geração apresentam alta lipofilicidade e fácil penetração na barreira hematoencefálica, além da baixa seletividade pelo subtipo do receptor, essas características resultam em sedação e potenciais efeitos adversos quando se ligam a outros tipos de receptores, como diminuição da cognição e desempenho psicomotor. Já os anti-H1 não clássicos ou de segunda geração apresentam baixa capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, alta potência, longa duração de ação e alta afinidade para os receptores H1 apresentando pouca ou nenhuma interação com outros receptores (SAKANO et al., 2018).

Os descongestionantes pertencem à classe dos simpaticomiméticos cuja ação se baseia na ativação de adrenorreceptores α_1 e α_2 em células endoteliais promovendo a vasoconstrição e alívio da obstrução nasal. Os descongestionantes orais como a pseudoefedrina devem ser utilizados com cautela devido a sua ação psicotrópica e efeitos colaterais cardiovasculares. Já os de uso tópico como a nafazolina devem ser usados por no máximo 7 dias, pois seu uso prolongado pode desencadear a rinite medicamentosa de rebote, efeitos centrais e cardiovasculares importantes (MANDAHANE et al., 2011).

Os corticosteroides são agentes anti-inflamatórios esteroidais de primeira linha para o controle da CARAS. Quando utilizado na forma tópica alivia a congestão, a hiposmia, a coriza, os espirros e o prurido. Sua administração sistêmica é vantajosa por atingir tanto as vias aéreas superiores quanto às inferiores, útil naqueles pacientes com sintomas mais intensos. No entanto, os efeitos adversos sistêmicos dos corticosteróides sempre foram uma preocupação. A inibição do crescimento em crianças, os distúrbios do metabolismo, o glaucoma e a formação de catarata, a imunossupressão e a supressão do eixo Hipotálamo-Pituitário-Adrenal são exemplos desses efeitos adversos. Seu mecanismo de ação se baseia na inibição da transcrição de proteínas pró-inflamatórias mediada pelo NF- κ B e na ativação da transcrição de proteína anti-inflamatórias (IL-10) (MATERA et al., 2019).

Estabilizadores de mastócitos constituem uma importante intervenção terapêutica no tratamento da CARAS. A reexposição a um alérgeno leva a sua ligação aos anticorpos IgE específicas para os alérgenos ligados aos receptores FcεRI nos mastócitos. Isso provoca a ligação cruzada desencadeando a síntese e degradação de mediadores como histamina, triptase, leucotrienos e proteases. Este é o passo mais crucial na cascata alérgica. O cromoglicato dissódico possui ação estabilizadora sobre a membrana de mastócitos e, consequentemente, impede a liberação dos mediadores químicos (TAUR; PATIL, 2011).

Os sintomas pulmonares da CARAS são controlados pelas seguintes classes: agonistas β -adrenérgicos, antagonistas do receptor muscarínico M₃, e inibidores de fosfodiesterase (MATERA et al., 2019).

Os antagonistas de receptores de leucotrienos como o montelucaste de sódio têm sido apontados como alternativa eficaz para os pacientes com asma e rinite alérgica concomitante, seus efeitos vão desde inibição da vasodilatação, da exsudação plasmática, da secreção de muco, além de inibir a inflamação eosinofílica. Entretanto, efeitos adversos como dor abdominal, cefaleia e agitação podem ser observados (ADCOCK et al., 2008).

A introdução de anticorpos monoclonais no tratamento da CARAS surge como alternativa de uma terapia mais específica, já que agentes biológicos são sintetizados por organismos vivos e direcionados a um mediador específico como citocina ou receptor. Atualmente já foram desenvolvidos imunobiológicos contra os seguintes alvos: IgE, citocinas da resposta T_H2 como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-31 e TSLP, receptor para quimiocinas CCR4 e moléculas de adesão CD2, CD25, CD52 e ligante OX40. Embora raramente, podem ocorrer reações adversas à terapia imunobiológica como infecções do trato respiratório inferior e do trato urinário, faringite, dor de cabeça, congestão nasal, dor abdominal, eczema, dor nas costas e reações no local da injeção (BUSSE, 2019).

2.8 Produtos naturais

Ao longo da história, os produtos naturais, obtidos de plantas, animais ou minerais foram a principal fonte de preparações medicinais. Ainda hoje, eles continuam presentes em ensaios clínicos e não clínicos ou fornecem compostos para

realização desses. A principal justificativa para utilização de compostos naturais se baseia na grande diversidade de organismos produtores de metabólitos secundários, apresentando as mais diversas estruturas exercendo grande importância no processo de descoberta e desenvolvimento de novas drogas (GUO, 2017).

Nessa perspectiva, há exemplos importantes de substâncias isoladas de plantas como a atropina isolada da *Atropa beladona*, a digoxina, isolada da *Digitalis lanata*, a cafeína obtida da *Coffea arábica*, além do ácido salicílico, obtido da *Salix alba* (STICHER, 2014).

O Brasil é um país dotado de uma das maiores biodiversidades do planeta e desta forma ocupa uma posição privilegiada, tendo em vista que 20% de todas as espécies vegetais encontram-se no país. As plantas medicinais da flora nativa brasileira são utilizadas devido ao grande respaldo no conhecimento popular que permite assim uma longa aceitação dessas espécies, no entanto é importante destacar que apesar do seu amplo uso, há pouca comprovação de suas propriedades farmacológicas (VEIGA-JÚNIOR; MELLO, 2008).

Nesse sentido, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares em saúde foi implantada no Brasil em 2006. O seu objetivo é fortalecer as pesquisas com plantas medicinais nativas e garantir a acessibilidade dessa prática aos serviços de saúde. No ano de 2009, o Ministério da Saúde publicou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), uma lista com 89 espécies que estão sendo priorizadas em pesquisas e investimentos garantindo assim segurança e eficácia de suas utilizações (CARVALHO, 2011).

Além da validação do conhecimento popular, o estímulo à pesquisa, produção e comercialização de espécies vegetais brasileiras gera trabalho, renda, desenvolvimento e integração regional, ou seja, possibilidades econômicas importantes ao desenvolvimento do país, visando à sustentabilidade (BRASIL, 2011). Dessa forma, os produtos naturais oferecem grandes oportunidades para obtenção de moléculas potencialmente ativas que levem a novos fármacos úteis no tratamento de diversas afecções, entre elas os distúrbios das vias aéreas como a rinite e asma.

2.9 *Cissampelos sympodialis* Eichler (Menispermaceae)

Cissampelos sympodialis é popularmente conhecida como "jarrinha", "milona", "orelha de onça" e "abuteira". Está distribuída pelo no Nordeste e Sudeste do Brasil,

sendo facilmente distinguida pelo formato deltoide de sua folha (Figura 6). Pertence à família Menispermaceae, descrita por AL de Jussieu (1789), bem conhecida pela produção de vários tipos de alcalóides, como bisbenzilisoquinolínicos e morfinandienônico (BARBOSA-FILHO; CUNHA; GRAY, 2000). Popularmente, o infuso das folhas e raízes da *Cissampelos sympodialis* é amplamente utilizado para tratar várias doenças inflamatórias, como asma, bronquite, artrite e reumatismo (BARBOSA-FILHO et al., 1997).

Figura 6 – Fotos da espécie *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae).



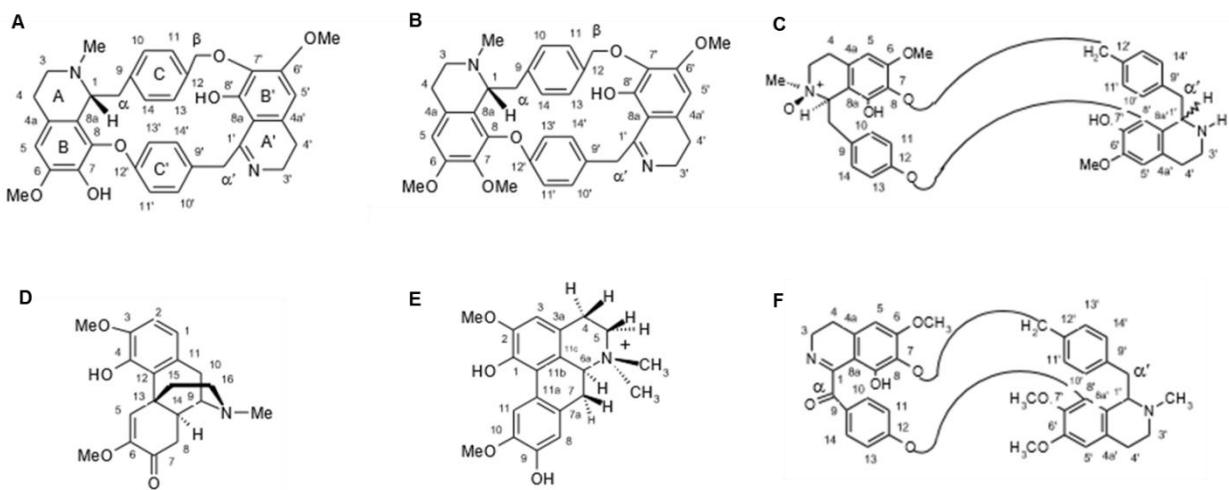
Fonte: Cavalcanti, 2006.

Trabalhos não-clínicos anteriores, realizados no Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)/João Pessoa, PB, demonstraram que o extrato hidroalcoolico das folhas (AFL) da *C. sympodialis* e seus alcaloides apresentaram atividade anit-inflamatória em modelo agudo, antialérgica em modelo de alergia alimentar, antiasmática e imunomoduladora (BEZERRA-SANTOS et al., 2006; COSTA et al., 2008; PIUVEZAM et al., 1999; VIEIRA et al., 2013).

O estudo fitoquímico realizado no Laboratório de Fitoquímica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/UFPB/João Pessoa, PB, a partir do extrato da *C. sympodialis* levou ao isolamento de metabólitos secundários dessa espécie, sendo os flavonoides e os alcaloides os metabólitos mais estudados. Seis marcadores químicos e bioativos, quatro destes alcaloides são terciários: warifteina (Figura 7A), metilwarifteina (Figura 7B), simpodialina β , N-óxido (Figura 7C) (bisbenzilisoquinolínicos), milonina (Figura 7D) (morphinâmico), e um quaternário, do

tipo aporfínico: a laurifolina (Figura 7E) (CÔRTES, 1995; FREITAS et al., 1996). A warifteína foi o alcaloide isolado em maior quantidade e é encontrada nas raízes com um alto rendimento, correspondente a 1,4%, permitindo assim seu estudo farmacológico (BARBOSA-FILHO; AGRA; THOMAS, 1997). Na raiz da mesma planta, além destes cinco alcaloides ocorreu o isolamento e a elucidação estrutural de outro alcaloide bisbenzilisoquinolínico, denominado de roraimina (Figura 7F).

Figura 7 - Estruturas químicas dos alcaloides isolados da *Cissampelos sympodialis* Eichl.: warifteína (A) metilwarifteína (B) simpodialina β , N-óxido (C) milonina (D) laurifolina (E) e roraimina (F)



Fonte: SALES, 2014.

2.9.1 Alcaloides: warifteína e metilwarifteína

Os alcaloides são metabólitos secundários nitrogenados e com baixo peso molecular majoritariamente derivados de aminoácidos. Estima-se que estes metabólitos possam ser encontrados em 20% de todas as espécies vegetais estando envolvidos na defesa das plantas contra herbívoros e patógenos. Os alcaloides bisbenzilisoquinolínicos são conhecidos por terem várias atividades farmacológicas inclusive atividade antiparasitária, em particular contra *Leishmania* sp. (FOURNET et al., 1993), *Trypanossoma cruzi* (ROJAS DE ARIAS et al., 1994) e *Plasmodium* sp. (ANGERHOFER et al., 1999; WRIGHT et al., 2000).

Ensaios de toxicidade aguda com a warifteína em camundongos demonstraram que a DL_{50} , via intraperitoneal, é 511 mg/kg. Entretanto, por via oral, doses de até

1000 mg/kg não induziram mortalidade nos animais durante o tempo de avaliação (CÔRTES, 1995).

A warifteina inibiu a produção de cistenil-leucotrienos e a migração de eosinófilos para o lavado bronco alveolar (BALF) e os níveis da citocina IL-13 após desenvolvimento do processo alérgico asmático em camundongos da linhagem BALB/c (BEZERRA-SANTOS et al., 2006; BEZERRA-SANTOS et al., 2012). Em outro trabalho de alergia alimentar, a warifteina reduziu a resposta de linfócitos T e a produção de IgE específica para o alérgeno (COSTA et al., 2008). Recentemente, em modelo experimental de rinite alérgica, após administração intranasal, a warifteina reduziu o infiltrado inflamatório na cavidade nasal, bem como a quantidade de muco no tecido pulmonar (VIEIRA et al., 2018)

Em relação à metilwarifteina, outro alcaloide de interesse no presente estudo, foi demonstrado sua ação no aumento dos níveis de AMPc em homogenato de músculo liso com potência superior à warifteina (THOMAS et al., 1997). Em quadros de asma alérgica experimental, o tratamento por instilação nasal com a metilwarifteina inibiu a migração celular no BALF, reduziu o infiltrado celular e síntese de muco no epitélio pulmonar, influenciando diretamente no processo alérgico induzido por OVA (VIEIRA et al., 2013).

Considerando as relevantes atividades já apresentadas pelos alcaloides, warifteina e metilwarifteina, o presente trabalho deteve-se a investigar o seu efeito em modelo de CARAS.



Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos imunofarmacológicos dos alcaloides warifteina e metilwarifteina em camundongos BALB/c com a Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) induzida por ovalbumina (OVA).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito dos alcaloides nos sinais clínicos relacionados a rinite experimental tais como fricção nasal e espirro e na hiper-reatividade nasal induzida por histamina;
- Investigar o efeito dos alcaloides na migração de células inflamatórias para as cavidades nasal (Fluido do Lavado Nasal - NALF) e pulmonar (Fluido do Lavado Broncoalveolar - BALF) e a nível sistêmico;
- Quantificar o nível sérico de IgE OVA-específica;
- Analisar os cortes histológicos das fossas nasais e pulmões corados com: Hematoxilina-eosina (HE, parâmetros inflamatórios); Ácido Periódico de Schiff (PAS, produção de muco); Azul de Toluidina (AT, presença de mastócitos); Tricomo de Gomori (TG, presença de fibras colágenas);
- Investigar o potencial imunomodulador dos alcaloides quanto aos níveis de citocinas no BALF:
 - Do perfil T_H1 (INF- γ);
 - Do perfil T_H2 (IL-4; IL-13; IL-5.);
 - Das células epiteliais (IL-33);
 - Do perfil T_H17 (IL-17);
 - Do perfil T_{reg} (IL-10).
- Avaliar o efeito dos alcaloides na expressão do NF- κ B em granulócitos e linfócitos do BALF.



Material e métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Material botânico

Os alcaloides warifteina e metilwarifteina foram isolados do extrato hidroalcoolico das folhas e raízes da *Cissampelos sympodialis* e cedidos pelo professor Dr. José Maria Barbosa Filho/CCS/UFPB/João Pessoa/PB/Brasil. Os alcaloides foram identificados a partir de análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C (CERQUEIRA-LIMA et al., 2010). A quantificação dos alcaloides foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção no Ultra-Violeta (UV). A dose de 2 mg/kg de cada alcaloide foi utilizada baseada em estudos anteriores (COSTA et al., 2008; VIEIRA et al., 2013). As soluções de warifteina e metilwarifteina foram preparadas dissolvendo a quantidade do cristal equivalente a 2 mg/kg em 50 μL de HCl 1 N e 800 μL de salina. O pH foi ajustado para aproximadamente 7,0 com NaOH 1 N e o volume foi completado para 1000 μL . O volume referente a cada dia foi alicotados em tubos eppendorfs em seguida, congelados.

4.1.2 Animais

Camundongos isogênicos fêmeas BALB/c com idade 6 a 8 semanas, pesando entre 20 e 25 g, e ratas *Wistar* fêmeas, na mesma idade, pesando em média 250 g foram utilizados nos experimentos e obtidos da Unidade de Produção Animal (UPA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) / João Pessoa, PB/Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (41x34x16 cm,) a uma temperatura de 25 \pm 2 °C e submetidos a um ciclo de claro e escuro de 12 horas (6:00 as 18:00 claro e de 18:00 as 6:00 escuro) com livre acesso à água e a uma dieta balanceada a base de ração do tipo pellets (Labina®) durante todo o período de experimentação. A manipulação dos animais foi realizada de acordo com o guia de cuidado animal (SHERWIN et al., 2003) e os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA Nº 2518050618) / UFPB (Anexo A). A eutanásia dos animais foi realizada por overdose de solução anestésica (xilazina 30 mg/kg + quetamina 300 mg/kg) diluída em solução salina (NaCl 0,9%) e

administrada via intraperitoneal, conforme a Resolução Normativa Nº 13, de 20.09.2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Para avaliar o efeito dos alcaloides, os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais (n=5) (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais

Grupos	Descrição
Basal	Animais saudáveis, não sensibilizados e não desafiados com OVA.
Ovalbumina (OVA)	Animais doentes, sensibilizados e desafiados com OVA e não tratados.
Budesonida (BUD)	Animais doentes e tratados, sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com 0,9 mg/kg de budesonida (via intranasal).
Warifteina (War)	Animais doentes e tratados, sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com 2 mg/kg de warifteina (via intranasal).
Metilwarifteina (Mwar)	Animais doentes e tratados, sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com 2 mg/kg de metilwarifteina (via intranasal).

Fonte: CAVALCANTI, 2019.

4.1.3 Substâncias e reagentes

O ácido clorídrico (HCl), o ácido fosfotunguístico ($H_3P_12O_{40}$), o ácido ortoperiódico (H_5IO_6), o bálsamo do Canadá, o carvão ativado, os corantes para elaboração das lâminas histológicas, o corante azul de Evans, o hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$), o xilol ($C_6H_4(CH_3)_2$) e o etanol (CH_2H_5OH) foram adquiridos da Vetec® (Brasil). O ácido etilenodiamino tetra-acético ($C_{10}H_{16}N_2O_8$), o aldeído fórmico (CH_2O), o bissulfito de sódio ($NaHSO_3$), o cloreto de sódio ($NaCl$), o fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), o fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), o metabissulfito de sódio ($Na_2S_2O_5$), a OVA grade II, a OVA grade V e a histamina foram provenientes da Sigma-Aldrich®. Os dois tipos de OVA foram conservados sob refrigeração e diluídos em solução salina. O cloridrato de ketamina foi obtido da Vetbrands® (Brasil). O hidróxido de sódio ($NaOH$) foi obtido da Reagen®. A parafina para histologia foi adquirida da Isofar®. Os *Kits* para dosagem de citocinas murinas (INF- γ , IL-10, IL-13

e IL-17) foram obtidos da eBioscience®. Já os Kits para citometria de fluxo foram provenientes da eBioscience®.

4.1.4 Soluções

Em um recipiente estéril, as substâncias anestésicas foram diluídas em quantidade relatada de salina obtendo a solução esperada após homogeneização conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2 - Composição da solução anestésica

Substância	Quantidade (mL)
Xilasina	1
Quetamina	3
Salina	8

A solução descalcificadora foi preparada a partir do sal diluído no tampão (Tabela 3). A amostra (cavidade nasal) foi introduzida no líquido descalcificador com o volume igual ou superior a vinte vezes o volume da peça. A solução foi renovada diariamente e mantida em agitação e o pH aferido diariamente. O teste mecânico da amostra (teste da agulha) a fim de se verificar a eficiência do processo de descalcificação foi realizado.

Tabela 3 - Composição da solução descalcificadora EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) em tampão fosfato 0,1 M

Substância	Quantidade
Tampão fosfato 0,1 M	
Solução A	
Fosfato de sódio monobásico	13,7 g
Água destilada	1000 mL
Solução B	
Fosfato de sódio dibásico	35,8 g
Água destilada	1000 mL
Solução de uso	
EDTA	100 g
Tampão fosfato 0,1 M	1000 mL

As amostras para procedimento histológico foram conservadas em solução de formalina tamponada (Tabela 4). Para o preparo da solução foram dissolvidos os sais em água destilada com auxílio do agitador magnético. O volume de aldeído fórmico, previamente aferido, foi adicionado à solução tamponada atingindo o volume final. Após o preparo, as amostras permaneceram 24 horas sob fixação. O preparo de soluções fixadoras foi feito em capela de exaustão. Por serem muito voláteis e sensíveis à luz, as soluções contendo formaldeído foram em vidro âmbar firmemente fechado.

Tabela 4 - Composição da formalina tamponada

Substância	Quantidade
Aldeído fórmico 37%	100 mL
Água destilada	900 mL
Fosfato de sódio monobásico	4 g
Fosfato de sódio dibásico	4,5 g

4.2 Métodos

4.2.1 Modelo da Síndrome de Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)

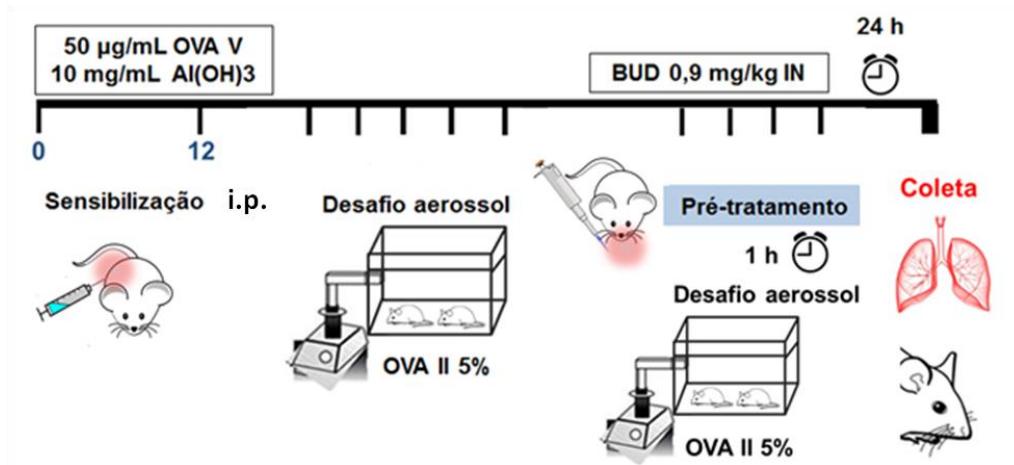
O modelo experimental de CARAS induzido por ovalbumina (OVA) foi desenvolvido tendo como base a adaptação do protocolo experimental de LI et al., 2015. Os camundongos BALB/c fêmeas foram sensibilizados, no primeiro e no décimo segundo dia do protocolo experimental, com uma suspensão de 50 µg/mL de OVA (grade V Sigma) e 10 mg/mL de hidróxido de alumínio (VETEC®) em solução salina. Essa suspensão foi administrada via intraperitoneal na dose de 100 µL/10 g do animal. Após a sensibilização, os animais foram desafiados com aerossol de OVA grade II a 5% em solução salina com intervalos de 24h por 5 dias consecutivos. 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.

Os camundongos foram distribuídos em cinco grupos (n=5) (Tabela 1): o grupo basal representou os animais em seus estados fisiológicos; o grupo OVA representou os animais sensibilizados e desafiados com ovalbumina; o grupo BUD representou os animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com budesonida (0,9

mg/kg, por via intranasal); os grupos War e Mwar representaram os animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com warifteina ou metilwarifteina (2 mg/kg, por via intranasal).

Após 24 horas do último desafio com OVA (dia 36) os animais foram eutanasiados com solução anestésica de quetamina e xilasina, por via intramuscular em uma das patas posteriores, para coleta da cabeça e pulmão e seu posterior processamento histológico (Figura 8).

Figura 8 - Esquema representativo do modelo experimental da Síndrome de Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS)



Fonte: Pereira, 2017

4.2.2 Quantificação dos sinais clínicos

Os sinais clínicos nasais, fricção nasal e espirro, foram quantificados em cada camundongo por 15 minutos no último dia de desafio (36º) imediatamente após o desafio com OVA. A contagem foi realizada após filmagem dos camundongos previamente isolados em cubas de vidro espelhadas para melhor observação (KUYAMA et al., 2010).

4.2.3 Avaliação da hiper-reatividade nasal induzida pela histamina

A hiper-reatividade nasal à 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 36º, uma hora após o desafio com o alérgeno, quatro microlitros 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).

4.2.4 Quantificação celular nos Fluidos do Lavado Nasal (NALF) e Broncoalveolar (BALF)

Para a coleta dos fluidos, primeiramente, os camundongos foram eutanasiados com solução anestésica e em seguida foi feita a assepsia do tórax e pescoço do animal com álcool a 70°. A traqueia foi isolada com auxílio de instrumental cirúrgico (pinça e tesoura). Uma cânula de poliestireno foi introduzida na traqueia do animal no sentido traqueia-cavidade nasal para coleta do NALF e posteriormente traqueia-pulmão para o BAL. Para obter cada lavado foi administrado, por uma cânula, 1,0 mL de *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS) na cavidade. O líquido após lavar a cavidade foi coletado em tubo tipo cônic. Os fluidos foram mantidos em baixa temperatura (6°C) para conservação da viabilidade celular (WANG et al., 2013) e posteriormente foram utilizados para contagem total e diferencial das células.

A contagem do número total de células nos lavados foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando uma alíquota da amostra previamente homogeneizada e diluída em Solução de *Turk* na proporção 1:2 para o NALF e 1:4 para o BAL. A leitura foi feita no microscópio óptico em objetiva de 40x. Após contagem foi realizado o cálculo do número de células = $n \times d \times 10^4$, no qual n: média do número de células contadas nos quatro quadrantes, d: diluição da amostra e 10^4 : diluição padrão da câmara de Neubauer.

Para contagem diferencial das células, 150 a 200 μ L de cada lavado foram distribuídos igualmente por lâmina nos dois poços de uma cito centrífuga (*cytospin®*). O material foi centrifugado a 1500 RPM por 10 min. Após a cito centrifugação, as lâminas foram coradas por Panótico (*Panoptic methods / Auto-Hemacolor®*) com auxílio de uma cuba de coplin. Terminada a etapa de coloração, as lâminas foram lavadas em água destilada e secadas a temperatura ambiente. A contagem diferencial de células foi realizada por microscopia óptica. Cada lâmina foi observada até a contagem de 100 células, utilizando para isso a objetiva de imersão (100x).

4.2.5 Quantificação celular no sangue periférico

Para contagem de células no sangue periférico foi realizada a técnica do esfregaço sanguíneo ou lâmina de extensão sanguínea. Uma gota de sangue obtida da veia caudal foi posta na lâmina de microscopia e distendida, formando assim, uma camada fina de sangue. As lâminas obtidas foram reservadas para secagem. Após essa etapa, as lâminas foram coradas com o *kit* rápido panótico® e submetidas a uma nova secagem. A leitura foi realizada com auxílio de microscopia óptica de forma a permitir que as diferentes células do sangue sejam quantificadas (DÓRIA et al., 2016).

4.2.6 Quantificação do título de IgE OVA-específica

O teste de anafilaxia cutânea passiva foi realizado para a determinação do título de IgE-OVA-específica. As amostras de soro de camundongos dos cinco grupos de animais (basal, OVA, War e Mwar) obtidas após centrifugação do sangue do plexo braquial foram descongeladas e submetidas a diluições (razão 2) em solução salina 0,9%. Em seguida foram administrados 50 µL de cada soro por via intradérmica, em oito diferentes sítios do dorso de ratas *Wistar* (n=5). As diluições testadas foram 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 e 1:2096. Cada soro foi testado em ratos diferentes, os quais foram previamente depilados e anestesiados com 500 µL da solução de quetamina e xilasina por via intraperitoneal.

Após 24 h foi realizado o desafio antigênico. Para o desafio, foi administrado na veia da calda 0,5 mL de uma solução contendo o corante azul de Evans a 1% e 2,0 mg de OVA grade II. Decorridos 30 min da injeção na veia da calda, os animais anestesiados foram sacrificados por deslocamento cervical e os diâmetros das manchas formadas nos dorsos mensurados com o auxílio de uma régua milimétrica. O título do soro fornece, portanto, uma medida indireta da concentração de IgE-OVA-específica nos grupos de animais testados. O título foi determinado pela maior diluição capaz de promover mancha mensurável (≥ 5 mm).

4.2.7 Análises histológicas

4.2.7.1 Cavidade pulmonar

Para a coleta do pulmão, os camundongos foram eutanasiados e, em seguida, no limite das costelas com o diafragma, a cavidade torácica do animal foi aberta e realizada a perfusão cardíaca. A perfusão consistiu na administração de 20 mL de solução salina no coração para retirada do sangue da circulação sanguínea e a lavagem do pulmão possibilitando sua coleta. Imediatamente após a coleta, as amostras foram submetidas à fixação em formalina tamponada por no mínimo 24 h e em seguida lavadas em água corrente. Após a coleta, o material foi registrado no livro de protocolo. Por meio desse registro, o material foi identificado por um número, tipo de experimento, datas, órgãos que o acompanharam durante todos os procedimentos da técnica histológica. Cada órgão foi inserido em um cassete devidamente identificado para facilitar o manuseio durante o processo evitando possíveis trocas.

4.2.7.2 Cavidade nasal

As cabeças dos animais foram coletadas após a coleta do pulmão e submetidas a uma rápida lavagem com solução salina possibilitando sua fixação. Posteriormente à fixação, o excesso de pele das cabeças foi retirado, a mandíbula inferior e os olhos foram removidos e o crânio seccionado na região posterior, entre o terceiro dente superior e a abertura posterior do ducto faríngeo (nasofaringe) (GUIBAS et al., 2014). Em seguida, os narizes foram submetidos à descalcificação química pelo auxílio de um agente quelante, o EDTA, durante uma média de 15 dias. Os narizes foram suspensos no líquido descalcificador, com o volume igual ou superior a vinte vezes o volume da peça. A solução descalcificadora foi trocada diariamente e, quando possível, o frasco foi submetido à agitação. Após 10 dias foi feito o teste físico da agulha para assegurar que ocorreu a descalcificação. Uma vez obtida a completa descalcificação das amostras, elas foram lavadas para retirada do fixador e era dado prosseguimento ao processamento histológico.

4.2.7.3 Processamento histológico

O material histológico foi inicialmente desidratado por imersões de 1 hora numa série crescente de álcool etílico a 70, 80, 90 e 100%. A desidratação evita a retração do tecido e, consequentemente, as lesões estruturais da célula de caráter irreversível. (MOLINARO et al., 2010). Em seguida, foi feita a diafanização, na qual o material foi imerso duas vezes em xilol com duração de 1 h cada imersão. O xilol funciona nesta etapa como desalcolizante. Em sequência à diafanização, a impregnação do material foi realizada em parafina. Na impregnação, as amostras foram submetidas a dois banhos sucessivos em parafina, cada banho com duração de 1 h. Após impregnação, o material histológico foi emblocado em formas de parafina. Quando o material foi totalmente imerso, cada forma foi deixada ao ar livre para solidificação da parafina. Os blocos formados foram retirados das formas e, em seguida, foram realizados os cortes histológicos no micrótomo.

Os cortes histológicos foram realizados com espessura de 5 µm. Após a microtomia, as fitas de parafina obtidas foram colocadas em banho-maria (38 – 40 ° C). Com auxílio das lâminas, os cortes foram “pescados” do banho-maria. Em seguida, as lâminas foram reservadas para secagem. Com os cortes aderidos às lâminas, foram realizadas colorações diferentes: hematoxilina eosina (HE) para visualização e análise do corte histológico e da migração celular; Ácido Periódico de Schiff (PAS) para observação das células caliciformes produtoras de muco; Azul de toluidina (AT) para análise do processo alérgico mediada por mastócitos; Tricrômico de Gomori (TG) para análise de fibrose na matriz extracelular. Em seguida, era realizada a montagem das lâminas com inserção de lamínulas. Como meio de montagem (selante) era utilizado o balsamo do Canadá (VIERA, 2008).

4.2.7.4 Fotomicrografias

As fotografias digitais foram capturadas pela câmera Moticam 5.0 MP acoplada a um microscópio óptico. As imagens foram calibradas no programa MOTIC PLUS em definições específicas conforme a objetiva utilizada: 10x ou 40x. A análise histológica foi realizada por um operador capacitado, o qual analisava qualitativamente os parâmetros histológicos para em seguida quantificá-los estatisticamente

4.2.8 Quantificação de citocinas no BALF

O BALF de cada grupo experimental foi congelado a -20°C para posterior quantificação das seguintes citocinas: IL-4, IL-13, IL-5, IL-33, IL-17, IL-10, IFN- γ . Essa quantificação foi realizada pelo ensaio imunoenzimático, de acordo com o protocolo da técnica ELISA sanduíche especificado no *Kit* do fabricante (eBioscience®, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

4.2.9 Análise da expressão do fator de transcrição NF- κ B (p65)

Para avaliação da expressão da subunidade p65 (porção ativa) do fator de transcrição NF- κ B foi utilizada a técnica de citometria de fluxo. A análise celular por citometria de fluxo permite a distinção de populações celulares pelo tamanho (difração da luz) e granulosidade (difusão da luz). A amostra utilizada foi o BALF, o qual foi centrifugado, retirou-se o sobrenadante e o ressuspendeu em um volume pré-calculado para se obter 2×10^5 células/mL de PBS. A amostra foi submetida ao protocolo descrito no *kit*. A leitura dos resultados foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCanto II). Os resultados obtidos foram analisados com auxílio do *software Flow Jo*.

4.2.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (S.E.M.) e analisados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA *one-way*), seguido de pós-teste de *Tukey* para comparação múltipla entre os grupos experimentais. Os valores foram considerados significativos quando os valores de $p < 0,05$. Todos os dados foram analisados pelo *software GraphPad Prism®* versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, E.U.A.). Os dados das análises histológicas foram analisados com o teste de *Kruskal-Wallis* e os parâmetros considerados para o cálculo da pontuação (escore histológico) foram infiltração celular, produção de muco, quantidade de fibras colágenas e número de mastócitos, conforme as colorações utilizadas (Tabela 5).

Tabela 5 - Parâmetros analisados no escore histológico.

Escore	Infiltrado, muco e fibras colágenas
0	Ausência de alterações histológicas
1	Grau leve: menos de 25% do campo microscópico
2	Grau moderado: de 25 a 49% do campo microscópico
3	Grau acentuado: de 50 a 75% do campo microscópico
4	Grau muito acentuado: mais de 75% do campo microscópico

Escore	Mastócitos
0	Menos de 5 células por campo
1	De 5 a 15 células por campo microscópico
2	De 16 a 25 células por campo microscópico
3	De 26 a 35 células por campo microscópico
4	Mais de 35 células por campo microscópico

Fonte: adaptado Ponikau et al., 2003

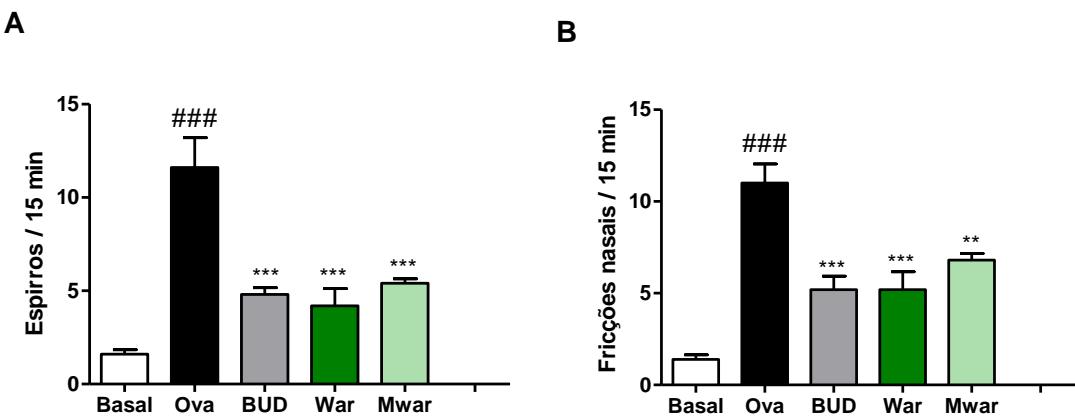


Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Efeito do tratamento com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar) nos sinais clínicos da rinite em camundongos com CARAS

O tratamento com os alcaloides warifteina e metilwarifteina na dose de 2 mg/kg reduziu significativamente os sinais clínicos da rinite, número de espirros e fricções nasais, quantificados por 15 minutos após o ultimo desafio com OVA via aerossol. Os números de espirros ($11,6 \pm 1,6$, $p < 0,001$) (Gráfico 1A) e de fricções nasais ($11,0 \pm 1,0$, $p < 0,001$) (Gráfico 1B) aumentaram no grupo OVA quando comparados com os animais do grupo basal ($1,6 \pm 0,2$; $1,4 \pm 0,2$; respectivamente). Os tratamentos com a War ($4,2 \pm 0,9$, $p < 0,001$) ou com a Mwar ($5,4 \pm 0,2$, $p < 0,001$) diminuíram o número de espirros quando comparado ao grupo OVA ($11,6 \pm 1,6$) (Gráfico 1A) bem como o número de fricções nasais (War - $5,2 \pm 0,9$, $p < 0,001$ e Mwar - $6,8 \pm 0,3$, $p < 0,01$) em comparação ao grupo OVA ($11,0 \pm 1,0$) (Gráfico 1B). A droga padrão budesonida (BUD) diminuiu significativamente os números de espirros e fricções nasais como esperado. Não houve diferenças estatísticas nos números de espirros e fricções nasais entre os grupos BUD ($4,8 \pm 0,3$), War ($4,2 \pm 0,9$) e Mwar ($5,4 \pm 0,2$).

Gráfico 1 - Quantificação de espirros (A) e fricções nasais (B) de camundongos com CARAS.

As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey (grupos vs. número de espirros (A) ou fricções nasais (B)). Os camundongos BALB/c ($n= 5$) foram distribuídos em grupos: Basal (animal no estado fisiológico); OVA (animais doentes por ovalbumina); BUD (droga padrão, budesonida 0,9 mg/kg); War (animais tratados com warifteina 2 mg/kg) ou Mwar (animais tratados com metilwarifteina 2 mg/kg). *** $p < 0,001$ (OVA vs. basal); *** $p < 0,001$ (OVA vs. BUD, War e Mwar) e ** $p < 0,01$ (OVA vs. Mwar).

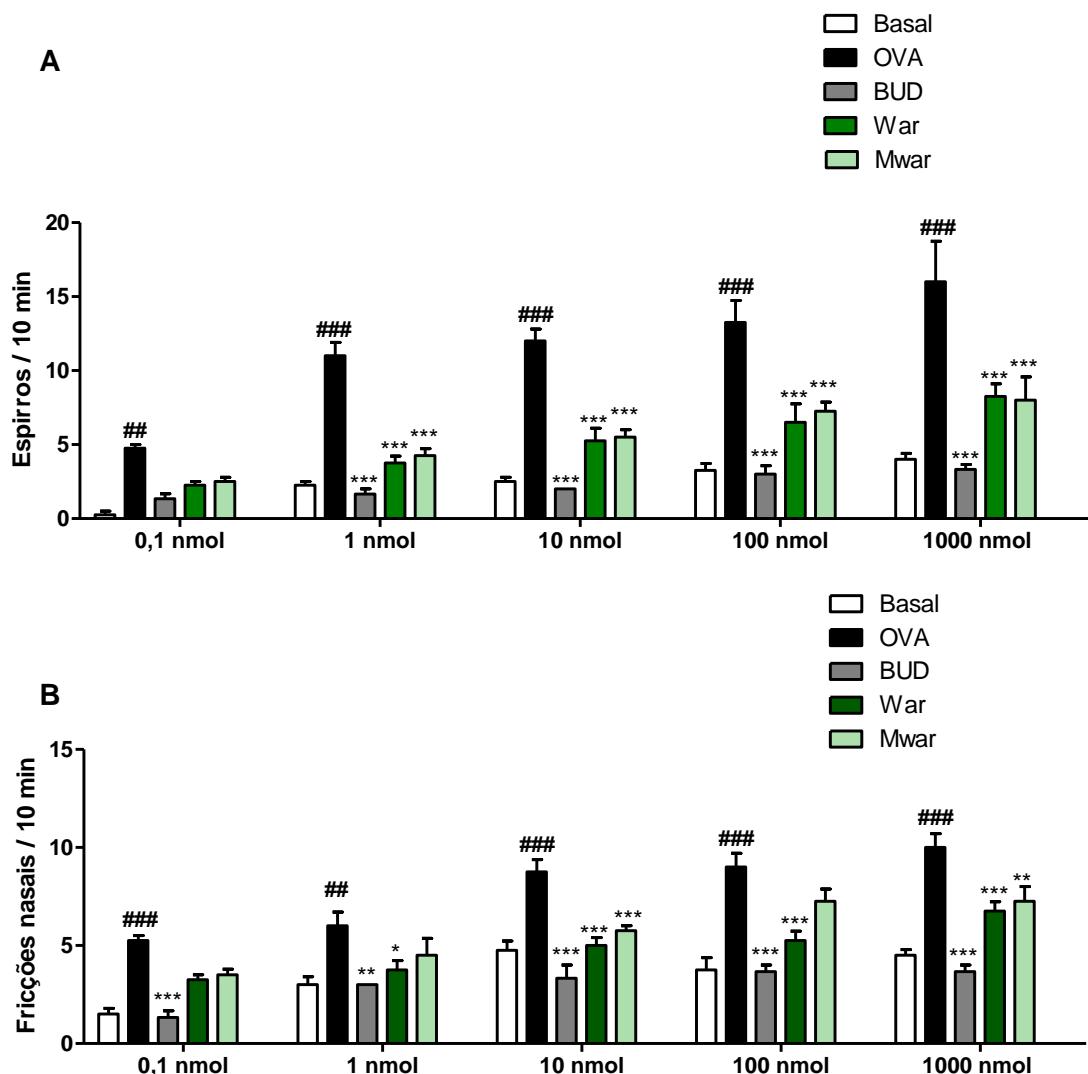
Fonte: Cavalcanti, 2020.

5.2 Efeito do tratamento com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar) na hiper-reatividade nasal induzida por histamina em camundongos com CARAS

O tratamento com a War foi capaz de reduzir o número de espirros logo após a administração da histamina nas doses de 1 nmol ($3,7 \pm 0,4$; $p < 0,001$), 10 nmol ($5,2 \pm 0,6$; $p < 0,001$), 100 nmol ($6,5 \pm 0,8$; $p < 0,001$) e 1000 nmol ($8,2 \pm 0,5$; $p < 0,001$) quando comparado ao grupo OVA ($11,0 \pm 0,2$; $12,0 \pm 0,3$; $13,2 \pm 0,4$; $16,0 \pm 1,2$), respectivamente (Gráfico 2A). Resultados semelhantes foram obtidos com o tratamento com a Mwar reduzindo o número de espirros após a administração das doses de histamina: 1 nmol ($4,2 \pm 0,3$; $p < 0,001$), 10 nmol ($5,5 \pm 0,4$; $p < 0,001$), 100 nmol ($7,2 \pm 0,5$; $p < 0,001$) e 1000 nmol ($8,0 \pm 0,6$; $p < 0,001$) em comparação ao grupo OVA. O grupo BUD apresentou resultados semelhantes aos dos alcaloides em análise (Gráfico 2A). Quanto ao número de fricções nasais, a War reduziu esse parâmetro após a administração da histamina nas doses de 1 nmol ($3,7 \pm 0,2$; $p < 0,05$), 10 nmol ($5,0 \pm 0,2$; $p < 0,001$), 100 nmol ($5,2 \pm 0,2$; $p < 0,001$) e 1000 nmol ($6,7 \pm 0,4$; $p < 0,001$) quando comparado ao grupo OVA ($11,0 \pm 0,2$; $12,0 \pm 0,3$; $13,2 \pm 0,4$; $16,0 \pm 1,2$), respectivamente (Gráfico 2B). Resultados semelhantes foram obtidos com o tratamento com a Mwar reduzindo o número de fricções nasais após a administração das doses de histamina: 1 nmol ($4,2 \pm 0,3$; $p < 0,001$), 10 nmol ($5,5 \pm 0,4$; $p < 0,001$), 100 nmol ($7,2 \pm 0,5$; $p < 0,001$) e 1000 nmol ($8,0 \pm 0,6$; $p < 0,001$) em comparação ao grupo OVA. O grupo BUD apresentou resultados semelhantes aos dos alcaloides em análise (Gráfico 2B).

$\pm 0,2$; $p < 0,001$) em comparação aos animais do grupo OVA nas respectivas doses ($6,0 \pm 0,3$; $8,7 \pm 0,2$; $9,0 \pm 0,2$; $10,0 \pm 0,2$) (Gráfico 2B). A Mwar reduziu o número de fricções nasais após a administração de histamina nas doses de 10 nm ($5,7 \pm 0,1$; $p < 0,001$) e 1000 nm ($7,2 \pm 0,2$; $p < 0,01$) em relação ao grupo OVA. A budesonida foi eficaz em reduzir o número de fricções nasais em todas as doses de histamina administradas (Gráfico 2B).

Gráfico 2 - Quantificação de espirros (A) e fricções nasais (B) de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) após administração de doses crescentes de histamina.



As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey (dose da histamina vs. número de espirros (A) ou fricções nasais (B)). Os camundongos BALB/c ($n= 5$) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); OVA (animais doentes por ovalbumina); BUD (droga padrão, budesonida $0,9 \text{ mg/kg}$); War (animais tratados com warfarina 2 mg/kg) ou Mwar (animais tratados com

metilwarifteina 2 mg/kg). $###p < 0,001$ (OVA vs. basal); $##p < 0,01$ (OVA vs. basal); $***p < 0,001$ (OVA vs. BUD, War e Mwar); $**p < 0,01$ (OVA vs. Mwar) e $*p < 0,05$ (OVA vs. War).

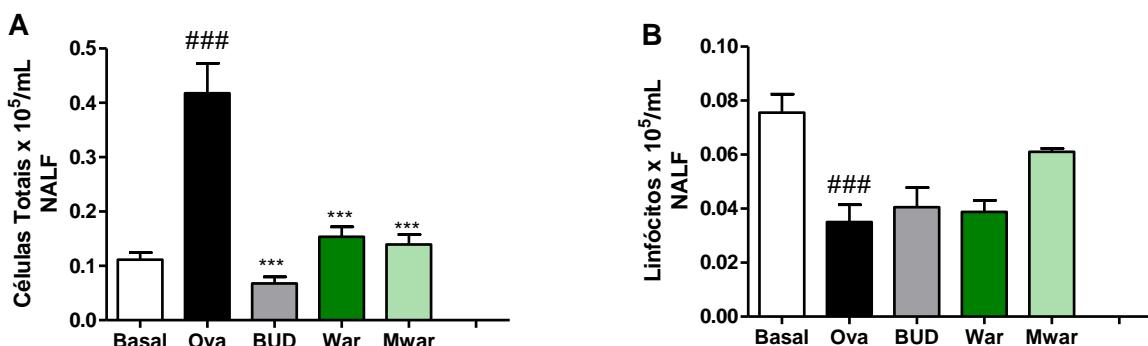
Fonte: Cavalcanti, 2020.

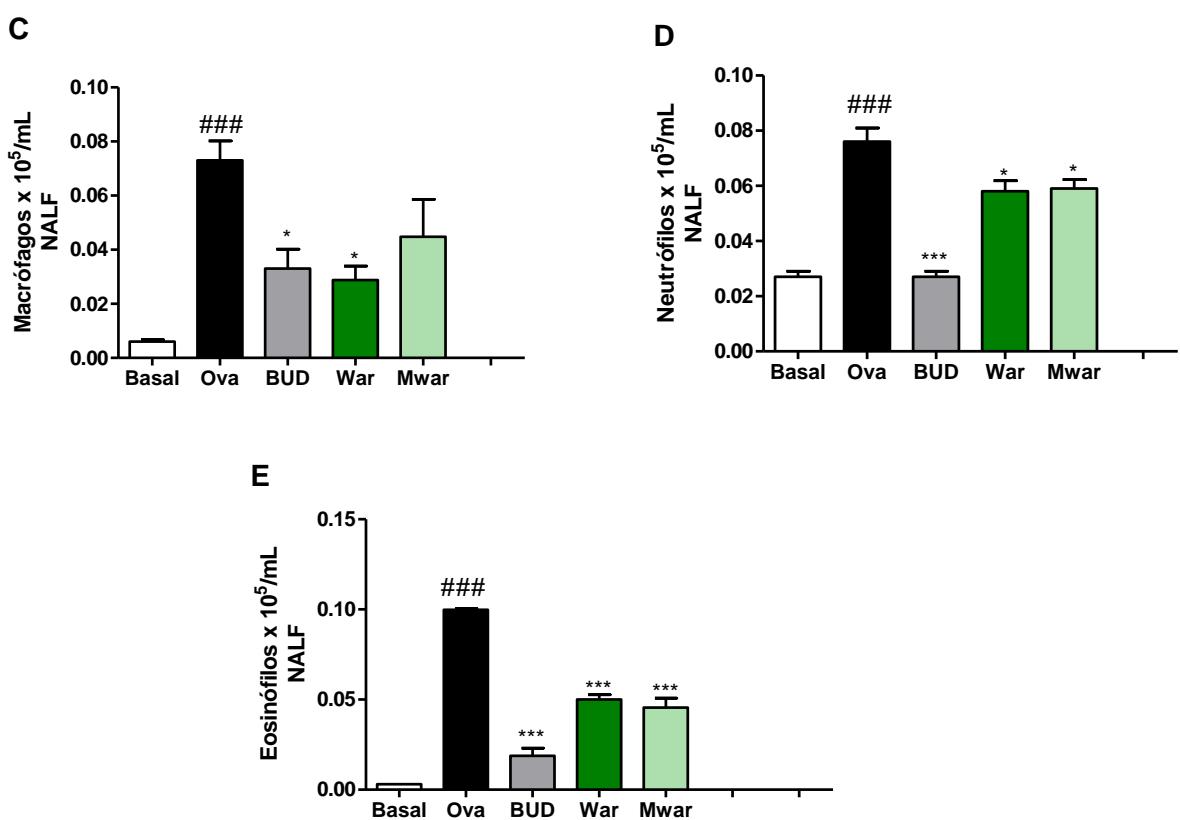
5.3 Efeito do tratamento com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar) na migração de células inflamatórias para o Fluido do Lavado Nasal (NALF) de camundongos com CARAS

Os tratamentos com a War ($0,15 \pm 0,0$; $p < 0,001$) ou com a Mwar ($0,13 \pm 0,0$; $p < 0,001$) reduziram a migração de células inflamatórias para o NALF quando comparado ao grupo OVA ($0,4 \pm 0,0$) de forma semelhante ao efeito observado pela budesonida ($0,06 \pm 0,01$; $p < 0,001$) (Gráfico 3A). Em adição, a War reduziu a migração de macrófagos ($0,02 \pm 0,00$; $p < 0,05$) (Gráfico 3C), neutrófilos ($0,05 \pm 0,00$; $p < 0,05$) (Gráfico 3D) e eosinófilos ($0,05 \pm 0,00$; $p < 0,001$) (Gráfico 3E), no NALF, quando comparado ao grupo OVA ($0,07 \pm 0,00$; $0,07 \pm 0,00$; $0,09 \pm 0,00$, respectivamente). O número de linfócitos não alterou no grupo War ($0,03 \pm 0,00$) quando comparado ao grupo OVA ($0,03 \pm 0,00$) (Gráfico 3B). O grupo BUD apresentou resultados semelhantes ao grupo War no perfil de migração celular para o NALF.

O tratamento com a Mwar não alterou o número de macrófagos ($0,04 \pm 0,01$) (Gráfico 3C) e linfócitos ($0,06 \pm 0,00$) (Gráfico 3B) quando comparado ao grupo OVA ($0,07 \pm 0,00$; $0,03 \pm 0,00$, respectivamente). O número de neutrófilos ($0,06 \pm 0,00$; $p < 0,05$) (Gráfico 3D) e eosinófilos ($0,04 \pm 0,00$; $p < 0,001$) (Gráfico 3E) foram reduzidos pela Mwar em relação ao grupo OVA ($0,07 \pm 0,00$; $0,09 \pm 0,00$, respectivamente).

Gráfico 3 - Efeito do tratamento com warifteina ou metilwarifteina no número de células totais (A) linfócitos, (B) macrófagos, (C) neutrófilos, (D) e eosinófilos (E) no Fluido do Lavado Nasal (NALF) de camundongos com CARAS.





As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* (número de células totais (**A**) linfócitos (**B**) macrófagos (**C**) neutrófilos (**D**) eosinófilos (**E**) vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c ($n= 5$) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); OVA (animais doentes por ovalbumina); BUD (droga padrão, budesonida 0,9 mg/kg); War (animais tratados com warifteína 2 mg/kg) ou Mwar (animais tratados com metilwarifteína 2 mg/kg). *** $p < 0,001$ (OVA vs. basal); *** $p < 0,001$ (OVA vs. BUD, War e Mwar) e * $p < 0,05$ (OVA vs. BUD, War e Mwar).

Fonte: Cavalcanti, 2020.

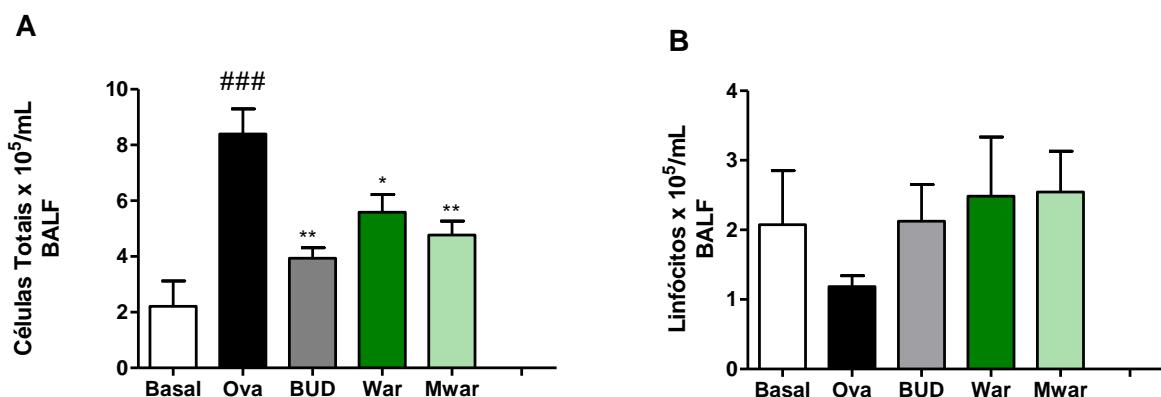
5.4 Efeito do tratamento com warifteína (War) ou metilwarifteína (Mwar) na migração celular para o Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) de camundongos com CARAS.

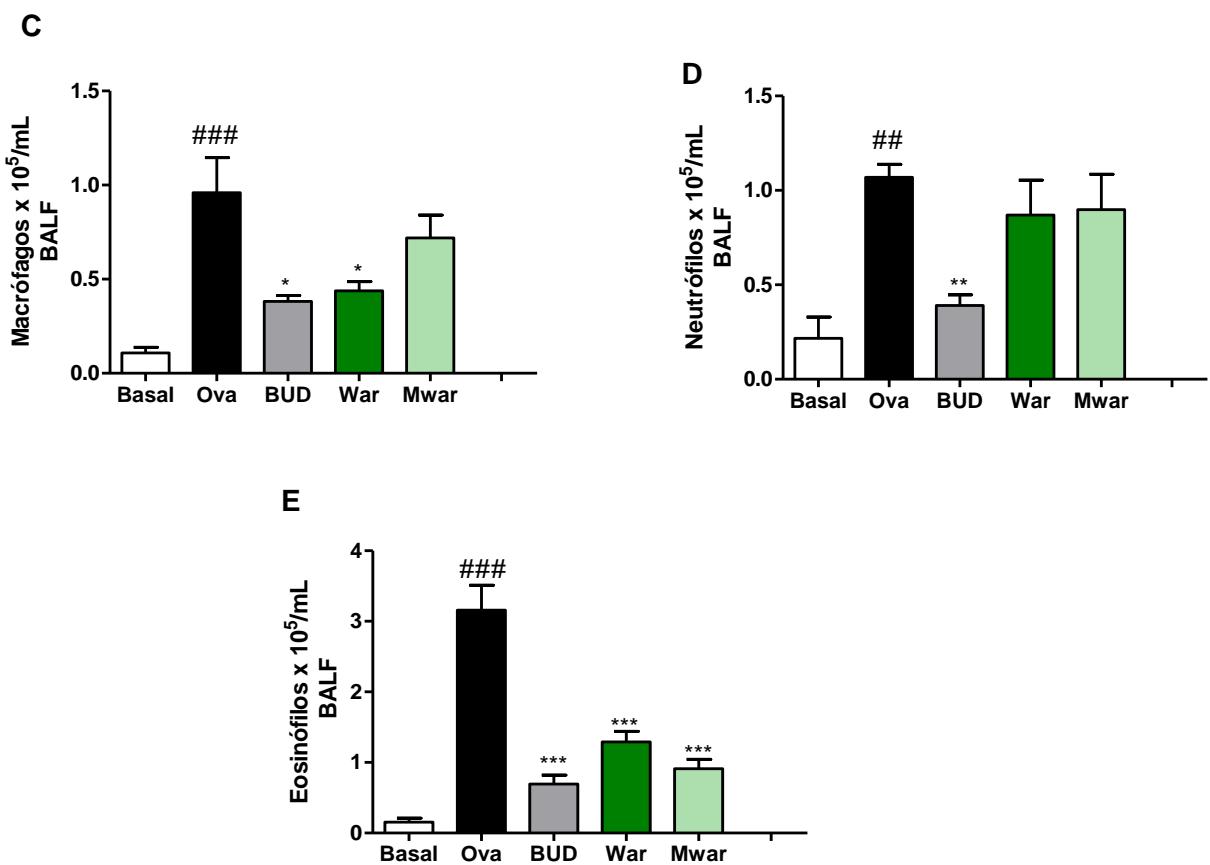
A quantidade de células totais no BALF foi reduzida pelos tratamentos com War ($5,5 \pm 0,6$; $p < 0,05$) ou Mwar ($4,7 \pm 0,7$; $p < 0,01$) quando comparada a do grupo OVA ($8,4 \pm 0,8$) (Gráfico 4A). Em relação ao número de linfócitos não foi observado diferenças entre os grupos estudados (Gráfico 4B). Entretanto, a War foi capaz de reduzir o número de macrófagos ($0,43 \pm 0,04$; $p < 0,05$) (Gráfico 4C) e eosinófilos ($1,29 \pm 0,14$; $p < 0,001$) (Gráfico 4E) no BALF em comparação ao grupo OVA ($0,95 \pm$

0,18, Gráfico 4C; $3,15 \pm 0,35$, Gráfico 4E, respectivamente). O número de neutrófilos não foi alterado pelo tratamento com a War ($0,86 \pm 0,18$) em relação ao grupo OVA ($1,06 \pm 0,06$) (Gráfico 4D).

O tratamento com Mwar não alterou a população de linfócitos ($2,54 \pm 0,58$) (Gráfico 4B), macrófagos ($0,71 \pm 0,12$) (Gráfico 4C) e neutrófilos ($0,89 \pm 0,18$) (Gráfico 4D) em comparação ao grupo OVA ($1,18 \pm 0,15$, Gráfico 4B; $0,95 \pm 0,18$, Gráfico 4C; $1,06 \pm 0,06$, Gráfico 4D, respectivamente). No que tange a população eosinofílica, a Mwar ($0,91 \pm 0,13$; $p < 0,001$) (Gráfico 4E) reduziu a migração dessas células para o BALF quando comparado ao grupo OVA ($3,15 \pm 0,35$) (Gráfico 4E). Na população de eosinófilo observou-se redução semelhante entre os alcaloides War ($1,29 \pm 0,14$; $p < 0,001$), Mwar ($0,91 \pm 0,13$; $p < 0,001$) e a droga padrão budesonida ($0,69 \pm 0,12$; $p < 0,001$) em relação ao grupo OVA ($3,15 \pm 0,35$) (Gráfico 4E).

Gráfico 4 - Efeito do tratamento com a warifteina ou metilwarifteina no número de células totais (**A**) linfócitos (**B**) macrófagos (**C**) neutrófilos (**D**) e eosinófilos (**E**) no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) de camundongos com CARAS.





As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey* (número de células totais (A) linfócitos (B) macrófagos (C) neutrófilos (D) eosinófilos (E) vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); OVA (animais doentes por ovalbumina); BUD (droga padrão, budesonida 0,9 mg/kg); War (animais tratados com warifteina 2 mg/kg) ou Mwar (animais tratados com metilwarifteina 2 mg/kg). ***p < 0,001 (OVA vs. basal); ***p < 0,001(OVA vs. BUD, War e Mwar); **p < 0,01(OVA vs. BUD, War e Mwar) e *p < 0,05 (OVA vs. BUD e War).

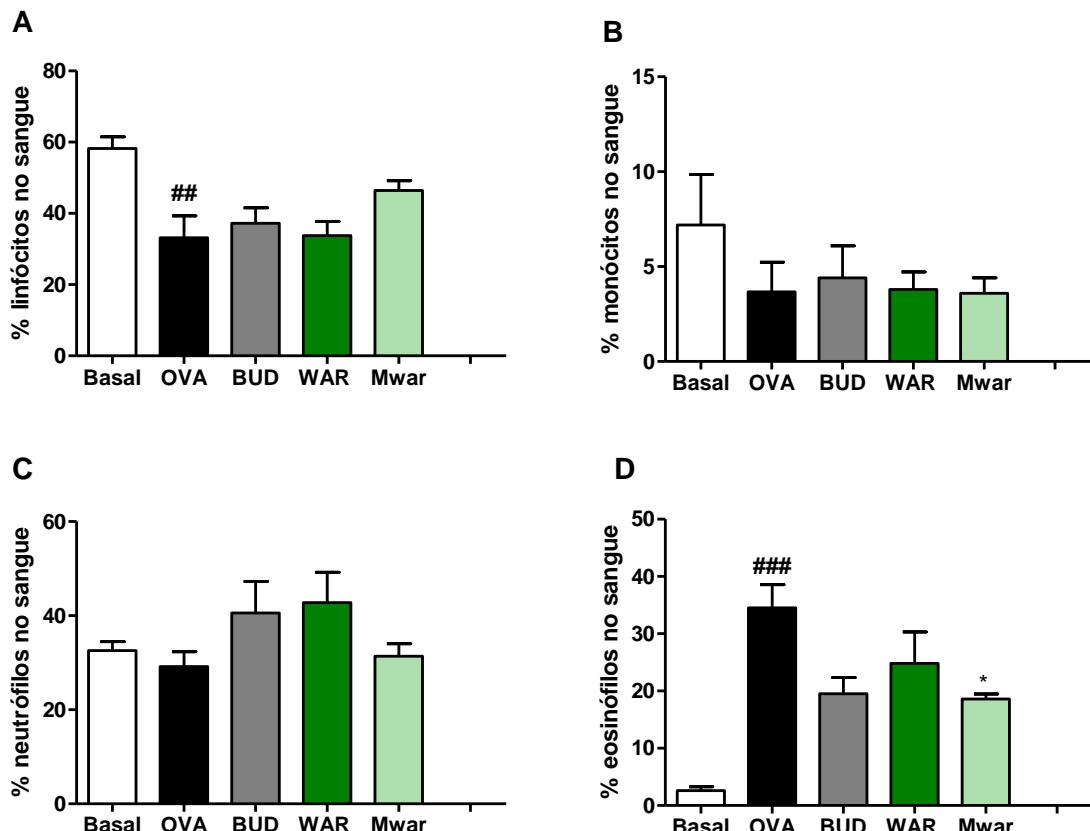
Fonte: Cavalcanti, 2020.

5.5 Efeito do tratamento com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar) no perfil celular sistêmico de camundongos com CARAS

O tratamento com a Mwar ($18,6 \pm 0,8$; $p < 0,05$) foi capaz de reduzir significantemente o número de eosinófilos na corrente sanguínea quando comparado ao grupo OVA ($34,5 \pm 4,0$) (Gráfico 5D). No entanto, a Mwar não alterou o número de linfócitos (Gráfico 5A), monócitos (Gráfico 5B) e neutrófilos (Gráfico 5C) quantificados. Em relação aos animais do grupo War, não foram observadas diferenças na

porcentagem de linfócitos (Gráfico 5A), monócitos (Gráfico 5B), neutrófilos (Gráfico 5C) e eosinófilos (Gráfico 5D) no sangue periférico de camundongos com CARAS.

Gráfico 5 - Efeito do tratamento com os alcaloides warifteina ou metilwarifteina no número de linfócitos (A) monócitos (B) neutrófilos (C) e eosinófilos (D) no sangue periférico de camundongos com CARAS.



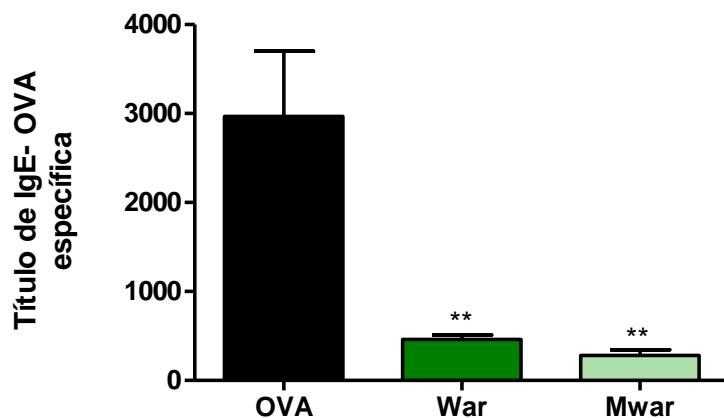
As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey (% de linfócitos (A) % de monócitos (B) % de neutrófilos (C) % de eosinófilos (D) vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); OVA (animais doentes por ovalbumina); BUD (droga padrão, budesonida 0,9 mg/kg); War (animais tratados com warifteina 2 mg/kg) ou Mwar (animais tratados com metilwarifteina 2 mg/kg). ##p < 0,01 (OVA vs. basal); ###p < 0,001 (OVA vs. basal); *p < 0,05 (OVA vs. Mwar).

Fonte: Cavalcanti, 2020.

5.6 Efeito do tratamento com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar) na concentração sérica de IgE-OVA específica em camundongos com CARAS

O título de IgE-OVA específica foi reduzido após os tratamentos com War ($460,8 \pm 51,2$; $p < 0,01$) ou Mwar ($281,6 \pm 62,7$; $p < 0,01$) quando comparado ao título do grupo OVA ($2970,0 \pm 731,3$) (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Efeito do tratamento com os alcaloides warifteina ou metilwarifteina no título de IgE OVA específica no soro de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey (título de IgE-OVA específica vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c ($n= 5$) foram distribuídos em grupos: OVA (animais doentes por ovalbumina); War (animais tratados com warifteina 2 mg/kg) ou Mwar (animais tratados com metilwarifteina 2 mg/kg). $**p < 0,01$ (OVA vs. War e Mwar).

Fonte: Cavalcanti, 2020.

5.7 Análise histológica da cavidade nasal de camundongos com CARAS e tratados com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar).

A análise histológica do compartimento nasal de camundongos com CARAS pela coloração Hematoxilina Eosina (HE) permitiu avaliar aspectos morfológicos como estrutura dos vasos sanguíneos, migração celular e integridade do tecido. Em objetiva de 40x, o grupo OVA apresentou alterações histológicas como congestão por infiltrado

celular (F) nas regiões perivasculares e subepitelial caracterizando o processo inflamatório quando comparado ao grupo basal (Figura 9-HE). Os tratamentos com a War ($1,7 \pm 0,2$; $p < 0,01$) ou a Mwar ($1,7 \pm 0,2$; $p < 0,01$) reduziram o infiltrado celular (F) nas regiões perivasculares em comparação com os tecidos nasais do grupo OVA ($3,7 \pm 0,2$) (Figura 9-HE e Gráfico 7). O grupo BUD mostrou diminuição ($2,0 \pm 0,4$; $p < 0,01$) do infiltrado (F) em relação ao grupo OVA ($3,7 \pm 0,2$) (Figura 9-HE e Gráfico 7).

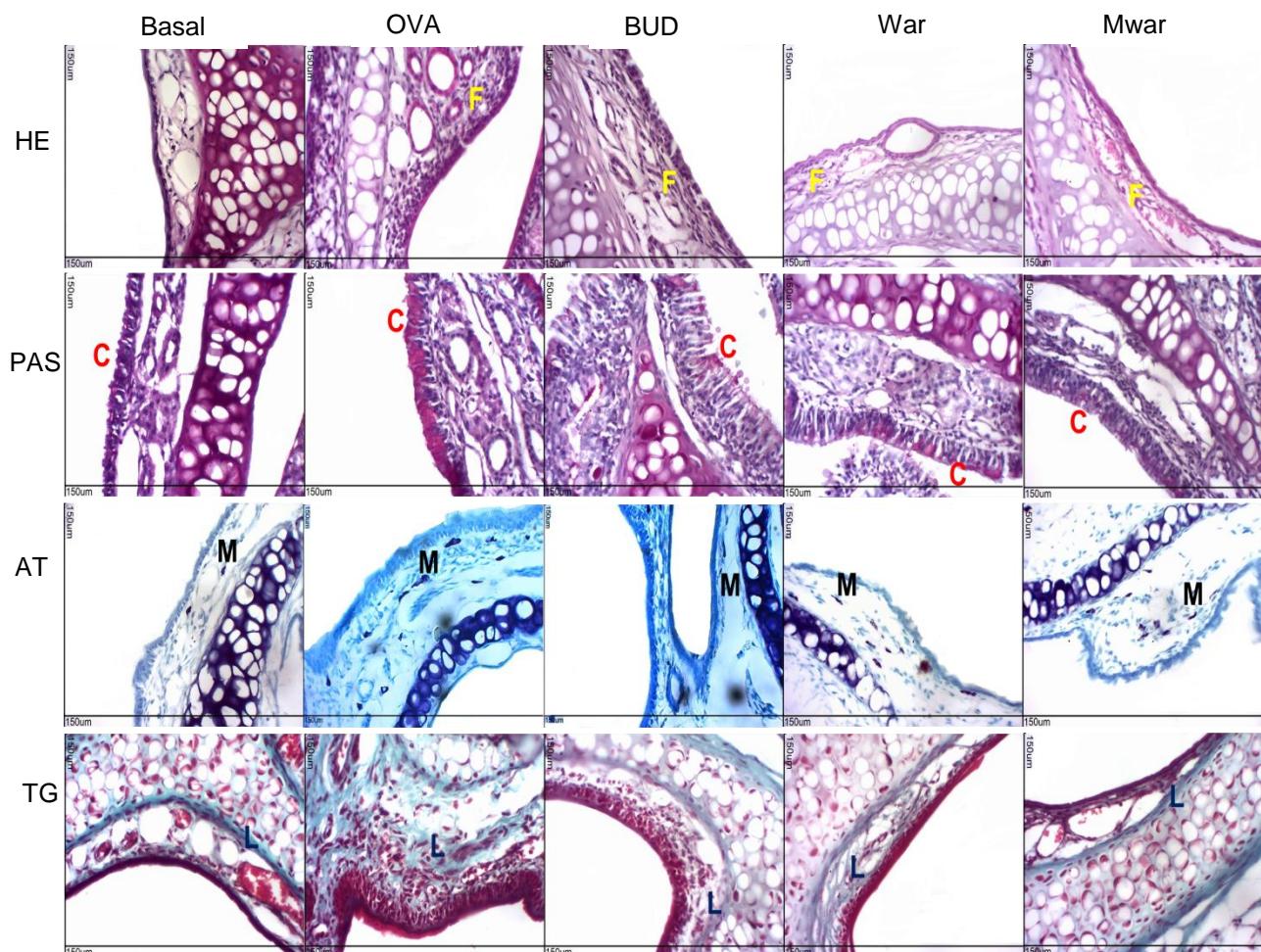
A avaliação histológica do tecido nasal pelo corante Ácido Periódico de Schiff (PAS) possibilita a observação da presença de mucopolissacarídeos nas células do epitélio. O grupo OVA demonstrou hipertrofia e hiperplasia das células produtoras de muco pela presença de mucopolissacarídeos produzidos pelas glândulas exócrinas unicelulares (células caliciformes) do epitélio (C) em comparação ao grupo basal (Figura 9-PAS e Gráfico 7). Em contraste, os tratamentos com a War ($2,2 \pm 0,2$; $p < 0,01$) ou com a Mwar ($2,2 \pm 0,2$; $p < 0,01$) reduziram a quantidade de muco (C) na cavidade nasal quando comparado com o grupo OVA ($3,7 \pm 0,2$) (Figura 9-PAS e Gráfico 7). O tratamento via intranasal com budesonida ($1,7 \pm 0,2$; $p < 0,001$) reduziu a quantidade de muco (C) em relação ao grupo OVA ($3,7 \pm 0,2$) (Figura 9-PAS e Gráfico 7).

A análise histológica do tecido nasal pela coloração com Azul de Toluidina (AT) proporciona a marcação de mastócitos por metacromasia possibilitando sua visualização na análise histológica. O grupo OVA apresentou aumento de mastócitos (M) no tecido nasal em comparação com o grupo basal (Figura 9-AT). No entanto, não foi observado diferença entre o número de mastócito (M) da cavidade nasal dos grupos War ($1,0 \pm 0,2$), Mwar ($1,0 \pm 0,2$) e BUD ($0,5 \pm 0,2$) uma vez comparados ao grupo OVA ($1,2 \pm 0,2$) (Figura 9-AT e Gráfico 7).

A análise histológica do tecido nasal pelo corante Tricromo de Gomori (TG) permite a avaliação estrutural dos componentes da matriz extracelular como o colágeno. Os tecidos oriundos dos animais do grupo OVA demonstraram aumento de fibras colágenas (L) na região perivasculares e subepitelial em comparação com os dos animais do grupo basal (Figura 9-TG). Nos grupos tratados com War ($1,2 \pm 0,2$; $p < 0,05$) ou Mwar ($1,2 \pm 0,2$; $p < 0,05$) houve redução da quantidade de fibras colágenas (L) em comparação com o grupo OVA ($2,7 \pm 0,4$) (Figura 9-TG e Gráfico 7). O grupo budesonida (BUD) ($1,2 \pm 0,2$; $p < 0,05$) apresentou redução na quantidade de fibras

colágenas (**L**) quando comparado ao o grupo OVA ($2,7 \pm 0,4$) (Figura 9-TG e Gráfico 7) como esperado.

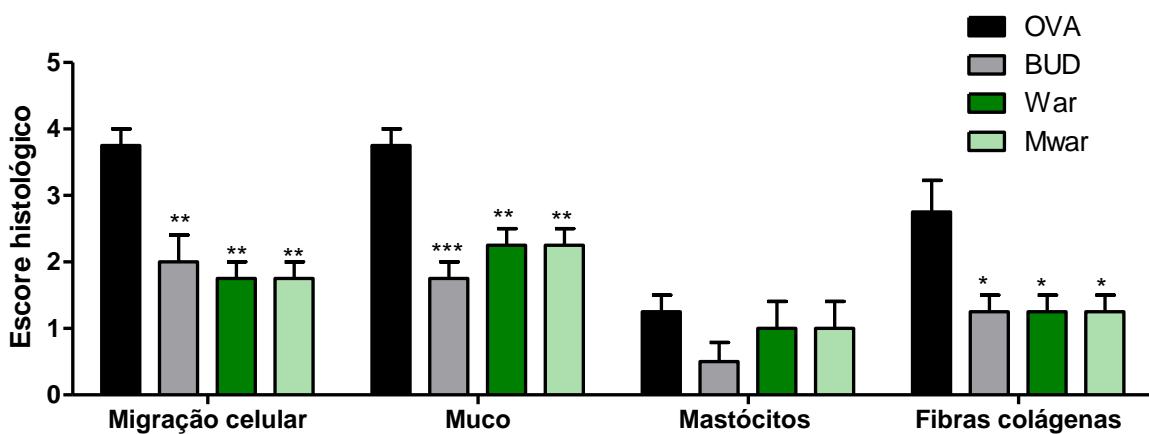
Figura 9 - Fotomicrografias representativas do tecido nasal dos camundongos tratados com warifteina ou metilwarifteina e corados com Hematoxilina Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS), Azul de Toluidina (AT) ou Tricromo de Gomori (TG).



As colunas representam os grupos basal; OVA (OVAAlbumina); BUD (budesonida 0,9 mg/kg); War (warifteina 2 mg/kg) e Mwar (metilwarifteina 2 mg/kg). As linhas horizontais representam a coloração utilizada: Hematoxilina Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS), Azul de Toluidina (AT) e Tricromo de Gomori (TG). Aumento total 400x (150 µm). As letras indicam o parâmetro avaliado: **F** (infiltrado celular); **C** (células caliciformes); **M** (mastócitos) e **L** (fibras colágenas).

Fonte: Cavalcanti, 2020.

Gráfico 7 - Escore qualitativo das alterações morfológicas na cavidade nasal dos camundongos tratados com warifteina ou metilwarifteina.



As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA one-way seguido do teste de Kruskal-Wallis (Alteração morfológica vs. escore). Os camundongos BALB/c ($n= 5$) foram distribuídos em grupos: OVA (animais doentes por ovalbumina); BUD (budesonida 0,9 mg/kg); War (animais tratados com warifteina 2 mg/kg) ou Mwar (animais tratados com metilwarifteina 2 mg/kg). *** $p < 0,001$ (OVA vs. BUD); ** $p < 0,01$ (OVA vs. BUD, War e Mwar); * $p < 0,05$ (OVA vs. BUD, War e Mwar).

Fonte: Cavalcanti, 2020.

5.8 Análise histológica de pulmões de camundongos com CARAS e tratados com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar)

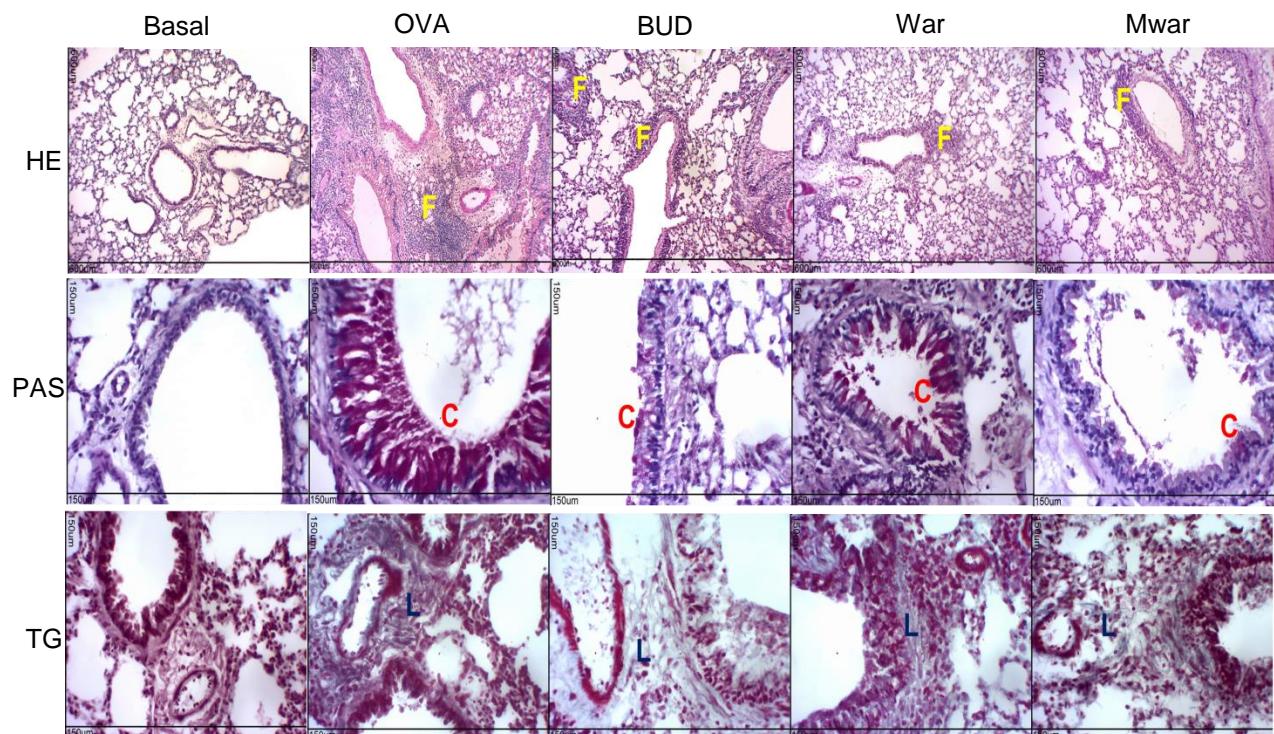
Os pulmões dos animais do grupo OVA ($3,80 \pm 0,20$) apresentaram aumento na migração de células inflamatórias (F) na região perivascular e peribronquiolar em relação ao grupo basal (Figura 10-HE). Os camundongos tratados com War ($2,0 \pm 0,4$; $p < 0,01$) ou Mwar ($2,2 \pm 0,2$; $p < 0,05$) apresentaram diminuição da infiltração celular (F) nas regiões perivasculares e peribronquiolar quando comparado ao grupo OVA ($3,7 \pm 0,2$) (Figura 10-HE e Gráfico 8). O grupo BUD ($2,2 \pm 0,2$; $p < 0,05$) reduziu o infiltrado celular (F) comparando-se ao grupo OVA ($3,7 \pm 0,2$) (Figura 10-HE e Gráfico 8).

Em relação à atividade das células produtoras de muco avaliadas pela coloração do Ácido Periódico de Schiff (PAS), nos tecidos pulmonares dos animais do grupo OVA observou-se hipertrofia e hiperplasia das células caliciformes no epitélio (C) em comparação com os animais do grupo basal (Figura 10-PAS). No entanto, os tratamentos com War ($2,0 \pm 0,4$; $p < 0,01$) ou Mwar ($1,7 \pm 0,2$; $p < 0,01$) reduziram a

quantidade de muco (**C**) quando comparados com os animais do grupo OVA ($3,7 \pm 0,2$). Os camundongos tratados com budesonida ($1,2 \pm 0,2$; $p < 0,001$) apresentaram diminuição na produção de muco no epitélio pulmonar quando comparado ao grupo OVA ($3,7 \pm 0,2$) (Figura 10-PAS e Gráfico 8).

Os tecidos pulmonares dos camundongos do grupo OVA corados com Tricromo de Gomori (TG) apresentaram aumento na quantidade de fibras colágenas (**L**) na região perivasicular quando comparado à quantidade de fibras (**L**) nos animais do grupo basal (Figura 10-TG). O tratamento com War ($2,2 \pm 0,2$; $p < 0,05$) induziu diminuição na quantidade de fibras em relação ao grupo OVA ($3,5 \pm 0,2$) (Figura 10-TG e Gráfico 8). Em adição, o tratamento com a Mwar ($1,7 \pm 0,4$; $p < 0,01$) reduziu a quantidade de fibras colágenas (**L**) em comparação com o grupo OVA ($3,5 \pm 0,2$) (Figura 10-TG e Gráfico 8). Resultado semelhante foi observado no grupo BUD ($1,7 \pm 0,4$; $p < 0,001$) com redução de fibras colágenas (**L**) quando comparado ao grupo OVA ($3,5 \pm 0,2$) (Figura 10-TG e Gráfico 8).

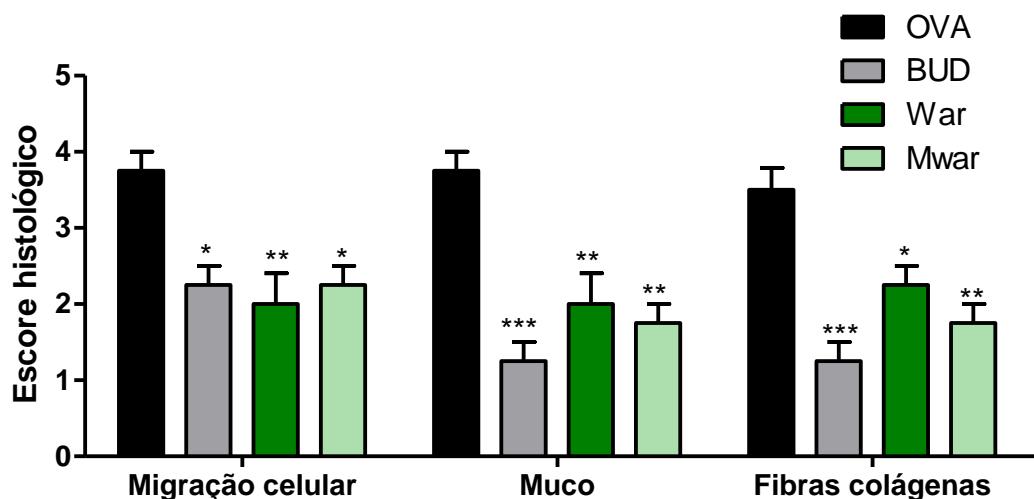
Figura 10 - Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar dos camundongos tratados com warifteina ou metilwarifteina nas colorações Hematoxilina Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS) ou Tricromo de Gomori (TG).



As colunas representam os grupos basal; OVA (ovalbumina); BUD (budesonida 0,9 mg/kg); War (warifteina 2 mg/kg) ou Mwar (metilwarifteina 2 mg/kg). As linhas horizontais representam a coloração utilizada: Hematoxilina Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Tricromo de Gomori (TG). Aumento total 100x (600 μ m) ou 400x (150 μ m). As letras indicam o parâmetro avaliado: **F** (infiltrado celular); **C** (células caliciformes) e **L** (fibras colágenas).

Fonte: Cavalcanti, 2020.

Gráfico 8 - Escore qualitativo das alterações morfológicas no tecido pulmonar dos camundongos tratados warifteina ou metilwarifteina.



As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA one-way seguido do teste de Kruskal-Wallis (Alteração morfológica vs. escore). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: OVA (animais doentes por ovalbumina); BUD (budesonida 0,9 mg/kg); War (animais tratados com warifteina 2 mg/kg) ou Mwar (animais tratados com metilwarifteina 2 mg/kg). ***p < 0,001(OVA vs. BUD); **p < 0,01 (OVA vs. BUD, War e Mwar); *p < 0,05 (OVA vs. BUD, War e Mwar).

Fonte: Cavalcanti, 2020.

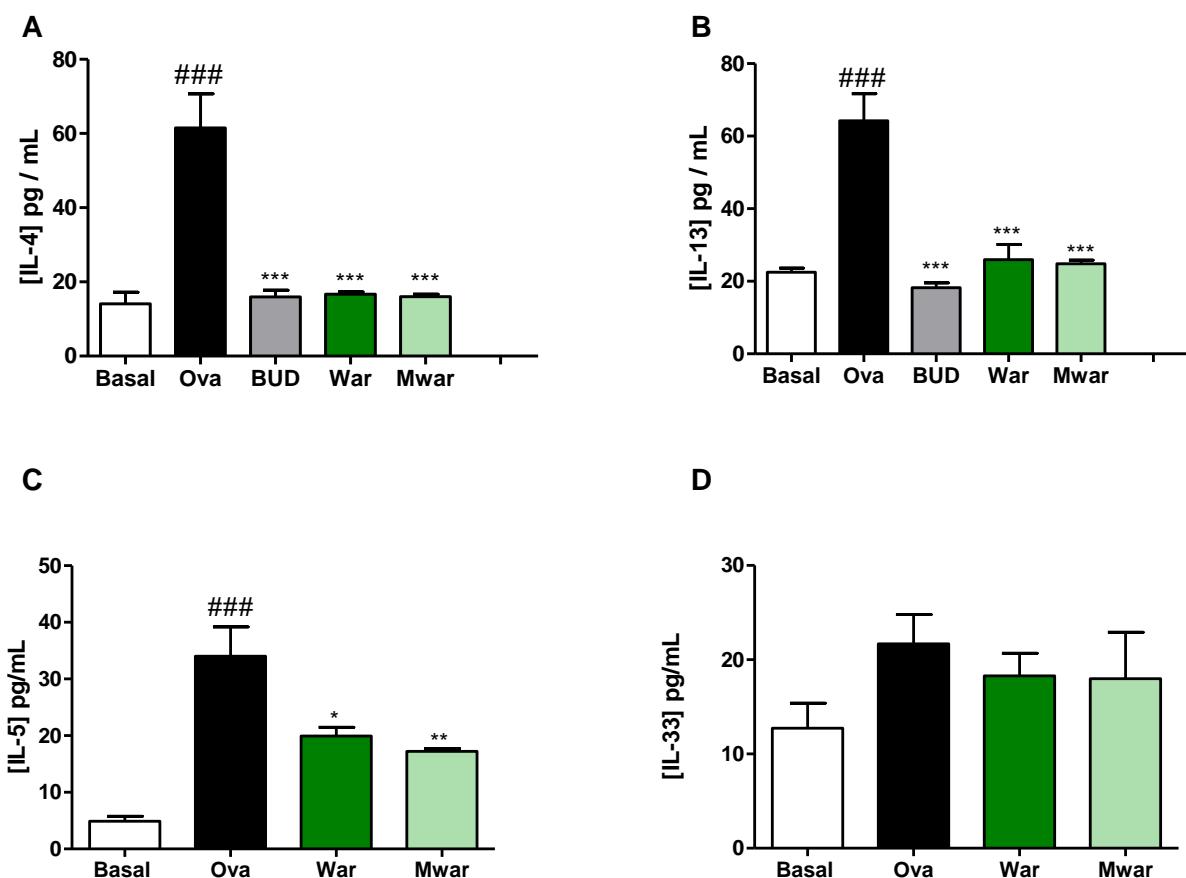
5.9 Efeito do tratamento com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar) nos níveis das citocinas IL-4, IL-13, IL-5, IL-10, IL-17, IL-33 e IFN- γ no BALF de camundongos com CARAS

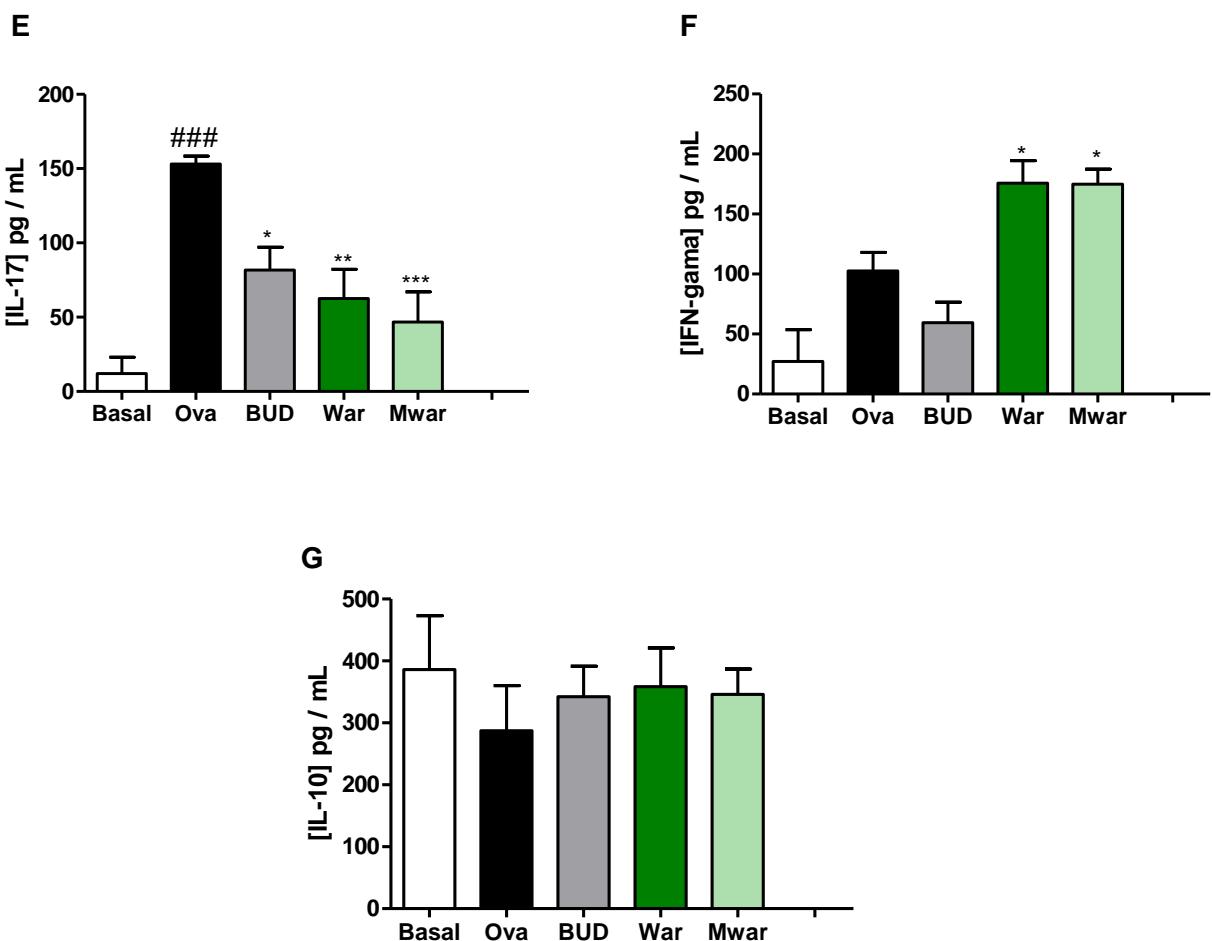
O tratamento com War reduziu os níveis de IL-4 ($16,7 \pm 0,5$; $p < 0,001$ - Gráfico 9A), IL-13 ($25,9 \pm 4,1$; $p < 0,001$ - Gráfico 9B), IL-5 ($19,9 \pm 1,5$; $p < 0,05$ - Gráfico 9C) e IL-17 ($62,6 \pm 19,5$; $p < 0,01$ - Gráfico 9E) quando comparado ao grupo OVA ($61,4 \pm 9,2$ - Gráfico 9A; $64,2 \pm 7,4$ - Gráfico 9B; $34,0 \pm 5,1$ - Gráfico 9C; $153,1 \pm 5,3$ - Gráfico

9E, respectivamente). Os níveis de IFN- γ aumentaram nos animais do grupo War ($175,8 \pm 18,5$; $p < 0,05$) em comparação ao grupo OVA ($102,6 \pm 15,4$) (Gráfico 9F). O tratamento com a War não interferiu nos níveis de IL-33 (Gráfico 9D) e de IL-10 (Gráfico 9G).

Quanto ao tratamento com Mwar, os animais apresentaram redução nos níveis de IL-4 ($16,0 \pm 0,7$; $p < 0,001$ - Gráfico 9A), IL-13 ($24,8 \pm 1,0$; $p < 0,001$ - Gráfico 9B), IL-5 ($17,2 \pm 0,4$; $p < 0,01$ - Gráfico 9C), IL-17 ($46,8 \pm 20,2$; $p < 0,001$ - Gráfico 9E) e aumento nos níveis de IFN- γ ($174,8 \pm 12,6$; $p < 0,05$ - Gráfico 9F) quando comparados ao grupo OVA ($61,4 \pm 9,2$ - Gráfico 9A; $64,2 \pm 7,4$ - Gráfico 9B; $34,0 \pm 5,1$ - Gráfico 9C; $153,1 \pm 5,3$ - Gráfico 9E; $102,6 \pm 15,4$ - Gráfico 9F, respectivamente). A Mwar não interferiu nos níveis das citocinas IL-33 e IL-10 dos camundongos com CARAS.

Gráfico 9 - Efeito do tratamento com warifteina ou metilwarifteina nos níveis das citocinas IL-4 (A) IL-13 (B) IL-5 (C) IL-33 (D) IL-17 (E) IFN- γ (F) IL-10 (G) no BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).





As colunas e barras verticais representam a média e o erro padrão da média (e.p.m.) respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey (IL-4 (A) IL-13 (B) IL-5 (C) IL-33 (D) IL-17 (E) IFN- γ (F) IL-10 (G) vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); OVA (animais doentes por ovalbumina); BUD (budesonida 0,9 mg/kg); War (animais tratados com warifteina 2 mg/kg) ou Mwar (animais tratados com metilwarifteina 2 mg/kg). $###p < 0,001$ (OVA vs. basal); $***p < 0,001$ (OVA vs. BUD, War e Mwar); $**p < 0,01$ (OVA vs. War); $*p < 0,05$ (OVA vs. BUD, War e Mwar).

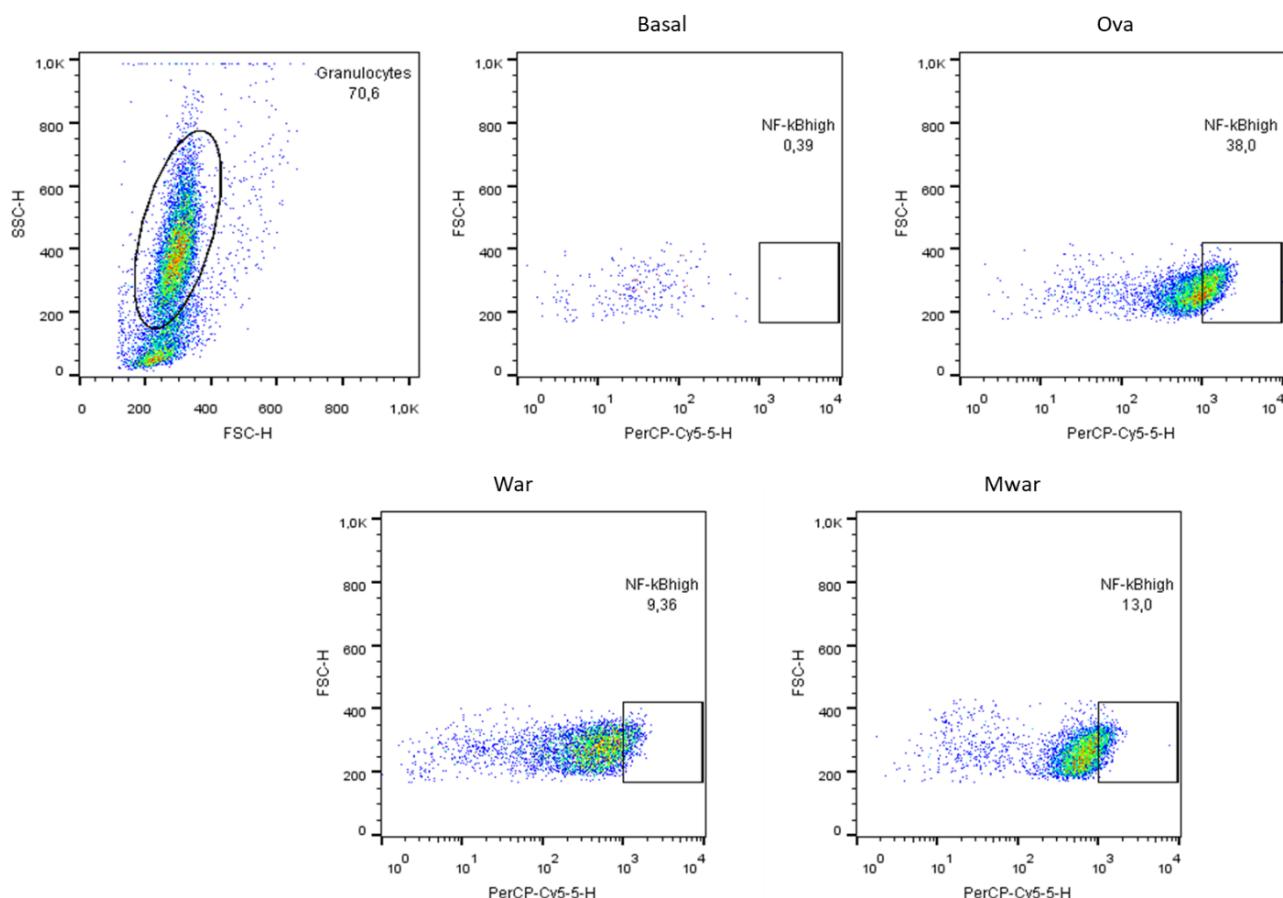
Fonte: Cavalcanti, 2020.

5.10 Efeito dos tratamentos com warifteina (War) ou metilwarifteina (Mwar) na expressão do fator de transcrição NF- κ B (p65) nas células do BALF de camundongos com CARAS

As células do BALF foram analisadas quanto à expressão intracelular do fator de transcrição NF- κ B (p65). Os resultados foram separados conforme a população celular: granulócitos (Gráfico 10 e 11) e linfócitos (Gráfico 12 e 13).

O grupo OVA ($70,31 \pm 12,28$; $p < 0,01$) apresentou aumento da frequência relativa de expressão do NF- κ B (p65) em cerca de 99,27% em granulócitos quando comparado ao grupo basal ($0,51 \pm 0,51$). O tratamento com a warifteina ($21,03 \pm 2,84$; $p < 0,05$) reduziu a frequência relativa de expressão do NF- κ B (p65) em granulócitos em cerca de 70,08%. Já o tratamento com a metilwarifteina ($27,24 \pm 4,97$; $p < 0,05$) reduziu a frequência de expressão do fator em cerca de 61,25% quando comparado ao grupo OVA ($70,31 \pm 12,28$) (Gráfico 11).

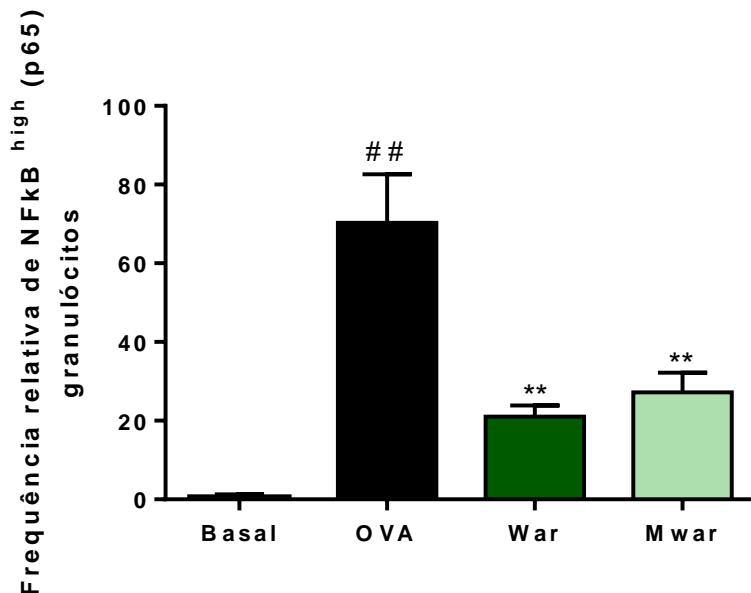
Gráfico 10 - Efeito dos tratamentos com os alcaloides warifteina ou metilwarifteina sobre a frequência de expressão do fator de transcrição NF- κ B (p65) em granulócitos do BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



O eixo vertical representa o tamanho (FSC-H) das células e o eixo horizontal a intensidade de fluorescência. As linhas superiores demonstram os grupos: Basal; OVA (ovalbumina); War (warifteina 2 mg/kg) e Mwar (metilwarifteina 2 mg/kg). Foi realizado um *gate* na população de granulócitos dessa população foi analisado a porcentagem de células NF- κ B^{high}. As médias das porcentagens de expressão de NF- κ B (p65) em cada grupo estão inseridas nos *dotplot*: Basal (0,39%); OVA (38%); War (9,36%) e Mwar (13%).

Fonte: Cavalcanti, 2020.

Gráfico 11 - Efeito dos tratamentos com os alcaloides warifteina ou metilwarifteina sobre a frequência de expressão relativa do fator de transcrição NF- κ B^{high} (p65) em granulócitos do BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).

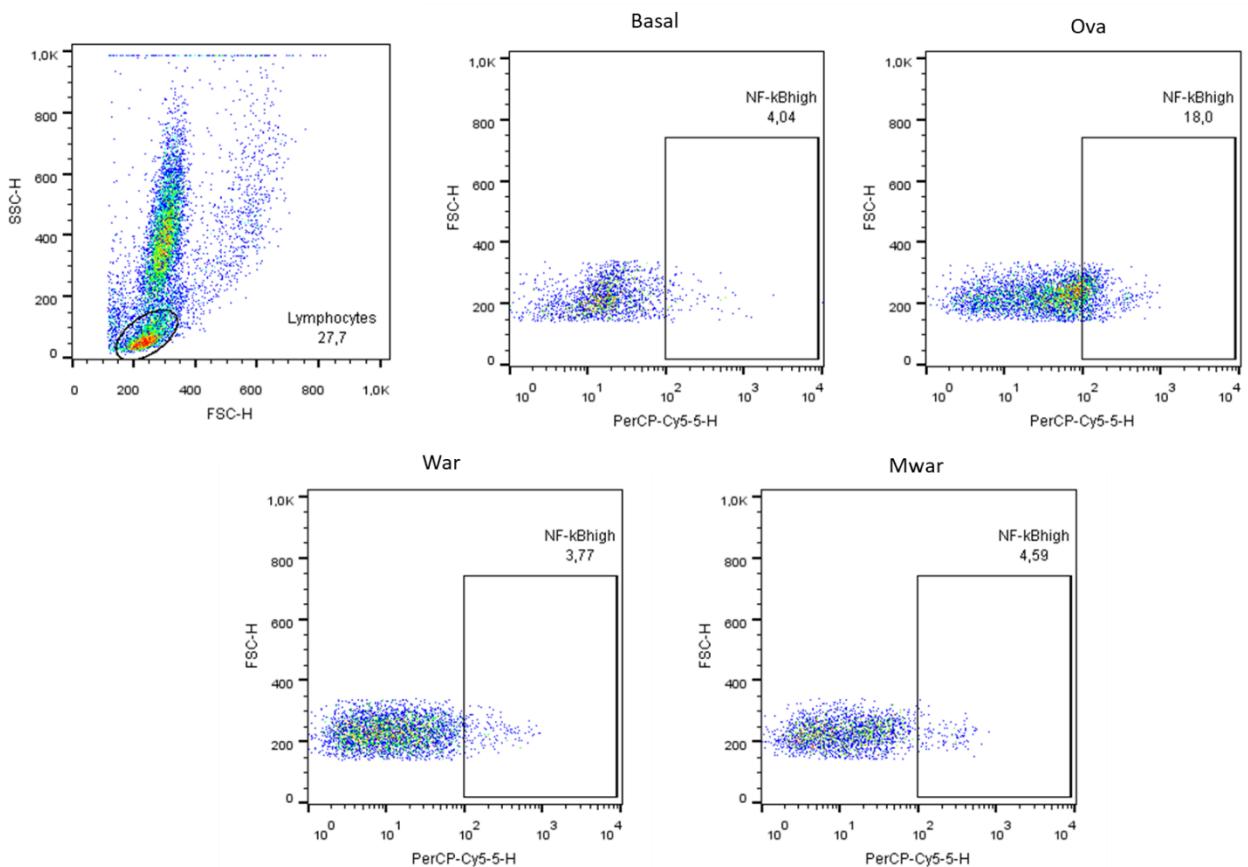


As colunas e barras verticais representam a média das porcentagens e o erro padrão da média (e.p.m.), respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizado pelo ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey. Frequência relativa de expressão do NF- κ B (p65) em granulócitos vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c (n= 5) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); OVA (animais doentes por ovalbumina); War (animais tratados com warifteina 2 mg/kg) ou Mwar (animais tratados com metilwarifteina 2 mg/kg). ##p < 0,01 (OVA vs. basal); **p < 0,01 (OVA vs. War e Mwar).

Fonte: Cavalcanti, 2020.

Em relação à população de linfócitos, o tratamento com a warifteina ($18,83 \pm 6,47$; $p < 0,05$) reduziu a frequência relativa de expressão do fator de transcrição NF- κ B (p65) em 72,52% quando comparado ao grupo OVA ($68,54 \pm 15,14$; $p < 0,05$). O outro alcaloide, a metilwarifteina ($16,49 \pm 2,54$; $p < 0,01$) reduziu a frequência relativa de expressão do fator em cerca de 75,94% nessas células do BALF de camundongos com CARAS quando comparado ao grupo OVA ($68,54 \pm 15,14$; $p < 0,05$) (Gráfico 13).

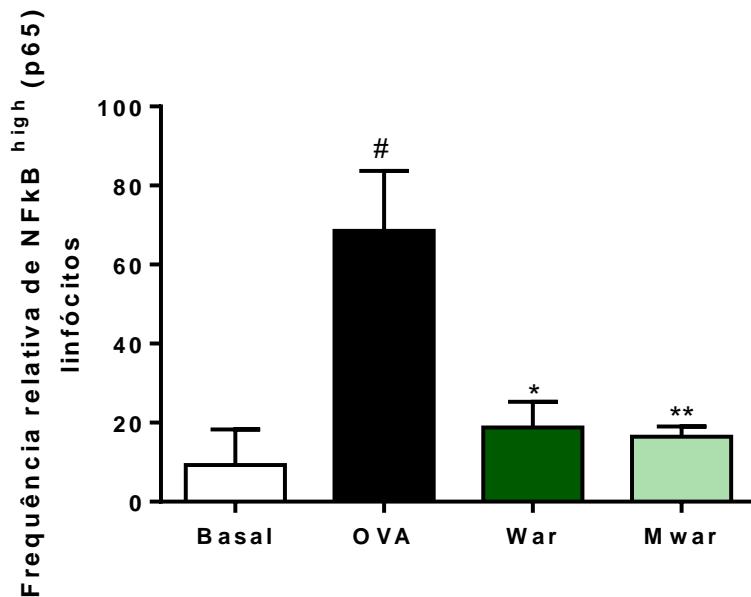
Gráfico 12 - Efeito dos tratamentos com os alcaloides warifteina ou metilwarifteina sobre a frequência de expressão do fator de transcrição NF- κ B^{high} (p65) em linfócitos do BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



O eixo vertical representa o tamanho das células e o eixo horizontal a intensidade de fluorescência. As linhas superiores demonstram os grupos: Basal; OVA (ovalbumina); War (warifteina 2 mg/kg) e Mwar (metilwarifteina 2 mg/kg). Foi realizado um *gate* na população de linfócitos dessa população foi analisado a porcentagem de células NF- κ B^{high}. As médias das porcentagens de expressão de NF- κ B (p65) em cada grupo estão inseridas nos *dotplot*: Basal (4%); OVA (19%); War (3,77%) e Mwar (4,59%).

Fonte: Cavalcanti, 2020.

Gráfico 13 - Efeito dos tratamentos com os alcaloïdes warifteina ou metilwarifteina sobre a frequência relativa de expressão do fator de transcrição NF- κ B^{high} (p65) em linfócitos do BALF de camundongos com Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



As colunas e barras verticais representam a média do percentual de expressão e o erro padrão da média (e.p.m.), respectivamente. A análise estatística dos dados obtidos foi realizado pelo ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*. Frequência relativa de expressão do NF- κ B^{high} (p65) em linfócitos vs. grupo experimental). Os camundongos BALB/c ($n= 5$) foram distribuídos em grupos: Basal (animais no estado fisiológico); OVA (animais doentes por ovalbumina); War (animais tratados com warifteina 2 mg/kg) ou Mwar (animais tratados com metilwarifteina 2 mg/kg). $^{\#}p < 0,05$ (OVA vs. basal); $^{*}p < 0,05$ (OVA vs. War); $^{**}p < 0,01$ (OVA vs. Mwar).

Fonte: Cavalcanti, 2020.



Discussão

6. DISCUSSÃO

No presente estudo os alcaloides da planta *Cissampelos sympodialis* Eichl., warifteina e metilwarifteina, demonstraram efeito imunomodulador no processo inflamatório no modelo experimental da CARAS. No processo inflamatório desencadeado nas vias aéreas superiores, semelhante a rinite descrita em humanos, os alcaloides reduziram os sinais clínicos tais como espirros e fricção nasal além da hiper-reatividade nasal desencadeada com histamina. Em adição, os alcaloides inibiram a migração de eosinófilos tanto para o tecido nasal como para o tecido pulmonar. Ainda, em relação a análise tecidual, as quantidades de muco e fibras colágenas foram reduzidas após os tratamentos com os alcaloides. A concentração sérica de IgE-Ovalbumina específica nos animais com CARAS e tratados com os alcaloides foi reduzida. Os tratamentos com os alcaloides apresentaram imunomodulação negativa para as respostas imunes TH2 e TH17 com diminuição na produção das citocinas IL-4, IL-13, IL5 e IL17, em contrapartida, houve uma modulação positiva para a resposta imune TH1 com aumento nos níveis de IFN- γ . Tais efeitos imunomoduladores podem estar relacionados com a inibição do fator de transcrição NF- κ B.

As doenças alérgicas respiratórias são consideradas como problema de saúde mundial resultante de uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais. Doenças alérgicas respiratórias são desordens inflamatórias crônicas caracterizadas por alterações das vias aéreas, tais como produção de muco, inflamação eosinofílica, hiper-responsividade brônquica, fibrose e remodelamento de tecidos (LEE et al., 2017; TRONDE et al., 2007). Pesquisadores alergologistas ressaltam a inter-relação entre doenças alérgicas como a asma, rinite, eczema e urticária e o potencial risco de cronicidade em casos de tratamentos inadequados. A Sociedade Portuguesa de Alergologia estima que em 2025, a asma será a doença crônica mais prevalente na infância e uma das maiores causas de gastos em saúde (SPAIC, 2017).

A inflamação nas vias aéreas superiores caracteriza a rinite e das inferiores, a asma alérgica. Ambas as doenças têm mostrado uma correlação na sua gênese e no seu desenvolvimento, apresentam o mesmo perfil celular inflamatório e compartilham das mesmas opções terapêuticas. Apoiado nessa ideia, a Síndrome da Asma e Rinite Alérgica Combinada (CARAS), surge como um conceito de uma “doença unificada

das vias aéreas”, trazendo uma proposta inovadora tanto do ponto de vista clínico-diagnóstico quanto terapêutico (FERREIRA et al., 2019).

Atualmente, não há uma terapia única disponível para minimizar os sintomas da CARAS entretanto, os corticoides é a principal escolha terapêutica para os pacientes que apresentam a síndrome. Embora os corticosteroides demonstrem eficácia farmacológica, os efeitos colaterais, se usados em altas doses ou por longos períodos de tempo, limita seu uso. Além disso, alguns pacientes têm resistência aos efeitos terapêuticos e em altas doses resultam em um aumento do risco de efeitos colaterais sistêmicos (WILLIAMS, 2018). Para pacientes com esses problemas, há uma necessidade urgente de desenvolver novas terapias anti-inflamatórias com atividade imunomoduladora para fornecer tratamentos alternativos e adequados da CARAS.

Há relatos na medicina popular da utilização de infusão das folhas e decocto das raízes da planta *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae), popularmente conhecida por milona ou orelha de onça, para o tratamento de desordens inflamatórias como a asma, bronquite e reumatismo. Nesse contexto, a espécie vem sendo objeto de estudos farmacológicos não clínicos e clínicos no Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, UFPB, João Pessoa, PB, Brasil, há mais de 20 anos. Tanto o extrato das raízes como o extrato hidroalcoolico das folhas (AFL) apresentaram ação espasmolítica, pelo aumento de AMPc em cultura de células musculares lisas de traqueia, além de inibir a síntese das enzimas fosfodiesterases (PDE) IV e V em pulmão de cobaias (THOMAS et al., 1997). O AFL inibiu tanto o broncoespasmo induzido por histamina em cobaias normais como a resposta anafilática em cobaias sensibilizadas com ovalbumina (THOMAS et al., 1997).

Além disso, estudos imunofarmacológicos com o AFL demonstraram seu efeito antialérgico por diminuir os níveis de IgE e aumentar a resposta T_{reg} (IL-10), além de modular positivamente a resposta T_{H1} pelo aumento da citocina IFN- γ (BEZERRA-SANTOS et al., 2004). Outros estudos corroboram a elucidação do efeito antiasmático e imunomodulador do extrato e alcaloides da *C. sympodialis* (PIUVEZAM et al., 1999; BEZERRA-SANTOS et al., 2006; COSTA et al., 2008). Recentemente, Vieira et al. (2018) verificaram o efeito antialérgico da warifteina em modelo experimental de rinite

alérgica crônica, tornando-se dessa forma, alvo de vários estudos e revelando ser uma espécie promissora para o desenvolvimento de um fitoterápico para CARAS.

Neste estudo, avaliamos o efeito dos alcaloides da *C. syringifolia*, warifteina e sua forma metilada a metilwarifteina, com tratamento, por via intranasal, de animais no modelo da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) desenvolvido em camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com ovalbumina.

Como verificado na literatura até o presente momento, apenas oito artigos utilizaram o modelo experimental de CARAS, configurando um cenário favorável para entender a fisiopatologia dessa síndrome, além de servir como estímulo para ensaios farmacológicos de novas drogas para o tratamento da síndrome. Somado a isso, no Brasil, o laboratório de Imunofarmacologia (LIMFA) da UFPB/João Pessoa/PB é pioneiro na implantação do modelo experimental para o estudo dessa síndrome (FERREIRA et al., 2019).

Estudos revelaram que 70-90% dos pacientes asmáticos sofrem de rinite alérgica e, quase 40% dos pacientes com rinite alérgica apresentam sintomas asmáticos, sugerindo uma estreita relação entre ambas as desordens (PAWANKAR et al., 2009). Portanto, a CARAS foi definida para indicar sintomas concomitantes de rinite e asma em pacientes (TARAMARCAZ; GIBSON, 2004). Apesar da CARAS ser cada vez mais reconhecida por pesquisadores clínicos e não clínicos, o tratamento dessa síndrome ainda não recebeu atenção considerável (WANG et al., 2016).

Na fisiopatologia da CARAS os sinais clínicos característicos durante a resposta da fase inicial como espirros, prurido, secreção e obstrução nasal são mediados por histamina, liberada principalmente por mastócitos ou outras células inflamatórias após a ligação da IgE, ligada ao receptor Fc ϵ RI da célula, ao alérgeno (DJUKANOVIC et al., 2016.). Para averiguar a hipótese de que a warifteina e ou a metilwarifteina poderiam estar atuando na fase inicial da CARAS, os sinais clínicos, espirros e fricções nasais, foram quantificados após desafio alergênico (OVA). O tratamento com a warifteina ou metilwarifteina reduziu o número de espirros e fricções nasais, comprovando assim, a atuação de ambos os alcaloides na fase inicial da síndrome. Outro estudo utilizando protocolo semelhante de CARAS demonstrou redução dos sinais clínicos da rinite após tratamento com oligonucleotídeos (LI et al., 2016). A substância sintética, o antagonista do receptor do Fator Indutor de Hipoxia- α (HIF), o

YC-1, também diminuiu os sinais clínicos da rinite de camundongos com CARAS (WANG et al., 2016).

Uma vez que a histamina está envolvida no processo da fase inicial da rinite, verificamos a hiper-reatividade nasal dos camundongos com CARAS após a administração de doses crescente da histamina para então avaliar o efeito dos alcaloides nesse parâmetro. Ambos os alcaloides foram capazes de diminuirem a hiper-reatividade nasal à histamina demonstrando que os alcaloides administrados localmente apresentam o efeito anti-histamínico. Esse resultado colabora com outros resultados obtidos com o alcaloide isolado da *C. Sympodialis*, a milonina, a qual foi capaz de inibir a liberação de histamina em mastócitos ativados (ALVES et al., 2017).

A manutenção do processo inflamatório observado na resposta imune tipo 2 (T_{H2}) da CARAS é oriunda da intensa ação de células inflamatórias que migram para as vias aéreas e uma vez ativadas, liberam mediadores responsáveis em configurar o ambiente alérgico. Neste trabalho, a análise do BALF (Fluido do Lavado Broncoalveolar) e do NALF (Fluido do Lavado Nasal) dos animais com CARAS demonstrou aumento na migração celular, mais especificamente eosinófilos para os tecidos nasal e pulmonar. Esse recrutamento celular pode ser explicado pela indução da resposta imune T_{H2} e ativação de células inflamatórias teciduais com produção aumentada das IL-4, IL-13 e IL-5 e consequentemente eosinopoiese, eosinofilia e migração dessa para os tecidos das vias aéreas (BISSET; SCHMID, 2005).

Em relação aos linfócitos, esses compreendem de 70 a 80% da contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico em camundongos, podendo apresentar contagens acima de 80% em animais jovens (HEDRICH, 2004; WEISS, 2010). As células linfoïdes auxiliam na resposta imune inata do organismo, mas a maioria delas é responsável por mediar a imunidade adaptativa (linfócitos T e B) (TURGEON, 2005). Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que o AFL e a forma metilada da warifteína (metilwarifteína) administrada em modelo de asma atenua a resposta alérgica das vias respiratórias pela redução de linfócitos pulmonares T CD3⁺ (VIEIRA et al., 2013).

Uma outra população celular de leucócitos, os neutrófilos são encontrados em menor percentual do que os linfócitos nos camundongos e representam a primeira linha de defesa contra a invasão de micro-organismos, trauma nos tecidos ou algum sinal inflamatório. Os neutrófilos apresentam como mecanismo de ação a fagocitose

e lise celular via mecanismos enzimáticos ou dependentes de oxigênio (SOUZA et al., 2006). Além disso, quando estimulados pela IL-8 podem induzir a migração de eosinófilos através da membrana basal mesmo na ausência de agentes quimiotáticos para eosinófilos, podendo levar ao acúmulo de eosinófilos nas vias aéreas de pacientes alérgicos (KIKUCHI et al., 2006). A metilwarifteina reduziu a migração de neutrófilos para o NALF. Esse efeito tem relação direta com a redução da migração de eosinófilos. Esse resultado também foi observado com o extrato hidroalcoólico das folhas (AFL) da *Cissampelos sympodialis*, o qual, ao ser inalado reduziu o número de neutrófilos recrutados para a cavidade pleural de camundongos asmáticos (VIEIRA et al., 2013).

A inflamação alérgica nas vias aéreas induz a degranulação dos eosinófilos e a liberação de proteases e agentes quimiotáticos mediada pelo receptor CD52 via sistema complemento (ZHANG et al., 2007). A warifteina e a metilwarifteina foram capazes de reduzir a migração de células inflamatórias no NALF e no BALF dependente do número de eosinófilos. Outros alcalóides que apresentam o núcleo isoquinolínico, como a curina e R8 (análogo da vasicina), demonstraram que a após serem administrados via oral também são eficazes na redução da migração de eosinófilos para o BALF (RIBEIRO-FILHO et al., 2013; RAYEES et al., 2015).

Em continuidade ao estudo postulou-se a hipótese de que os alcaloides atuariam modulando a resposta celular alérgica de forma sistêmica. A partir da redução do percentual de eosinófilos no sangue periférico pela metilwarifteina se comprovou a veracidade da hipótese para esse alcaloide. Estudo realizado anteriormente relatou que a eosinofilia é um sinal marcante de desordens alérgicas, correlacionando as proteínas dos grânulos de eosinófilos e mediadores de derivados lipídicos com a hiperresponsividade e danos ao tecido. Outro alcaloide isoquinolínico, a quelidonia, administrado via oral, apresentou efeito redutor no número de eosinófilos quantificados no sangue de camundongos com inflamação pulmonar alérgica (KIM et al., 2015). O efeito redutor da eosinofilia observado neste trabalho pode ser proveniente da metilação do alcaloide, uma vez que o outro alcaloide não metilado, a warifteina, nesse e nos demais estudos demonstrou efeitos redutores apenas na própria cavidade pulmonar, sugerindo um efeito local. O resultado encontrado soma-se ao estudo realizado com a fração aquosa das folhas da *C. Sympodialis* em modelo de inflamação alérgica, o qual demonstrou a relação na

diminuição dos sintomas alérgicos à redução da eosinofilia após tratamento via oral (BEZERRA-SANTOS et al., 2006).

Na CARAS é possível observar o aumento no número de células inflamatórias no tecido nasal e pulmonar entre elas os eosinófilos, linfócitos, macrófagos e mastócitos. A análise histológica dos tecidos das vias aéreas superior e inferior demonstrou a instalação da inflamação pela migração de células inflamatórias nas regiões perivascular subpetielial na cavidade nasal e perivascular e peribronquiloar no pulmão nos animais doentes (grupo OVA). O efeito inibitório na migração celular para cavidade nasal e pulmonar foi observado após tratamento com a warifteina ou com a metilwarifteina. Corroborando a esse resultado, Ferreira e col. (2018) demonstraram que o alcaloide sintético denominado MHTP reduziu o número de células inflamatórias na cavidade pulmonar de camundongos com asma alérgica. Outros alcaloides da *Alstonia scholaris*, escolaricina e 19-epi-escolaricina, apresentaram redução do recrutamento de células inflamatórias em modelo de inflamação alérgica das vias aéreas (ZHAO et al., 2017).

No epitélio das vias aéreas, o papel das células caliciformes em doenças alérgicas vem sendo cada vez mais estudado devido à produção exacerbada de muco que promove a obstrução das vias aéreas de pacientes alérgicos. O epitélio das vias aéreas desses pacientes se apresenta com um número aumentado de células da mucosa (hiperplasia), com depósito excessivo de muco nas vias aéreas caracterizando hipertrofia em decorrência da metaplasia epitelial. Ainda no epitélio desses pacientes, está presente uma membrana basal mais espessa que contém vários fatores de matriz extracelular como o nidogênio, condronectina, osteonectina e a tenascina, em comparação com epitélios de indivíduos normais (WADSWORTH et al., 2011).

O aumento do número de células caliciformes (hiperplasia) bem como o aumento da quantidade de muco (hipertrofia) foi observado nos animais doentes (com CARAS). Ambos alcaloides, warifteina e metilwarifteina, foram eficazes em reduzir o índice de muco no epitélio da cavidade nasal e pulmonar. Outra pesquisa demonstrou, pela análise histológica pulmonar de camundongos asmáticos, redução na produção de muco quando os animais foram tratados com o alcaloide quelidonina, principal alcaloide da *Chelidonium majus* (KIM et al., 2015).

A hipersecreção de muco no contexto das síndromes alérgicas é um processo complexo não totalmente esclarecido. A metaplasia das células produtoras de muco, envolve a indução de genes de mucina como o MUC5AC, armazenamento de mucina nos grânulos pré-formados, liberação de mucina dos grânulos para o interior do lúmen das vias aéreas e, alterações na viscosidade do muco. Em adição, a produção da IL-13 por células do epitélio das vias aéreas bem como por células T_H2 exerce importância fundamental na hiper-responsividade (GOUR et al., 2015). Portanto, dessa forma, as células de clara sofrem uma transição fenotípica para células caliciformes por ação de vários fatores de transcrição incluindo Spdef (ETS) e Foxa2. A IL-13 induz a expressão do Spdef (ETS), mediado por STAT6 (PARK et al., 2007). O fator Spdef, por sua vez, inibe a transcrição de Foxa2, que é necessário para a manutenção da diferenciação do epitélio das vias aéreas (CHEN et al., 2009). A inibição de Foxa2 acarreta a metaplasia de células caliciformes e a produção de mucinas e outros fatores necessários para função (ALEVY et al., 2012).

Os resultados do presente estudo demonstram que os alcaloides reduziram os níveis da IL-13 no BALF dos animais com CARAS sugerindo que esteja ocorrendo diminuição do muco em consequência da diminuição dos efeitos da IL-13. Somado a diminuição da produção de IL-13, também houve diminuição na produção de IL-4 e redução do nível sérico específico de IgE ovalbumina específica, indicando claramente a modulação negativa da resposta imune do tipo 2 (T_H2) pelos alcaloides warifteina e metilwarifteina. Em outro estudo que analisou o alcaloide MHTP em modelo de asma alérgica também foi observado diminuição da produção de muco pelas células caliciformes, em virtude da diminuição da IL-13, uma citocina que promove a hiperprodução de muco, hiperplasia, hipertrofia e metaplasia dessas células (FERREIRA et al., 2018).

Outra célula efetora na resposta alérgica são os mastócitos. A resposta imune em doenças alérgicas é caracterizada pelo perfil T_H2 mediado pela IgE alérgeno específica que se liga, via os receptores Fc ϵ RI, nos mastócitos teciduais ou aos basófilos circulantes. A ligação cruzada entre no mínimo duas IgE ligadas na membrana do mastócitos e o alergeno induz a ativação da célula levando a movimentação dos grânulos intracelulares para membrana celular e consequentemente a liberação dos mediadores inflamatórios como histamina e produção de leucotrienos, característicos das doenças alérgicas como asma, rinite,

urticária e dermatite de contato (BROIDE et al., 2011). A histamina é responsável por inúmeras respostas celulares, incluindo neurotransmissão, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular além de estar envolvida no início das reações alérgicas e inflamatórias. Os efeitos da histamina são mediados por receptores do tipo H1, H2, H3 e H4 que são acoplados à proteína G. Os receptores H1 e H2 são responsáveis pela maioria das ações inflamatórias induzidas pela histamina (JONES; KEARNS, 2011).

A análise histológica dos tecidos das vias aéreas pelo corente Azul de Toluidina (AT) possibilitou a observação de mastócitos ativados nos tecidos dos animais do grupo OVA, entretanto, não houve alteração do número dessas células nos tecidos dos animais tratados com a warifteina e a metilwarifteina corroborando aos resultados de Vieira e col (2018) que analisaram o efeito do alcaloide warifteina em modelo de rinite alérgica crônica.

O aumento nas concentrações de mediadores inflamatórios como consequência do quadro persistente está associado às alterações estruturais das vias aéreas, denominadas remodelamento das vias aéreas (MANSO et al., 2012) que inclui a perda da integridade epitelial, a fibrose subepitelial e a deposição de colágeno, hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas, aumento da produção de muco e glândulas submucosas e espessamento da parede das vias aéreas (LEE et al., 2017).

Com a coloração Tricrômica de Gomori (TG), foi possível evidenciar as fibras colágenas nos tecidos das vias aéreas de camundongos do grupo OVA (animais doentes). Os alcaloides reduziram a quantidade de fibras colágenas na cavidade nasal e pulmonar dos camundongos com CARAS. Vieira e col. (2013) demonstram que, em modelo de asma, o AFL (extrato hidroalcoólico de *C. sympodialis*), reduziu a quantidade de fibras colágenas na cavidade pulmonar. Em outro estudo, utilizando a mesma coloração, tanto o extrato da *C. sympodialis* quanto o alcaloide warifteina foram capazes de reduzir a deposição de colágeno no tecido de camundongos asmáticos, sugerindo ainda, uma relação proporcional entre infiltração eosinofílica e deposição de colágeno (BEZERRA-SANTOS et al., 2012). O TGF-β liberado por células incluindo os eosinófilos ativa fibroblastos que liberam proteínas da matriz, causando espessamento da membrana basal reticular, associada à inflamação eosinofílica na asma (GEORGE; BRIGHTLING, 2016). Portanto, a diminuição de

eosinófilos no tecido pulmonar inflamado melhora a complacência das vias aéreas. No presente estudo os alcaloides, warifteina e metilwarifteina, podem atenuar o remodelamento das vias aéreas em virtude da diminuição no número de eosinófilos e seus mediadores.

O mecanismo do remodelamento das vias aéreas envolve interações entre várias células, como eosinófilos, linfócitos T, mastócitos, células musculares lisas, células epiteliais e fibroblastos (GIRODET et al., 2011). As fibras colágenas, ressaltadas pela coloração TG, estão envolvidas em situações de remodelamento tecidual em modelos de desordens respiratórias (PONIKAU et al., 2003). Neste caso, quantidades elevadas de colágeno, fibronectina e tenascina-C são depositados na lâmina reticular sob o epitélio das vias aéreas (TAKAYAMA et al., 2006). Mudança nos parâmetros fibrosos via IL-13 e estimulação epitelial são importantes em situações de cronicidade. Estudo sugere que a IL-13 induz a hiper-responsividade das vias aéreas independente da quantidade de fibras (KUPERMAN et al., 2002).

Com intuito de direcionarmos o estudo para elucidar o mecanismo de ação dos alcaloides em questão no modelo de CARAS foi analisado quatro diferentes perfis das respostas imunes entre eles T_{H2} , T_{H1} , T_{H17} e T_{reg} , além do envolvimento de células epiteliais secretoras de IL-33 que ativa células linfoides inatas do tipo 2 (ILCs2).

Estudos recentes sugerem que durante a síndrome há o aumento da resposta T_{H2} e um desequilíbrio da resposta imune regulatória T_{reg} com diminuição da citocina IL-10 bem como a T_{H17} , caracterizada por altos níveis de IL-17. O desequilíbrio da resposta T_{H1}/T_{H2} e T_{H17}/T_{reg} foi caracterizado em pacientes com asma alérgica. Além disso, um tratamento efetivo para respostas alérgicas pode ser baseado em aumentar a resposta imune T_{H1} e simultaneamente inibir a resposta T_{H2}/T_{H17} para reestabelecer o balanço T_{H1}/T_{H2} (ANATRIELLO et al., 2019). Nossa pesquisa demonstrou que os alcaloides warifteina e metilwarifteina diminuíram a resposta T_{H2} (IL-4, IL-5, IL-13) e T_{H17} (IL-17) e aumentou a resposta T_{H1} (INF- γ) no BALF. Sem interferir nos níveis da citocina do perfil T_{reg} (IL-10).

O processo imunoregulatório na asma e/ou rinite ocorre com a produção de citocinas, como IFN- γ e / ou IL-10, provenientes majoritariamente de células T_{H1} e células T_{reg} , respectivamente. Estudo anterior demonstrou eficácia do extrato da *C. sympodialis* administrado via oral em modelo de asma com aumento nos níveis das citocinas T_{H1} e T_{reg} (BEZERRA-SANTOS et al., 2004). Outra pesquisa corrobora aos

resultados encontrados nesse trabalho que demonstraram o efeito imunomodulador do alcaloide sintético MHTP via aumento da citocina IFN- γ (FERREIRA et al., 2018).

A IL-4 e IL-13 compartilham o mesmo receptor celular e atuam na amplificação da resposta inflamatória na CARAS. Ambas ativam macrófagos do tipo 2 (M2) que passam a produzir TGF- β , ativando fibroblastos e aumentando a quantidade de fibras colágenas, cujo depósito nas vias aéreas configura o remodelamento (VARRICHI et al., 2016). A inibição dos níveis de IL-4 e IL-13 pelos alcaloides warifteina e metilwarifteina age sinergicamente para reduzir a quantidade de fibras colágenas devido provavelmente à diminuição na ativação de macrófagos do tipo M2. Outro estudo corrobora aos resultados encontrados nesse estudo onde foi avaliado o efeito do alcaloide quelidonina em modelo de inflamação alérgica pulmonar. A quelidonina reduz a inflamação pulmonar em virtude da diminuição da expressão de IL-4 (KIM et al., 2015).

A IL-5 produzida pelos linfócitos é uma importante citocina envolvida no desenvolvimento da eosinofilia *in vivo* (WILSON et al., 2011). Eosinófilos ativos sintetizam quimiocinas pró-inflamatórias e enzimas catalíticas como a Proteína Catiônica Eosinofílica (PCE) e Proteína Básica Principal (MBP) que ocasionam a ruptura da integridade epitelial acentuando a hiper-reatividade das vias aéreas (BARNES, 2016). Os glicocorticoides inibem as citocinas IL-5 e o Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF), diminuindo a meia-vida dessas células. Assim, a administração de glicocorticoides reduz a eosinofilia observada nos fluidos nasais de animais doentes e em humanos com rinite alérgica. A redução da IL-5 foi observada após o tratamento dos animais doentes com a warifteina e metilwarifteina corroborando com a diminuição do número de eosinófilos observado nos fluidos nasal e pulmonar, sangue periférico e tecidos. Em outro estudo, cujo modelo de CARAS é semelhante ao apresentado, os níveis de IL-5 reduziram após administração intranasal de oligonucleotídeos (LI et al., 2015).

Estudos recentes demonstraram que a IL-17, o principal produto das células T_H17, desempenha um papel importante na regulação da expressão de mediadores inflamatórios, bem como no recrutamento de células. O aumento na expressão de IL-17A observada na asma, comprova o envolvimento desta interleucina na fisiopatologia da doença (MANISE et al., 2013). A citocina IL-17 promove a eosinofilia e neutrofilia das vias aéreas pela indução de quimiocinas e fatores de crescimento (AYAKANNU

et al., 2019). A citocina IL-17 também contribui para o remodelamento das vias aéreas na asma, sugerindo que esta citocina, se inibida, poderia ajudar no controle da fibrose. Além disso, especialmente a IL-17A, mas não a IL-17F ou a IL-22, pode contribuir para a asma aumentando diretamente as respostas contráteis das células musculares lisas das vias aéreas por meio de uma via que envolve o fator de transcrição NF- κ B, ativação e indução da expressão de RhoA e ROCK2 (MIYAKE et al., 2016). A redução nos níveis de IL-17 após o tratamento com a warifteina ou metilwarifteina colabora com os resultados apresentados anteriormente com inibição da migração de eosinófilos bem como diminuição no remodelamento das vias aéreas e ainda corrobora aos estudos de Kim e col. (2015) que demonstraram o efeito do alcaloide isoquinolínico, a quelidonina, em modulador negativamente o perfil T_H17.

A IL-33 é uma citocina pró-inflamatória produzida pelas células endoteliais e epiteliais ativadas após a exposição e penetração do alérgeno no epitélio respiratório. Esse contato resulta na ativação de células epiteliais que secretam citocinas, alarminas, Linfopoetina do Estroma Tímico (TSLP), IL-33 e IL-25. Esses mediadores são respostáveis por diferenciar células linfoides inatas no tipo 2. A warifteina e a metilwarifteina não alteraram os níveis dessa citocina, sugerindo não atuar nas etapas iniciais que envolvem as células epiteliais (LIEW et al., 2010) mas sim modular a resposta alérgica em virtude da ativação e diferenciação de perfis celulares mediados por linfócitos.

A polarização para diferentes perfis de resposta imune é caracterizado por diferentes fatores de transcrição. A expressão T-bet está associada à diferenciação em células T_H1 produtoras das citocinas IFN- γ , IL-2 e TNF; O GATA-3 e o STAT-6 estão associados à diferenciação em células T_H2 produtoras das citocinas IL-5, IL13; O ROR γ t está associado à diferenciação em células T_H17 produtoras das citocinas IL-17A, IL-22; e foxp3 está associado à diferenciação em células T_{reg} produtoras das citocinas IL-10 e TGF- β (ROBINSON et al., 2010). Os linfócitos produzem citocinas a partir das vias de ativação envolvendo principalmente os fatores transcripcionais, Fator Nuclear kappa B (NF- κ B) e Apoproteína-1 (AP-1).

O Fator Nuclear-kappaB (NF- κ B) está envolvido em um amplo espectro de redes inflamatórias que regulam a produção de citocinas. A sinalização intracelular via NF- κ B na CARAS é evidenciada pela via canônica desse fator de transcrição, principalmente pela associação heterodimérica da subunidade p50 com a subunidade

p65 (RelA). Há o aumento da expressão de NF-κB (p50/p65), fosforilação ou degradação de IκB e expressão de IKK-β nas células presentes nas vias aéreas de asmáticos. O aumento da expressão nuclear do NF-κB também é detectado nas células inflamatórias do escarro induzido de asmáticos (MIYAKE et al., 2016). Em camundongos recombinantes deficientes em intermediários da sinalização de NF-κB, incluindo NF-κB e IκBα, a inflamação das vias aéreas induzida por alérgenos é atenuada. Além disso, a ativação do NF-κB nas vias aéreas de camundongos desafiados por alérgenos é atenuada pela deleção dos genes que codificam os receptores do tipo toll - TLR2 ou TLR4 presentes nas células da imunidade inata envolvidas na perpetuação do processo inflamatório das vias aéreas, demonstrando a participação desses receptores na sinalização via NF-κB na asma (LI et al., 2014). Li e col. (2016) demonstraram que o NF-κB também está envolvido na indução de GATA3, além de ser capaz de se ligar em dois principais sítios no locus de transcrição da IL-4, participando assim, na indução da produção de dessa citocina.

A expressão de NF-κB também pode ser observada em células como linfócitos e granulócitos. Os linfócitos têm um importante papel imunorregulador na CARAS. As células T virgens se diferenciam em células T_H2 que produzem IL-4, IL-5 e IL-13, de maneira dependente do NF-κB, que estimulam a produção de IgE nos linfócitos B alérgeno específico (SCHULIGA, 2015). Em adição as células T_H17 produtoras de IL-17 e IL-22 também envolvem a sinalização via NF-κB (DRAGON et al., 2014) e, esse perfil de resposta imune, está claramente aumentada nas vias aéreas de indivíduos que desenvolvem a asma grave refratária a esteroides. (PELAIA et al., 2015).

Quanto aos granulócitos, o contato de eosinófilos com as células epiteliais das vias aéreas estimula a produção de moléculas de adesão celular dependente de NF-κB (NAKAYAMA et al., 2017) que consequentemente facilita a entrada e permanência do eosinófilo nas vias aéreas. Em adição, a sinalização via de NF-κB nos eosinófilos mantém a sobrevida dessas células no tecido mediada pelo efeito antiapoptótico do TNF-α autócrino (SCHULIGA, 2015).

A warifteina e a metilwarifteina reduziram a expressão de NF-κB (p65) nas células do BALF especificamente em granulócitos e linfócitos. Esses resultados claramente demonstram o efeito modulador negativo de ambos os alcaloides em células mediadoras do processo alérgico como os eosinófilos e linfócitos. Além disso, a redução da expressão de NF-κB nas populações celulares estudadas corrobora aos

resultados moleculares de diminuição dos níveis das citocinas do perfil TH2, uma vez que o NF-κB é responsável pela ativação e transcrição de diversas citocinas e, consequentemente, modulará negativamente o perfil TH2 via diminuição dos níveis de IL-4 e IL-13, efeito também observado no presente estudo. Outros alcaloides, como a beberina (*Coptis chinensis*) e a aloperina, demonstraram atividade inibitória na via de sinalização de NF-κB em um modelo de inflamação alérgica das vias aéreas induzido por ovalbumina em ratos (LI et al., 2016; WANG et al., 2018).

O respaldo científico de componentes de uma planta que é utilizada na medicina popular para o tratamento das afecções do trato respiratório, apresentado nesse trabalho, tem grande importância para sociedade e é um retorno do investimento dado a ele, pois as desordens respiratórias estão ressaltadas no ranking das principais causas da procura pela atenção primária e, principalmente, o acometimento diário da qualidade de vida de quem as possui, além de episódios refratários em virtude do tratamento inadequado.

Portanto, esse trabalho avaliou o efeito da warifteina e da metilwarifteina, alcaloides da *Cissampelos sympodialis* Eichl (Menispermaceae), em modelo experimental da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) e os resultados obtidos fornecem subsídios comprobatórios do efeito antialérgico e imunomodulador de ambos os alcaloides, via modulação negativa dos sinais clínicos, da migração celular nos fluidos e tecidos, das citocinas do perfil TH2, TH17, da IgE-alérgeno específica e do fator de transcrição NF-κB, além da modulação positiva do perfil TH1. Esses dados incentivam a continuidade do estudo com essas moléculas na perspectiva de ser um protótipo farmacológico ou um fitofármaco para o controle do processo inflamatório das vias aéreas em doenças como asma e rinite alérgicas.



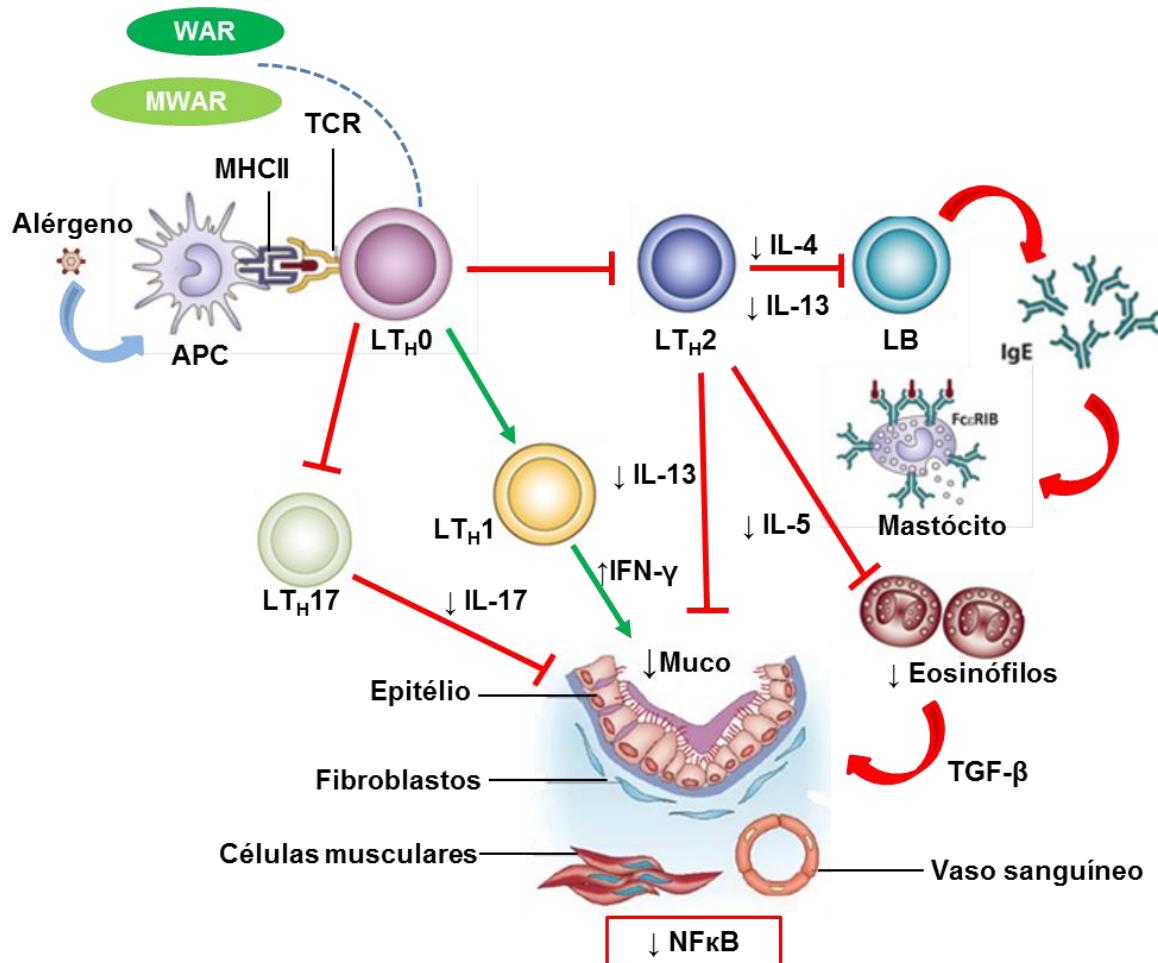
Conclusões

7. CONCLUSÕES

Os alcaloides warifteina e metilwarifteina da *Cissampelos sympodialis* Eichl. em modelo experimental da Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS) apresentaram efeito inibitório:

- Nos sinais clínicos da rinite;
- Na hiper-reatividade nasal induzida por histamina;
- Na migração de células inflamatórias para as cavidades nasal e pulmonar reduzindo a eosionofilia tecidual;
- Na eosinofilia sistêmica;
- Na produção de IgE OVA-específica;
- No perfil histológico nasal e pulmonar tais como:
 - Reduziu os parâmetros inflamatórios;
 - Reduziu produção de muco;
 - Reduziu a produção de fibras colágenas,
 - Entretanto, não alterou o número de mastócitos;
- Nos níveis de citocinas os alcaloides apresentaram efeitos inibitórios:
 - Nas citocinas do perfil T_H2 (IL-4; IL-13; IL-5);
 - Nas citocinas do perfil T_H17 (IL-17);
 - Entretanto, não alteraram os níveis da citocina IL-33 e da citocina do perfil T_{reg} (IL-10);
 - Nos níveis da citocina do perfil T_H1 os alcaloides apresentaram efeito modulador positivo com aumento de IFN- γ
- Os alcaloides reduziram a expressão do NF- κ B (p65) em granulócitos e linfócitos.

Figura 13 - Mapa conceitual do mecanismo de ação imunomoduladora da warifteina e metilwarifteina em modelo de Síndrome da Asma e Rinite Alérgicas Combinadas (CARAS).



O tratamento com os alcaloides warifteina e metilwarifteina diminuiu a expressão do fator de transcrição NF-κB e consequentemente a transcrição de citocinas do perfil T_H2 (IL-4, IL-13 e IL-5), contribuindo, assim, para diminuição dos níveis de IgE. Em contraste, aumentou a secreção da citocina IFN-γ do perfil T_H1. Os alcaloides também atuaram em células do BALF, reduzindo a quantidade de, principalmente, eosinófilos. No tecido nasal e pulmonar diminuíram o processo inflamatório, a quantidade de muco e a deposição de fibras colágenas. WAR- warifteina; MWAR- metilwarifteina; MHCII- Complexo Principal de Histocompatibilidade II; TCR- Receptor de Célula T; APC- Célula Apresentadora de Antígeno; LT_H0- Linfócito T virgem; LT_H1/2/17 – Linfócito T *helper* 1/2/17; IFN-γ- Interferon gama; TGF-β- Fator de crescimento e renovação beta.



Referências

REFERÊNCIAS

- ADCOCK, I. M.; CARAMORI, G.; CHUNG, K. F. New targets for drug development in asthma. **The Lancet**, v. 372, p. 1073-1087, 2008.
- ALEVY, Y. G.; PATEL, A. C.; ROMERO, A. G.; PATEL, D. A. IL-13-induced airway mucus production is attenuated by MAPK13 inhibition. **Journal Clinical Investigation**, v.122, p. 4555-4568, 2012.
- ALVES, A. F.; VIEIRA, G. C.; GADELHA, F. A. A.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; MARTINS, M. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R. Milonine, an Alkaloid of *Cissampelos sympodialis* Eichl.(Menispermaceae) Inhibits Histamine Release of Activated Mast Cells. **Inflammation**, v.40, p. 2118-2128, 2017.
- ANATRIELLO, E.; CUNHA, M.; NOGUEIRA, J.; CARVALHO, J. L.; SÁ, A. K.; MIRANDA, M.; AIMBIRE, F. Oral feeding of *Lactobacillus bulgaricus* N45. 10 inhibits the lung inflammation and airway remodeling in murine allergic asthma: Relevance to the Th1/Th2 cytokines and STAT6/T-bet. **Cellular immunology**, v. 341, p. 103928, 2019.
- ANGERHOFER, C. K.; GUINAUDEAU, H.; WONGPANICH, V.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Antiplasmodial and cytotoxic activity of natural bisbenzylisoquinoline alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 59-66, 1999.
- AYAKANNU, R.; ABDULLAH, N. A.; RADHAKRISHNAN, A. K.; RAJ, V. L.; LIAM, C. K. Relationship between various cytokines implicated in asthma. **Human immunology**, 2019.
- BARBOSA FILHO, J. M.; AGRA, M. D. F.; THOMAS, G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). **Ciência e cultura**, v.49, p. 386-94, 1997.
- BARBOSA-FILHO, J.; DA-CUNHA, E. V. L.; GRAY, A. I. Alkaloids of the Menispermaceae. **The alkaloids: chemistry and biology**, v. 54, p. 1-190, 2000.
- BARNES, P. J. Kinases as novel therapeutic targets in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Pharmacological Reviews**, v. 68, p. 788-815, 2016.
- BEZERRA-SANTOS, C. R.; BAlestieri, F. M. P.; ROSSI-BERGMANN, B.; PEÇANHA, L. M. T.; PIUVEZAM, M. R. *Cissampelos sympodialis* Eichl.(Menispermaceae): oral treatment decreases IgE levels and induces a Th1-skewed cytokine production in OVAAlbumin-sensitized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 95, p. 191-197, 2004.
- BEZERRA-SANTOS, C. R.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BANDEIRA-MELO, C.; PIUVEZAM, M. R.; BOZZA, P. T. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1152-1160, 2006.

BEZERRA-SANTOS, C. R.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; VIEIRA, G. C.; JAIME FILHO, R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PIRES, A. L.; PIUVEZAM, M. R. 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, p. 148-155, 2012.

BISSET, L. R.; SCHMID-GRENDELMEIER, P. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 11, p. 35-42, 2005.

BOULET, L. P. Airway remodeling in asthma: update on mechanisms and therapeutic approaches. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 24, p. 56-62, 2018.

BOUSQUET, J.; SCHÜNEMANN, H. J.; HELLINGS, P. W.; ARNAVIELHE, S.; BACHERT, C.; BEDBROOK, A.; CANONICA, G. W. MACVIA clinical decision algorithm in adolescents and adults with allergic rhinitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, p. 367-374, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Medicamentos fitoterápicos. Nota técnica do comitê nacional de plantas medicinais e fitoterápicos a respeito do que foi veiculado sobre plantas medicinais e fitoterápicos na imprensa televisiva e escrita no último mês. **Cadernos de Atenção Básica**, 25, p.160, 2011 Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>> Acesso em: 10 de janeiro de 2019.

BROIDE, D. H.; FINKELMAN, F.; BOCHNER, B. S.; ROTHENBERG, M. E. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2010. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 127, p. 689-695, 2011.

BROŽEK, J. L.; BOUSQUET, J.; AGACHE, I.; AGARWAL, A.; BACHERT, C.; BOSNIC-ANTICEVICH, S.; DE SOUSA, J. C. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines—2016 revision. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, p. 950-958, 2017.

BUSSE, W. W. Biological treatments for severe asthma: A major advance in asthma care. **Allergology International**, v. 68, p. 158-166, 2019.

CARLSON, B. M. The Respiratory System. **The Human Body**, p. 303–319, 2019.

CARVALHO, A. C. B. Plantas medicinais e fitoterápicos: regulamentação sanitária e proposta de modelo de monografia para espécies vegetais oficializadas no Brasil. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2011.

CERQUEIRA-LIMA, A.T.; ALCANTARA-NEVES, N. M.; CARVALHO, L.C.P.; COSTA, R.; MARIA BARBOSA-FILHO, J.; PIUVEZAM, M.; FIGUEIREDO, C. A. (Effects of *Cissampelos sympodialis* Eichl. and its alkaloid, warifteine, in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. **Current Drug Targets**, v. 11, p. 1458-1467, 2010.

CHEN, G.; KORFHAGEN, T. R.; XU, Y.; KITZMILLER, J.; WERT, S. E.; GREGORIEFF, A.; CLEVERS, H. SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. **Journal Clinical Investigation**, v.119, p. 2914–2924, 2009.

CHENG, D.; XUE, Z.; YI, L.; SHI, H.; ZHANG, K.; HUO, X.; ZHEN, G. Epithelial interleukin-25 is a key mediator in Th2-high, corticosteroid-responsive asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 190, p. 639-648, 2014.

CODEVILLA, C. F.; CASTILHOS, T. D. S.; BERGOLD, A. M. A review of analytical methods for the determination of four new phosphodiesterase type 5 inhibitors in biological samples and pharmaceutical preparations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 1-11, 2013.

CORRÊA, M. P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa nacional, **Ministério da agricultura**, v. 6, p. 402, Brasil, 1984.

CORTES, S.; DE ALENCAR, J. L.; THOMAS, G.; FILHO, J. B. Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl.(Menispermaceae). **Phytotherapy Research**, v. 9, p. 579-583,1995.

FREITAS, M. R.; CÔRTES, S. D. F.; THOMAS, G.; FILHO, J. B. Modification of Ca^{2+} metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl.(Menispermaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, p. 332-336, 1996.

COSTA, H. F.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; BARBOSA FILHO, J. M.; MARTINS, M. A.; PIUVEZAM, M. R. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 916–925, 2008.

DJUKANOVIC, R.; HANANIA, N.; BUSSE, W.; PRICE, D. IgE-mediated asthma: new revelations and future insights. **Respiratory Medicine**, v. 112, p. 128-129, 2016.

DÓRIA, R. G.; PASSARELLI, D.; CHEQUER, T. N.; REGINATO, G. M.; HAYASAKA, Y. B.; FANTINATO NETO, P.; FREITAS, S. H. Investigação clínica e comparação do esfregaço sanguíneo e PCR para diagnóstico de hemoparasitas em equinos de esporte e tração (carroceiros). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 724-730, 2016.

DRAGON, S.; HIRST, S. J.; LEE, T. H.; GOUNNI, A. S. IL-17A mediates a selective gene expression profile in asthmatic human airway smooth muscle cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 50, p. 1053-1063, 2014.

EIFAN, A. O.; DURHAM, S. R. Pathogenesis of rhinitis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 46, p. 1139–1151, 2016.

ELTBOLI, O.; MISTRY, V.; BARKER, B.; BRIGHTLING, C. E. Relationship between blood and bronchial submucosal eosinophilia and reticular basement membrane thickening in chronic obstructive pulmonary disease. **Respirology**, v. 20, p. 667-670, 2015.

EVANS, C. M.; RACLAWSKA, D. S.; TTOFALI, F.; LIPTZIN, D. R.; FLETCHER, A. The polymeric mucin MUC5AC is required for allergic airway hyperreactivity. **Nature Communication**, v. 6, p. 6281-6287, 2015.

FERREIRA, L. K. P.; FERREIRA, L. A. P.; ALVES, A. F.; LEITE, F. C.; DE ARAÚJO SILVA, L. A.; VIEIRA, G. C.; PIUVEZAM, M. R. MHTP, 2-Methoxy-4-(7-methoxy-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol, a Synthetic Alkaloid, Induces IFN- γ Production in Murine Model of Ovalbumin-Induced Pulmonary Allergic Inflammation. **Inflammation**, v.41, p. 2116-2128, 2018.

FERREIRA, L. K. P.; FERREIRA, L. A. P.; MONTEIRO, T. M.; BEZERRA, G. C.; BERNARDO, L. R.; PIUVEZAM, M. R. Combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS). **International Immunopharmacology**, v. 74, p. 105718, 2019.

FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Effect of some bisbenzylisoquinoline alkaloids on American Leishmania sp. in BALB/c mice. **Phytotherapy Research**, v. 7, p. 281-284, 1993.

GEORGE, L.; BRIGHTLING, C. E. Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Therapeutic advances in chronic disease**, v. 7, p. 34-51, 2016.

GINA. Global Strategy For Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma, <http://ginasthma.org/2017-gina-report-global-strat>, 2017.

GINA. Global Strategy For Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma, update 2018 <http://ginasthma.org/>

GIRODET, P. O.; OZIER, A.; BARA, I.; TUNON DE LARA, J. M.; MARTHAN, R.; BERGER, P. Airway remodeling in asthma: new mechanisms and potential for pharmacological intervention. **Pharmacology Therapeutics**, v. 130, p. 325-336, 2011.

GOMEZ, E.; FERNANDEZ, T. D.; DONA, I.; RONDON, C.; CAMPO, P.; GOMEZ, F.; BLANCA, M. Initial immunological changes as predictors for house dust mite immunotherapy response. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 45, p. 1542-1553, 2015.

GOUR, N.; KARP, W. M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. **Cytokine**, v. 75, p. 68-78, 2015.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Molecular Medicine**, v. 17, p.293-307, 2011.

GUIBAS, G. V.; LAKIS, S.; GKIMPAS, C.; MANDA, M.; KAPOUKRANIDOU, D.; SPANDOU, E. Efficiency of different decalcification protocols for nasal osseous

structures in a rat experimental model of allergic rhinitis, and their effects on epithelial histology: An attempt at standardization. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 66, p. 469-475, 2014.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, p. 119-136, 2017.

HEDRICH, H.J. The Laboratory Mouse. London: Academic Press; 2004.

HELLINGS, P. W.; KLIMEK, L.; CINGI, C.; AGACHE, I.; AKDIS, C.; BACHERT, C.; HUPIN, C. Non-allergic rhinitis: position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. **Allergy**, v. 72, p. 1657-1665, 2017.

HOLGATE, S. T. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. **Immunological Reviews**, v. 242, p. 205-219, 2011.

JONES, B. L.; KEARNS, G. L. Histamine: new thoughts about a familiar mediator. **Clinical Pharmacology Therapeutics**, v. 89, p.189-97, 2011.

KIKUCHI, Y.; TAKAI, T.; KUHARA, T.; OTA, M.; KATO, T.; HATANAKA, H. Crucial commitment of proteolytic activity of a purified recombinant major house dust mite allergen Der p1 to sensitization toward IgE and IgG responses. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 1609–1617, 2006.

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, p. 1168-1177, 2015.

KUPERMAN, D. A.; HUANG, X.; KOTH, L. L.; CHANG, G. H.; DOLGANOV, G M.; ZHU, Z.; ELIAS, J. A.; SHEPPARD, D.; ERLE, D. J. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. **Nature Medicine**, v.8, p. 885-889, 2002.

KUYAMA, S.; YAMAMOTO, A.; SUGIYAMA, M.; KAKUTA, H.; SUGIMOTO, Y. Effect of 5-aminosalicylate on allergic rhinitis model in mice. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 713-716, 2010.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The immunology of asthma. **Nature Immunology**, v. 16, n. 1, p. 45–56, 2015..

LEE, Y. Z.; SHAARIB, K.; CHEEMAA, M. S.; THAMA, C. L.; SULAIMANA, M. R.; ISRAFA, D. A. An orally active geranyl acetophenone attenuates airway remodeling in a murine model of chronic asthma. **European Journal of Pharmacology**, v. 797, p. 53-64, 2017.

LI, H. T.; CHEN, Z. G.; LIU, H.; YE, J.; ZOU, X. L.; WANG, Y. H.; ZHANG, T. T. 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. **Experimental Lung Research**, v. 42, p. 322-333, 2016.

LI, X.; CHEN, Q.; CHU, C.; YOU, H.; JIN, M.; ZHAO, X.; JI, W. OVALbumin-induced experimental allergic asthma is Toll-like receptor 2 dependent. **Allergy & Asthma Proceedings**, v. 35, p. 693-699, 2014.

LI, Z.; ZHENG, J.; ZHANG, N.; LI, C. Berberine improves airway inflammation and inhibits NF- κ B signaling pathway in an ovalbumin-induced rat model of asthma. **Journal of Asthma**, v. 53, p. 999-1005, 2016.

LIEW, F. Y.; PITMAN, N. I.; MCINNES, I. B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 103-114, 2010.

MANDHANE, S. N.; SHAH, J. H.; THENNATI, R. Allergic rhinitis: an update on disease, present treatments and future prospects. **International immunopharmacology**, v. 11, p. 1646-1662, 2011.

MANISE M. G.; HOLTAPPELS, K.; VAN CROMBRUGGEN, F.; SCHLEICH, C.; BACHERT, R.; IgE and cytokines in asthma: relationship with sputum cellular profile. **Plosone**, v.8, p. 58388, 2013.

MANSO, L.; RECHE, M.; PADIAL, M. A.; VALBUENA, T.; PASCUAL, C. Diagnostic tools assessing airway remodelling in asthma. **Allergol. Immunopathology**, v. 40, p. 108-116, 2012.

MASLAN, J.; MIMS, J. W. What is asthma? Pathophysiology, demographics, and health care costs. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 47, p. 13-22. 2014.

MATERA, M. G.; RINALDI, B.; CALZETTA, L.; ROGLIANI, P.; CAZZOLA, M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids for asthma treatment. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 101, p. 101-128, 2019.

MIYAKE, T.; MIYAKE, T.; HAMADA, H.; MORISHITA, R. Prevention of Airway Inflammation by Simultaneous Inhibition of NF κ B and STST6 Using Chimeric Decoy Oligonucleotides in a Mouse Model of Asthma. **Molecular Therapy**, v. 24, p. 231, 2016.

MOLINARO, E. M.; GONÇALVES, L. F.; AMENDOEIRA, M. R. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz. 290p. v. 2 - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.

MURARO, A.; LEMANSKE JR, R. F.; HELLINGS, P. W.; AKDIS, C. A.; BIEBER, T.; CASALE, T. B.; SIMON, H. U. 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, p. 1347-1358, 2016.

NAKAYAMA, T.; HIRAHARA, K.; ONODERA, A.; ENDO, Y.; HOSOKAWA, H.; SHINODA, K.; TUMES, D. J.; OKAMOTO, Y. T_H2 Cells in Health and Disease, **Annual Review of Immunology**, v. 35, p.53-84, 2017.

- NASR, W. F.; SOROUR, S. S.; EL BAHRAWY, A. T.; BOGHADADI, G. S.; EL SHAHAWAY, A. A. The role of the level of interleukin-33 in the therapeutic outcomes of immunotherapy in patients with allergic rhinitis. **International Archives of Otorhinolaryngology**, v. 22, p. 152-156, 2018.
- OKUBO, K.; KURONO, Y.; ICHIMURA, K.; ENOMOTO, T.; OKAMOTO, Y.; KAWAUCHI, H. Japanese Society of Allergology. Japanese guidelines for allergic rhinitis 2017. **Allergology International**, v. 66, p. 205-221, 2017.
- PARK, K. S.; KORFHAGEN, T. R.; BRUNO, M. D.; JOSEPH, A.; WERT, E.; HERSEY.; KHURANA, G. K.; CHEN, G.; WHITSETT, J. A. SPDEF regulates goblet cell hyperplasia in the airway epithelium. **Jounal Clinical Investigation**, v.117, p. 978-988, 2007.
- PAWANKAR, R.; BUNNAG, C.; CHEN, Y.; FUKUDA, T.; YOU-YOUNG, K.; LE, L.; T. T., ZHONG, N. Allergic rhinitis and its impact on asthma update (ARIA 2008)-western and Asian-Pacific perspective. **Asian Pacific journal of allergy and immunology**, v.27,p.237-243,2009.
- PELAIA, G.; VATRELLA, A.; BUSCETI, M. T.; GALLELLI, L.; CALABRESE, C.; TERRACCIANO, R.; MASELLI, R. Cellular mechanisms underlying eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in asthma. **Mediators of Inflammation**, v.13, p. 879783, 2015.
- PEREIRA, R. F. Implantação de técnicas histológicas no laboratório de imunofarmacologia / ufpb: aspectos morfológicos de desordens respiratórias experimentais. **Monografia**, Centro de ciências da Saude, UFPB 2017, João Pessoa. Paraíba.
- PIUVEZAM, M. R.; PEÇANHA, L. M. T.; ALEXANDER, J.; THOMAS, G. *Cissampelos sympodialis* Eichl. leaf extract increases the production of IL-10 by concanavalin-A-treated BALB/c spleen cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 93-101, 1999.
- PONIKAU, J. U.; SHERRIS, A. D.; KEPHART, M. G.; KERN, E. B.; GAFFEY, A. T.; TARARA, J. E.; KITA, H. Features of airway remodeling and eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis: Is the histopathology similar to asthma? **Jounal Allergy Clinncial Immunology**, v.112, p. 887-882, 2003
- RAYEES, S.; MABALIRAJAN, U.; BHAT, W. W.; RASOOL, S.; RATHER, R. A.; PANDA, L.; SINGH, G. Therapeutic effects of R8, a semi-synthetic analogue of Vasicine, on murine model of allergic airway inflammation via STAT6 inhibition. **International immunopharmacology**, v. 26, p. 246-256, 2015.
- RIBEIRO-FILHO, J.; CALHEIROS, A. S.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; DE CARVALHO, K. I. M.; DA SILVA MENDES, D.; MELO, C. B.; BOZZA, P. T. Curine inhibits eosinophil activation and airway hyper-responsiveness in a mouse model of allergic asthma. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 273, p. 19-26, 2013.
- ROBINSON, D. S. The role of the T cell in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, p. 1081-1091, 2010.

ROJAS DE ARIAS, R.; INCHAUSTI, A.; ASCURRAT, M.; FLEITAS, N.; RODRIGUEZ, E.; FOURNET, A. In vitro activity and mutagenicity of bisbenzylisoquinolines and quinones against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 141-144, 1994.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histology: a text and atlas**: with correlated cell and molecular biology. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2012

RUBINI, N. P. M.; WANDALSEN, G. F.; RIZZO, M. C. V.; AUN, M. V.; CHONG NETO, H. J.; SOLE, D. Guia prático sobre controle ambiental para pacientes com rinite alérgica. **Arquivos de Asma Alergia e Imunologia**, v. 1, p. 7-22 2017.

SALES, I. R. P. *Cissampelos sympodialis* EICHL.(Menispermaceae): avaliação das atividades antimotilidade e antidiarreica *in vivo*. **Monografia**, Centro de ciências da Saude, Universidade Federal de Paraíba, 2014. João Pessoa. Paraíba.

SAKANO, E.; SARINHO, E. S.; CRUZ, A. A.; PASTORINO, A. C.; TAMASHIRO, E.; KUSCHNIR, F.; MELLO JR, J. F. D. IV Brazilian Consensus on Rhinitis-an update on allergic rhinitis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 84, p. 3-14, 2018.

SCHULIGA M. NF-kappaB Signaling in Chronic Inflammatory Airway Disease. **Biomolecules**, v. 5, p. 1266-1283, 2015.

SHERWIN, J.; AWAD, I. T.; SADLER, P. J.; LIDDLE, A. M.; ROWBOTHAM, D. J. Analgesia during radial artery cannulation: comparison of the effects of lidocaine applied by local injection or iontophoresis. **Anaesthesia**, v. 58, p. 474-476, 2003.

SHI, Y. H.; SHI, G. C; WAN, H. Y.; JIANG, L. H.; AI, X. Y.; ZHU, H. X.; ZHANG, B. Y. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma. **Chinese Medical Journal**, v.124, p. 1951-1956, 2011.

Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica - SPAIC. **Alergia e Asma duplo Problema**, 2017. Disponível em: < <http://www.spaic.pt/noticias/alergia-e-asma>>. Acesso em: 02 de Abril de 2019.

SOLÉ, D.; ROSÁRIO FILHO, N. A.; SARINHO, E. S.; CAMELO-NUNES, I. C.; BARRETO, B. A. P.; MEDEIROS, M. L.; ANDRADE, D. M. D. Prevalence of asthma and allergic diseases in adolescents: nine-year follow-up study (2003-2012). **Jornal de Pediatria**, v. 91, p. 30-35, 2015.

SOUZA, C.; LOPES, A.; BATINA, P.; CECIM, M.; CUNHA, M.; CONRADO, C. Estresse parasitário em cabras saanen: Avaliação hematológica e da atividade oxidativa dos neutrófilos. **Veterinária Notícias**, v. 12, p. 17-23, 2006.

STICHER, O. Natural products—How have they contributed to health and society?. **Planta Medica**, v. 80, p. 118, 2014.

TAKAYAMA, G.; ARIMA, K.; KANAJI, T.; TODA, S.; TANAKA, H.; SHOJI, S.; MCKENZIE, A.N.; NAGAI, H.; HOTOKEBUCHI, T.; IZUHARA, T. Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 118, p. 98-104, 2006.

TANG, H.; LI, T.; HAN, X.; SUN, J. 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, 2019.

TARAMARCAZ, P.; GIBSON, P.G. The effectiveness of intranasal corticosteroids in combined allergic rhinitis and asthma syndrome. **Clinical and Experimental Allergy**, 34,p.1883-1889,2004.

TAUR, D. J.; PATIL, R. Y. Mast cell stabilizing, antianaphylactic and antihistaminic activity of *Coccinia grandis* fruits in asthma. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 9, p. 359-362, 2011.

TO, T.; STANOJEVIC, S.; MOORES, G.; GERSHON, A. S.; BATEMAN, E. D.; CRUZ, A. A.; BOULET, L. P. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. **Biomedical Central Public Health**, v. 12, p. 204, 2012.

THOMAS, G.; BURNS, F.; PYNE, S.; PYNE, N. J. Characterization of an extract from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl. on the spontaneous tone of isolated trachea. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 496-499, 1997.

TRONDE, A.; BOSQUILLON, C.; FORBES, B. The isolated perfused lung for drug absorption studies. **Drug Absorption Studies**, v. 7, p. 135-163, 2007.

TURGEON, M.L. Clinical hematology: theory and procedures. 4th ed. Hagerstown: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

VARRICCHI, G.; BAGNASCO, D.; BORRIELLO, F.; HEFFLER, E.; CANONICA, G. W. Interleukin-5 pathway inhibition in the treatment of eosinophilic respiratory disorders: evidence and unmet needs. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 16, p. 186-194, 2016.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 18, p. 46-471, 2008.

VIEIRA, G. C. Análise celular e molecular do efeito da instilação nasal do extrato de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) e seus alcaloides no processo alérgico experimental. 2012. 137 f. **Tese** (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa.

VIEIRA, G. C. Efeito do tratamento por nebulização com o extrato hidroalcoolico das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (menispermaceae) em camundongos BALB / c sensibilizados com Ovalbumina. 2008. 149 f. **Dissertação** (Mestrado Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa.

VIEIRA, G. C.; FEITOSA-DE-LIMA, J.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; MASCARENHAS, S. R.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; PIUVEZAM, M. R. Inhaled *Cissampelos sympodialis* down-regulates airway allergic reaction by reducing lung CD3+T cells. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 1-10, 2013.

VIEIRA, G. C.; GADELHA, F. A.; PEREIRA, R. F.; FERREIRA, L. K.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BOZZA, P. T.; PIUVEZAM, M. R. Warifteine, an alkaloid of *Cissampelos sympodialis*, modulates allergic profile in a chronic allergic rhinitis model. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 50-56, 2018.

WADSWORTH, D. S.; DORSCHEID, D. R. Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma. **Journal of Asthma and Allergy**, v. 4, p.101-112, 2011.

WANG, M.; ZHANG, W.; SHANG, J. Immunomodulatory effects of IL-23 and IL-17 in a mouse model of allergic rhinitis. **Clinical and Experimental Allergy**, v.34, p.110-116, 2013.

WANG, X.; LIU, C.; WU, L.; ZHU, S. Potent ameliorating effect of Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) antagonist YC-1 on combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS) in Rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 788, p. 343-350, 2016.

WANG, C.; CHOI, Y. H.; XIAN, Z.; ZHENG, M.; PIAO, H.; YAN, G. Aloperine suppresses allergic airway inflammation through NF- κ B, MAPK, and Nrf2/HO-1 signaling pathways in mice. **International immunopharmacology**, v. 65, p. 571-579, 2018.

WEISS, D.J., WARDROP, K.J. Schalm's Veterinary Hematology. 6th ed. Ames: Wiley Blackwell, 2010.

WENZEL, S. E. Emergence of biomolecular pathways to define novel asthma phenotypes. Type-2 immunity and beyond. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 55, p. 1-4, 2016.

WHO, Asthma, World Health Organization, 2018, <http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>, Accessed date: 10 February 2018.

WILLIAMS, D.M. Clinical pharmacology of corticosteroids. **Respiratory Care**, v. 63 p. 655-670, 2018.

WILSON T. M.; I. MARIC.; J. SHUKLA.; M. BROWN, C.; SANTOS, O.; SIMAKOVA, I. IL-5 receptor α levels in patients with marked eosinophilia or mastocytosis. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 128, p. 1086-1092, 2011.

WRIGHT, C. W.; MARSHALL, S. J.; RUSSELL, P. F.; ANDERSON, M. M.; PHILLIPSON, J. D.; KIRBY, G. C.; SCHIFF, P. L. In vitro antiplasmodial, antimamoebic, and cytotoxic activities of some monomeric isoquinoline alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1638-1640, 2000.

WYNN, T. A. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies versus leukotriene receptor antagonist for seasonal allergic rhinitis: a meta-analysis. **Plosone**, v. 9, p. 112-125, 2014.

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. **Plosone**, v. 9, p.112-125, 2014.

ZHANG, P. L.; JARED R. P.; JEFFERY W. P.; THOMAS M. B.; ADAM M. B.; SANTOSH P. CD52 Antigen May Be a Therapeutic Target for Eosinophilic Rhinosinusitis. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 37, p.148-151, 2007.

ZHAO, Y. L.; CAO, J.; SHANG, J. H.; LIU, Y. P.; KHAN, A.; WANG, H. S.; LUO, X. D. Airways antiallergic effect and pharmacokinetics of alkaloids from *Alstonia scholaris*. **Phytomedicine**, v. 27, p. 63-72, 2017.

ZUBERBIER, T.; LÖTVALL, J.; SIMOENS, S.; SUBRAMANIAN, S. V.; CHURCH, M. K. Economic burden of inadequate management of allergic diseases in the European Union: a GA2LEN review. **Allergy**, v. 69, p. 1275-1279, 2014.



Apêndice

Apêndice A- Artigo publicado

Revista Brasileira de Farmacognosia 28 (2018) 50-56



Original Article

Warifteine, an alkaloid of *Cissampelos sympodialis*, modulates allergic profile in a chronic allergic rhinitis modelGiciane C. Vieira^a, Francisco A.A.F. Gadelha^b, Raquel F. Pereira^a, Laércia K.D.P. Ferreira^b, José M. Barbosa-Filho^c, Patricia T. Bozza^d, Marcia R. Piavezam^{b,*}^a Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil^b Laboratório Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil^c Laboratório de Fisioquímica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil^d Laboratório de Imunofarmacologia, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2017

Accepted 9 October 2017

Available online 14 December 2017

Keywords:

Allergic rhinitis

Eosinophil

IgE

Nasal tissues

Mast cells

Warifteine

ABSTRACT

Cissampelos sympodialis Eichler, Menispermaceae, a Brazilian medicinal plant and its alkaloid warifteine present immunomodulatory activity on asthma experimental model by reducing antigen-specific IgE levels, eosinophil infiltration and lung hyperactivity. Allergic rhinitis is a chronic inflammatory disorder of the nasal tissue that affect the quality of life and it is a risk factor for asthma exacerbation. This study evaluated the effect of inhaled warifteine in an allergic ovalbumin rhinitis model. Inhaled warifteine (2 mg/ml) treatment of ovalbumin-sensitized BALB/c mice significant decreased total and differential number of cells on the nasal cavity and decreased ovalbumin-specific IgE serum levels. Hematoxylin & eosin staining of histological preparations of ovalbumin nasal tissues showed changes such as congestion and a massive cell infiltration in the perivascular and subepithelial regions characterizing the nasal inflammatory process. However, inhaled warifteine or dexamethasone treatment decreased cell infiltration into the perivascular regions and it was observed an intact nasal tissue. Periodic acidic staining of nasal epithelium of ovalbumin animals demonstrated high amount of mucus production by goblet cells and inhaled warifteine or dexamethasone treatment modulated the mucus production. In addition, toluidine blue staining of the nasal epithelium of ovalbumin animals demonstrated an increase of mast cells on the tissue and inhaled warifteine or dexamethasone treatment decreased in average of 1.4 times the number of these cells on the nasal epithelium. Taken these data together we postulate that warifteine, an immunomodulatory alkaloid, can be a medicinal molecule prototype to ameliorate the allergic rhinitis conditions.

© 2017 Published by Elsevier Editora Ltda, on behalf of Sociedade Brasileira de Farmacognosia. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Medicinal plants and their bioactive components are alternative options to therapies for many diseases. In Brazil, with its enormous biodiversity, the search for new natural products and bioactive molecules is an important goal. *Cissampelos sympodialis* Eichler Menispermaceae, popularly known as "jarrinha" or "milona" is found in Northeastern and Southeast of Brazil and a hot water infusion of its root bark is largely used by indigenous and northeastern population to treat several inflammatory disorders, including

asthma, bronchitis, colds and rheumatism (Barbosa-Filho et al., 1997).

Menispermaceae family is well known for producing different types of alkaloids (De Freitas et al., 1996; Barbosa-Filho et al., 2000). In general, alkaloids present a variety of biological activities such as apoptosis and NF κ B signaling inhibition in macrophages (The et al., 1990; Thomas et al., 1997), anti-inflammatory and analgesic effects (Costa et al., 2008) and anti-allergic effect (Bezerra-Santos et al., 2012; Vieira et al., 2013; Ribeiro-Filho et al., 2013). Phytochemical analysis of *C. sympodialis* root extracts leads to isolated several alkaloids including warifteine that showed pharmacological effects such as decreasing the allergic process on the experimental model of asthma (Bezerra-Santos et al., 2006).

Warifteine showed to present immunomodulatory effect (Costa et al., 2008) by reducing the plasma levels of total and

* Corresponding author.
E-mail: mrpiavezam@tfc.ufpb.br (M.R. Piavezam).



Anexos

Anexo A – Certificado de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB)



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais
Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ALCALOIDES WARIFTEINA E METILWARIFTEINA EM MODELO MURINO DE CARAS (SÍNDROME DA ASMA E RINITE ALÉRGICAS COMBINADAS)", protocolada sob o CEUA nº 2518050618 (ID 000292), sob a responsabilidade de **Marcia Regina Piuvezam** e equipe; *Raquel Fragoso Pereira* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 17/07/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECT OF ALKALOIDS WARIFTEINE AND METILWARIFTEINE IN MURINE MODEL OF CARAS (COMBINED ALLERGIC RHINITIS AND ASTHMA SYNDROME)", utilizing 65 Isogenics mice (65 females), 65 Heterogenics rats (65 females), protocol number CEUA 2518050618 (ID 000292), under the responsibility of **Marcia Regina Piuvezam and team**; *Raquel Fragoso Pereira* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 07/17/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **01/2019** a **01/2020** Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem:	Unidade de Produção Animal - IPeFarM	sex:	Fêmeas	idade:	6 a 8 semanas	N:	65
Espécie:	Camundongos isogênicos			Peso:	20 a 25 g		
Linhagem:	Mus musculus - Balb/C						
Origem:	Unidade de Produção Animal - IPeFarM						
Espécie:	Ratos heterogênicos	sex:	Fêmeas	idade:	6 a 8 semanas	N:	65
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar			Peso:	200 a 250 g		

Local do experimento: Quanto a EXEQUIBILIDADE do experimento, o Laboratório de Imunologia dispõe de infraestrutura que possibilite a realização dos testes especificados no presente projeto, ao longo da sua execução. Além disso, o discente responsável por execução dispõe de experiência obtida ao longo de três vigências e meia de iniciação científica na mesma área experimental.

João Pessoa, 17 de julho de 2018

Islânia Gisela A. Gonçalves

Profa. Dra. Islânia Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba