

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS ENANTIÔMEROS DA
CARVONA EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO AGUDA E DE
HIPERSENSIBILIDADE IMEDIATA**

JULIANA DA SILVA BRANDI OLIVEIRA

João Pessoa, PB
2011

JULIANA DA SILVA BRANDI OLIVEIRA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS ENANTIÔMEROS DA
CARVONA EM MODELOS DE INFLAMAÇÃO AGUDA E DE
HIPERSENSIBILIDADE IMEDIATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Área de concentração – Farmacologia

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Piuvezam (UFPB)

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Cláudio Roberto Bezerra dos Santos (UFPB)

**João Pessoa, PB
2011**

O48e Oliveira, Juliana da Silva Brandi.
Estudo Comparativo entre os Enantiômeros da Carvona em
Modelos de Inflamação Aguda e de Hipersensibilidade Imediata
/Juliana da Silva Brandi Oliveira.- João Pessoa: [s.n.], 2011.
136f.: il.
Orientadora: Márcia Regina Piuvezam
Co-Orientador: Cláudio Roberto Bezerra dos Santos.
Dissertação (Mestrado) – UFPb – CCS/LTF

1.Produtos Naturais. 2. Enantiômeros. 3. Carvona.

UFPb/BC

CDU: 547.9(043)

Juliana da Silva Brandi Oliveira

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS ENANTIÔMEROS DA CARVONA EM
MODELOS DE INFLAMAÇÃO AGUDA E DE HIPERSENSIBILIDADE IMEDIATA**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos da
Universidade Federal da Paraíba como
requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos – Área de
concentração – Farmacologia**

Situação: Aprovada

em: 28 / 02 / 2011

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Piuvezam
Departamento de Fisiologia e Patologia – CCS/UFPB
(orientadora)

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ferreira
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – ICB/UFJF
(Examinador externo)

Prof^a. Dr^a. Sandra Rodrigues Mascarenhas – CCS/UFPB
Departamento de Fisiologia e Patologia – CCS/UFPB
(Examinador interno)

*"Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive"*

*Fernando Pessoa
(Heterônimo Ricardo Reis)*

Dedicat6ria



“Dedico este trabalho a Deus, presente em todos os momentos da minha vida e em tudo o que faço

Aos meus queridos pais e irmãos

Ao meu esposo Rodrigo

À professora Ana Paula Ferreira, responsável pelos meus primeiros passos na pesquisa e a minha querida orientadora Márcia Regina Piuvezam, exemplo de amor e profissionalismo

E aos meus amigos companheiros de bancada...”

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela vida, por tornar todas as coisas possíveis, por trazer-me tranquilidade e certeza de que sou capaz de realizar meus sonhos.

Aos meus **queridos pais** por terem trabalhado e lutado sempre por mim e acima de tudo, por terem me dado valores, me ensinado a importância da simplicidade, da honestidade, do amor e do respeito.

Ao meu esposo **Rodrigo** por estar sempre presente ao meu lado, dividindo as alegrias e tristezas, me apoiando nas horas mais difíceis com palavras confortáveis e gestos de amor e carinho.

Ao meu **irmão**, ou seja, “irfilho” Rafael, meu maior e melhor conselheiro.

Ao meu **avô Miguel** da Silva (*In Memoriam*) e a **minha vó Maria** por todo carinho e amor fornecido.

As pessoas da **minha família** que torcem por mim.

À minha querida orientadora **Márcia Regina Piuvezam** pela oportunidade, confiança e ensinamentos que levarei para sempre em minha vida.

Aos professores **Ana Paula Ferreira, Maria Aparecia de Sousa, Fernando Lourenço e Henrique Couto Teixeira**, por terem aberto as portas da ciência, me orientado e acompanhado durante os meus primeiros passos na pesquisa e no ensino.

À professora **Sandra Rodrigues Mascarenhas** pelas dicas e confiança.

A todos os professores do mestrado, em especial a professora **Bagnólia Araújo da Silva**, pelos ensinamentos quanto apresentações e didática e aos professores **Demetrius Antonio Machado de Araújo e Reinaldo Nóbrega de Almeida**, pela contribuição direta na minha formação.

Aos **professores da minha graduação na UFJF**, em especial ao professor **Marcos Brandão**, quem sempre apostou em minha capacidade e me incentivou a seguir o caminho da pesquisa, e também aos professores Renê Gonçalves, Murilo e Eugênio.

À minha inseparável amiga **Vanessa Diniz** quem esteve comigo durante toda a graduação.

Aos meus companheiros de pós-graduação: Ana Silva, Fabíola, Hariade, Raquel, Mônica, Yanna, Ingrid, Isis, Rafael, Paula, Fabiana, Severino, Augusto, Amanda, Paloma, Aline e a todos os outros. Em especial, agradeço ao **Lázaro, Jocelmo, Camila e Thiago** por todos os momentos de descontração que passamos juntos.

Ao amigo **Gedson**, meu companheiro de todas as disciplinas.

Aos amigos e companheiros do LTF, em especial **Fábio Tenório**, por todas as idéias compartilhadas e troca de experiências, **João Carlos Pitta e Prof. Mariana Sobral** (inclusive, por todas as coisas emprestadas kkk), **Ítalo, Sócrates, Tânia, Carol e Sr. Luiz**.

Ao **Crispim** pela atenção e carinho pelo qual ele atende todos os alunos e pelas piadas contadas, que tornaram os meus dias mais felizes.

À grande pequena **Mônica**, de quem eu sentirei uma enorme saudade.

À **Luciana Teles Carneiro**, que muito além de uma companheira de seminários se tornou em uma grande amiga.

Ao **Jaime Ribeiro Filho**, meu grande talentoso amigo, pelo apoio nas horas difíceis, pela amizade, assistência e companheirismo.

Às amigas **Karina Carla Medeiros e Giciane Carvalho** pelas palavras carinhosas e ajuda nos experimentos de histologia e BAL.

Aos companheiros de laboratório, que sempre me trataram com muito carinho e respeito: **Danielle, Hermman** (principalmente pela ajuda com as ratas, kkk), **Gabrielly** (quem tão bem me recebeu no laboratório), **Laércia** (pequena IC), **Adriano** (futuro prof. Adriano), à **grande Renatinha** (amiga sempre solíssita), **Jaína** (IC neném), **Ítalo Gregório** (meu querido IC), **Nilson, Ayrla, Prof. Cláudio, Laiz e Jéssica**.

À minha grande amiga e companheira **Jacqueline** por todas as alegrias e tristezas compartilhadas, por ter me apoiado incondicionalmente durante a realização dos meus experimentos, chegando a ficar até 11h da noite no laboratório para me ajudar.

Aos amigos **Anne e Fagner** com quem sempre pude contar inclusive, aos fins de semana. Vocês moram no meu coração!

Aos meus amigos do **Laboratório de Imunologia da UFJF**: Caio, Carol, Susu, Michelle branca, Ana Maria, Michele morena, Luciano, Bruno, Márcio, Marina e Francisco pelo incentivo, amizade e pela paciência em sanar minhas dúvidas.

À amiga **Michele Barsante** (*In Memoriam*) que me ajudou a escolher essa pós-graduação.

Aos meus queridos **alunos** do curso de fisioterapia do estágio em docência na UFPB e do curso de Biomedicina e Estética da Faculdade Santa Emília de Rodat que contribuíram diretamente para o aperfeiçoamento do meu aprendizado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para esta construção.

Ao **CNPq** pelo Apoio Financeiro.

Resumo

Resumo

Enantiômeros são compostos assimétricos que apresentam a particularidade de serem imagens especulares um do outro, não sobreponíveis e por terem comportamentos diferentes em ambientes quirais, resultando frequentemente na discriminação estereoseletiva e diferentes efeitos biológicos. A carvona é um monoterpreno, constituinte de muitos óleos essenciais e encontrada na natureza na forma de dois enantiômeros: (*S*)-(+)-carvona e (*R*)-(-)-carvona. A inflamação é uma resposta fisiológica do organismo, quando ocorre de forma exacerbada ou inadequada pode promover dano tecidual e patologias associadas. Um exemplo de doença inflamatória importante é a asma, um processo de hipersensibilidade imediata nas vias aéreas e que tratamentos convencionais apresentam efeitos colaterais importantes. O objetivo desse trabalho foi avaliar os enantiômeros da carvona em modelos de inflamação e de hipersensibilidade das vias aéreas. Para investigar a atividade anti-inflamatória das substâncias os seguintes parâmetros foram avaliados: produção de NO por células J774.A1, formação de edema de pata induzido por carragenina, zimosan, composto 48/80 e histamina, migração de células e produção das citocinas (TNF- α e IL-1 β) no modelo de peritonite induzida por zimosan, em camundongos Swiss. Para avaliar a atividade anti-asmática dos enantiômeros, foi utilizado o modelo de asma experimental induzido por ovalbumina e analisado os seguintes parâmetros: celularidade do lavado bronco alveolar (BAL), produção de muco, síntese de IgE OVA-específica, produção de citocinas (IL-13, IFN- γ e IL-10). Os resultados demonstraram que ambos os enantiômeros foram capazes de reduzir a produção de NO, inibir o edema de pata induzido pelos agentes flogísticos utilizados e inibir a migração de células para o peritônio, porém apenas a (*R*)-(-)-carvona foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α . No modelo murino de asma alérgica, a (*R*)-(-)-carvona, foi capaz de reduzir a celularidade do BAL, modular a produção de IgE OVA-específica, reduzir o infiltrado de células e muco no pulmão e ainda, aumentar os níveis de IL-10. Porém, embora a (*S*)-(+)-carvona, tenha reduzido a celularidade do BAL e aumentado os níveis de IFN- γ , ela não foi capaz de reduzir o infiltrado de células no pulmão e ainda, aumentou a produção de muco. Portanto, ambos enantiômeros da carvona apresentaram efeito anti-inflamatório, embora apenas a (*R*)-(-)-carvona tenha apresentado potencial anti-asmático e ainda, os resultados apresentados pela (*S*)-(+)-carvona, revelaram um potencial efeito adverso desse enantiômero em modelo experimental de asma.

Palavras-chave: Enantiômeros, carvona, inflamação, edema, asma, muco.

Abstract



ABSTRACT

Enantiomers are asymmetric compounds that present mirror images of each other, not overlapping and different behaviors in chiral environments, resulting in estereoselective discrimination and different biological effects. The carvone is a monoterpene, a constituent of many essential oils found in nature as two enantiomers, (S)-(+)-carvone and (R)-(-)-carvone. The inflammation, a physiological response of the organism, when it occurs exaggerated or inappropriated ways may promote tissue damage and associated pathologies. An example of inflammatory disease is asthma, an immediate hypersensitivity process of the airways and the conventional treatments have significant adverse effects. The aim of this study was to evaluate the carvone enantiomers in experimental models of inflammation and hypersensitivity of the airways. To investigate the effect anti-inflammatory the following parameters were evaluated: NO production by cells J774.A1, paw oedema formation induced by carrageenan, zymosan, compound 48/80 and histamine, cell migration and cytokines production (TNF- α and IL-1 β) in the experimental model of peritonitis induced by zymosan in Swiss mice. To evaluate the anti-asthmatic activity of these enantiomers, it was used the experimental model of asthma induced by ovalbumin and the following parameters were analyzed: bronchoalveolar lavage (BAL), mucus production, OVA-specific IgE synthesis, cytokine production (IL-13, IFN- γ and IL-10). The results showed that both enantiomers were able to reduce NO production, inhibit the paw oedema induced by phlogistic agents and inhibit cell migration to the peritoneum, but only the (R)-(-)-carvone was able to reduce levels of TNF- α . In the murine model of asthma, the (R)-(-)-carvone, was able to reduce the cellularity of the BAL, modulate the OVA-specific IgE production, reduce the cell infiltration and mucus in the lungs and further increase the IL-10. However, although the (S)-(+)-carvone has reduced the BAL cellularity and increased IFN- γ levels, it was unable to reduce the cell infiltration in the lung and increase the mucus production. Therefore, both enantiomers of carvone showed anti-inflammatory effect, although only the (R)-(-)-carvone showed potential anti-asthmatic. Additionally, the results presented by (S)-(+)-carvone, revealed a potential adverse effect of this enantiomer in the experimental model of asthma.

Key-words: enantiomers, carvone, inflammation, oedema, asthma, mucus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos monoterpenos estudados:

(*S*)-(+)-carvona e (*R*)-(-)-carvona 33

Figura 2. Efeito dos enantiômeros da carvona sobre o infiltrado de células em cortes histológicos de pulmões 84

Figura 3. Efeito dos enantiômeros da carvona sobre a produção de muco em cortes histológicos de pulmões 86

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Protocolo de pleurisia alérgica induzida por OVA	58
Esquema 2. Protocolo de inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA	59
Esquema 3. Protocolo do tratamento realizado em modelo de inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito da (S)(+)- e da (R)-(-)-carvona sobre a produção de nitrito por células da linhagem J774A.1	68
Gráfico 2. Efeito dos enantiômeros da carvona sobre a viabilidade de células J774A.1 pelo método do MTT	69
Gráfico 3. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre o edema de pata induzido por carragenina	71
Gráfico 4. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre o edema de pata induzido por zimosan	73
Gráfico 5. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre o edema de pata induzido pelo composto 48/80	75
Gráfico 6. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre o edema de pata induzido por histamina	76
Gráfico 7. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre a celularidade do lavado peritoneal em modelo de peritonite induzido por zimosan	77
Gráfico 8. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre os níveis das citocinas TNF- α e IL1- β no lavado peritoneal em modelo de peritonite induzido por zimosan	78
Gráfico 9. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre a celularidade do lavado pleural em modelo de pleurisia induzido por OVA	79
Gráfico 10. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre a concentração de leucócitos e proporção de eosinófilos no BAL em modelo de asma alérgica experimental	81

Gráfico 11. Efeito do tratamento com (S)-(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre a proporção de células mononucleares e neutrófilos no BAL em modelo de asma alérgica experimental	82
Gráfico 12. Efeito do tratamento com (S)-(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre os níveis séricos de IgE OVA-específica em modelo de asma alérgica experimental	87
Gráfico 13. Efeito do tratamento com (S)-(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre os níveis de IL-13, IL-10 e IFN- γ no BAL em modelo de asma alérgica experimental	89
Gráfico 14. Efeito do tratamento com (S)-(+)- ou (R)-(-)-carvona antes das sensibilizações no recrutamento e proporção de leucócitos no BAL em modelo de asma alérgica experimental	91
Gráfico 15. Efeito do tratamento com (S)-(+)- ou (R)-(-)-carvona antes das sensibilizações sobre os níveis séricos de IgE OVA-específica em modelo de asma alérgica experimental.....	92
Gráfico 16. Efeito do tratamento com (S)-(+)- ou (R)-(-)-carvona antes das sensibilizações sobre os níveis de IFN- γ no BAL em modelo de asma alérgica experimental	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns exemplos de atividades biológicas exercidas por formas enantioméricas puras	28
---	----

LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS E TERMINOLOGIAS

(+)	<i>Dextro</i>
(-)	<i>Levo</i>
(R)	<i>Rectus</i>
(S)	<i>Sinister</i>
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
Al(OH)₃	Hidróxido de alumínio III
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ca⁺²	Íons cálcio
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
COX	Ciclooxygenase
CTLs	Linfócitos T citotóxicos
CysLTs	Cis-leucotrienos
DMSO	Dimetilsufóxido
D-NAME	Ester metílico NG-nitro-D-arginina
DTH	Hipersensibilidade do tipo tardio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FCεRI	Receptor de alta afinidade para o fragmento cristalizável da imunoglobulina E
GABA_A	Ácido gama-aminobutírico
GABA_AR	Receptor do ácido gama-aminobutírico
GATA	<i>Trans-acting T-cell-specific transcription factor</i>
H1	Receptor 1 de histamina
H2	Receptor 2 de histamina
H3	Receptor 3 de histamina
H4	Receptor 4 de histamina
HBSS⁻	Tampão sulfato-fosfato livre de cálcio e magnésio
HE	Hematoxilina-eosina
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratorácico

IFN-γ	Interferon γ
Ig	Imunoglobulina
IgE	Imunoglobulina E
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
L-NAME	Ester metílico NG-nitro-L-arginina
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LT_H	Linfócito T <i>helper</i> ou auxiliar
LTH1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
LTH17	Linfócito T auxiliar do tipo 17
LTH2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
LTH9	Linfócito T auxiliar do tipo 9
LT_{Reg}	Linfócito T regulador
MMPs	Metaloproteinases
MTT	3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
NED	N-naftil-etanolamina
NMDA-R	Receptor de glutamato NMDA
nNOS/ bNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de saúde
OVA	Ovalbumina
OVA grade III	Ovalbumina grau II de pureza
OVA grade V	Ovalbumina grau V de pureza

PAF	Fator de ativação plaquetária
PAS	Ácido Periódico – Schiff
PBS	Tampão fosfato
PCA	Anafilaxia cutânea passiva
PG	Prostaglandina
PIC	Picrotoxina
PMNs	Polimorfonucleares
RPMI	Meio de cultura <i>Royal Park Memorial Institute</i>
s.c	Subcutâneo
SEM	Erro médio padrão
SFB	Soro fetal bovino
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
SUS	Sistema Único de Saúde
T-bet	Fator de transcrição ligado de linfócito T auxiliar 1
TLR-2	Receptor semelhante ao Toll 2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
VCAM	Molécula de adesão das células vasculares

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
1.1 Isomeria: definição e termos	26
1.2 Importância da estereoisomeria no estudo de substâncias ativas	27
1.3 (S)-(+)-carvona e (R)-(-)-carvona	31
1.4 Inflamação	35
1.5 Mediadores Inflamatórios	38
1.6 Perfis de Respostas Imunológicas Adquiridas	40
1.7 Asma Alérgica	42
1.8 Características Imunológicas da Asma Alérgica	44
 2. OBJETIVOS	 48
2.1 Objetivo geral	48
2.2 Objetivos específicos	48
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 51
3.1 Obtenção dos monoterpenos: (S)-(+)-carvona e (R)-(-)-carvona	51
3.2 Preparação e utilização para os testes <i>in vivo</i>	51
3.3 Cultura celular da linhagem de macrófagos murinos J774A.1	52
3.4 Avaliação da produção de NO em cultura de células J774A.1	53
3.5 Determinação da viabilidade celular	54
3.6 Animais	54
3.7 Preparação dos enantiômeros para testes <i>in vivo</i>	55
3.8 Edema de pata induzido por carragenina, zimosan, composto 48/80 e histamina	56
3.9 Peritonite induzida por zimosan	56
3.10 Pleurisia alérgica induzida por OVA	57
3.11 Modelo murino de hipersensibilidade das vias aéreas	58
3.12 Coleta do lavado broncoalveolar (BAL)	60
3.13 Contagem total e diferencial de células do BAL	60
3.14 Coleta de pulmão para análise histológica	61
3.15 Preparo do corte histológico	61

3.16 Coloração Hematoxilina-Eosina	62
3.17 P.A.S (ácido periódico – Dchiff)	63
3.18 Coleta de sangue do plexo venoso oftálmico e preparação do soro	64
3.19 Teste de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA)	64
3.20 Quantificação das citocinas IFN- γ , IL-13 e IL-10 no BAL e de TNF- α e IL1- β no lavado peritoneal	65
3.21 Análise estatística	66

4. RESULTADOS 68

4.1 Efeito dos enantiômeros da carvona na produção de NO em cultura de células J774 A.1	68
4.2 Efeito dos enantiômeros da carvona na viabilidade de células J774 A.1	69
4.3 Efeito dos enantiômeros da carvona na formação de edema de pata induzido por carragenina	70
4.4 Efeito dos enantiômeros da carvona na formação de edema de pata induzido por zimosan	72
4.5 Efeito dos enantiômeros da carvona na formação de edema de pata induzido pelo composto 48/80	74
4.6 Efeito dos enantiômeros da carvona na formação de edema de pata induzido por histamina	76
4.7 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre o influxo de células em modelo de peritonite induzida por zimosan	77
4.8 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre os níveis das citocinas TNF- α e IL1- β em modelo de peritonite induzido por zimosan	78
4.9 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre o influxo de células em modelo de pleurisia alérgica induzida por OVA	79
4.10 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre a celularidade do BAL em modelo de asma experimental	80
4.11 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre o influxo de células mononucleares e neutrófilos no BAL em modelo de asma experimental	82
4.12 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre o infiltrado de células no pulmão em modelo de asma experimental	83

4.13 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre a produção de muco no pulmão em modelo de asma experimental	85
4.14 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre os níveis séricos de IgE OVA-específica	87
4.15 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre os níveis das citocinas IL-13, IL-10 e IFN- γ em modelo de asma experimental	88
4.16 Efeito do tratamento com os enantiômeros da carvona antes das sensibilizações sobre o influxo de células em modelo de asma experimental	90
4.17 Efeito do tratamento com os enantiômeros da carvona antes das sensibilizações sobre o níveis séricos de IgE OVA-específica	92
4.18 Efeito do tratamento com os enantiômeros da carvona antes das sensibilizações sobre os níveis de IFN- γ em modelo de asma experimental	93
5. DISCUSSÃO	95
6. CONCLUSÃO	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Isomeria: definição e termos

Isômeros são compostos que possuem os mesmos constituintes atômicos, ou seja, possuem a mesma fórmula molecular, porém apresentam fórmula estrutural ou organização espacial distinta. A isomeria pode ser dividida em dois tipos principais: plana (isômeros de cadeia, de posição, de função, de compensação e tautomeria) e espacial (isomeria geométrica ou cis-trans e isomeria óptica ou estereoisomeria). Na isomeria plana, a classificação se dá de acordo com a distribuição atômica dada pela fórmula estrutural plana dos compostos, enquanto na isomeria espacial, a classificação se dá pela distribuição dos átomos no espaço (SOLOMONS; FRYHLE, 2000).

Os estereoisômeros apresentam atividade óptica atribuída ao fato de suas moléculas apresentarem centros assimétricos, também denominados centros quirais. As moléculas com um elemento de quiralidade apresentam enantiomeria (ELIEL & WILEN, 1994).

O enantiômero é encontrado na natureza na forma de dois pares de isômeros, não sobreponíveis, mas simétricos em relação a um plano e apresentam desvios polarimétricos opostos de mesma magnitude. Portanto, um enantiômero do par é antípoda óptica do seu par complementar. Eles possuem as mesmas propriedades físicas, como solubilidade ou ponto de fusão. Uma mistura 1:1 dos enantiômeros é chamada de mistura racêmica. Esta mistura é opticamente inativa (SOLOMONS; FRYHLE, 2000).

Existem múltiplos métodos de nomeação de entidades quirais, resultando em certa confusão quanto à nomenclatura de enantiômeros. A mais antiga, é baseada no desvio da luz polarizada, assim surgiu a terminologia *d*- (*dextro*, simbolizada como “ + ”) e *l*- (*levo*, simbolizada como “ - ”) (PASTEUR, 1848). Quando a luz polarizada atravessa de forma linear e interage com uma amostra de enantiômero, ela sofre “rotação óptica”. Se o enantiômero gira o plano de luz polarizada para a direita, ele é denominado dextro-rotatório (+). Se ele gira o plano para a esquerda, é levo-rotatório (-). A dextro ou levo-rotação dos enantiômeros possuem iguais magnitudes em termos absolutos, mas em direção oposta. A mistura racêmica é muitas vezes designada como (\pm). O desvio da luz plano polarizada não

tem nenhuma correlação com a posição real de seus átomos no espaço (ORLANDO et al., 2007).

Fisher (1891) desenvolveu o sistema D/L para descrever a estereoisomeria de carboidratos. “D” ou “L” é atribuído após correlacionar a molécula quiral ao gliceraldeído. Para o gliceraldeído o carbono 2 (C2) é o centro assimétrico e a terminologia D ou L é atribuída em função do posicionamento da hidroxila, se a mesma esta posicionada a direita de C2, denomina-se D-gliceraldeído, se a esquerda: L-gliceraldeído. Todos os açúcares com a mesma configuração do D-gliceraldeído e, portanto, com a mesma configuração do centro assimétrico mais afastado do grupo carbonila, são da série D. As aldoses que representam a configuração do L-gliceraldeído são da série L. Mais tarde esse sistema passou a ser aplicado também a aminoácidos (SOLOMONS; FRYHLE, 2000).

A especificação da configuração absoluta de um centro quiral pode ser feita sem ambiguidade utilizando o sistema de Cahn-Ingold-Prelog. De acordo como o arranjo espacial, os enantiômeros recebem os prefixos *R* ou *S* seguindo o sistema de nomenclatura desenvolvido pelos químicos R. S Cahn, C. K. Ingold e V. Prelog em 1966 e adotado pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). Para tanto, deve-se ordenar os grupos ligados ao carbono assimétrico seguindo uma ordem de prioridade (quanto maior o número atômico do substituinte, maior a prioridade), posicionar a molécula de modo que o substituinte com a menor prioridade seja colocado o mais distante do observador e ler os grupos em ordem decrescente de prioridade. Se a ordem de prioridade se der no sentido anti-horário, usa-se a terminologia *R* “*rectus*”; se no sentido horário, *S* “*sinister*” (IUPAC, 1997).

As denominações *R-S* e (+)-(-) são independentes e, portanto podemos ter enantiômeros (+)-(*S*)- ou (-)-(*S*)- e da mesma maneira o enantiômero (+)-(*R*)- ou (-)-(*R*)- (FRANCOTTE, 2001).

1.2 Importância da estereoisomeria no estudo de substâncias ativas

Apesar dos enantiômeros apresentarem a maioria de suas propriedades físicas idênticas, quimicamente eles demonstram comportamentos diferentes em ambientes quirais. Essa característica é de extrema importância biológica uma vez que a maioria dos receptores endógenos de fármacos, como proteínas de membranas e enzimas também são compostos quirais. Na verdade, os sistemas

biológicos são entidades quirais. Os seres humanos são essencialmente compostos de L-aminoácidos e D- carboidratos. Além disso, as estruturas terciárias de catalisadores criam configurações tridimensionais com domínios de ligação únicos. (ROMERO, 1998).

A existência de enzimas e receptores estereoespecíficos no organismo conduz às características biológicas diferentes para compostos com estruturas quirais (THALL, 1996; FASSIHI, 1993). A capacidade de uma determinada estrutura acomodar as disparidades quirais, influencia na magnitude e no tipo de diferença de efeitos observados entre enantiômeros. Como consequência direta é observada as mais diversas respostas biológicas para os estereoisômeros. Diferentes tipos de comportamentos biológicos podem ser esperados: 1) a atividade biológica desejada é atribuída a apenas um dos enantiômeros, enquanto que o outro é inativo; 2) os enantiômeros possuem propriedades farmacológicas idênticas (ou próximas), tanto do ponto de vista qualitativo como quantitativo; 3) a atividade é qualitativamente idêntica, mas quantitativamente diferentes entre os estereoisômeros e 4) atividades dos dois enantiômeros são qualitativamente diferentes (ELIE; WILEN, 1994).

Existe uma grande variedade de fármacos cuja diferença na atividade biológica é atribuída a sua estereoquímica, alguns desses fármacos estão representados abaixo (tabela 1).

Fármaco	Efeito
Penicilamina	S: anti-artrítico; R: extremamente tóxico
Estrona	(+): hormônio estrogênico; (-): inativa
Adrenalina	(-): 20 vezes mais ativa, mais tóxica
Anfetamina	(+): 2 vezes mais ativa que o a (-)
Talidomida	R: sedativo; S: teratogênico

Tabela 1. Alguns exemplos de atividades biológicas exercidas por formas enantioméricas puras (modificado de Fassihi (1993)).

As interações altamente específicas fármaco-receptor podem resultar também em diferenças na absorção, distribuição, eliminação e, principalmente, no metabolismo de estereoisômeros. O metabolismo dos fármacos, em muitos casos, é

realizado por proteínas com alto grau de discriminação estereosseletiva (CALDWELL, 1995; PISTOLOZZI; BERTUCCI, 2008).

A quiralidade pode influenciar a base farmacológica de ligação às proteínas. A albumina apresenta diferentes graus de estereoespecificidade por um dado ligante, por exemplo, ela se liga mais avidamente ao *S*-enantiômero que ao *R*-enantiômetro do cetoprofeno (PISTOLOZZI; BERTUCCI, 2008). Considerando-se a possibilidade de existir variações no grau de interação com proteínas transportadoras, cada estereoisômero deve ser estudado como uma entidade química distinta para que os modelos farmacocinéticos não sejam interpretados erroneamente (BARREIRO; FRAGA, 2001).

Portanto, existe uma estreita relação entre a atividade farmacológica e a enantiomeria das substâncias ativas. Essa relação é atribuída à estereosseletividade dos receptores biológicos e das enzimas. Com o avanço das técnicas de separação dos enantiômeros, houve a possibilidade de realização de estudos farmacológicos destes isômeros isolados da sua mistura racêmica (revisado por BIELORY; LEONOV 2008).

A quiralidade é hoje um tema importante na concepção e desenvolvimento de novas drogas, impulsionado por uma nova compreensão do papel do reconhecimento molecular em muitos eventos farmacologicamente relevantes (NÚÑEZ et al., 2009).

Depois da tragédia ocorrida com a talidomida, ocasionada pelos efeitos teratogênicos da (-)-(*S*)-talidomida, levando à má formação de milhares de fetos, esforços contínuos têm sido realizados no intuito de se estudar a influência de diferentes arranjos espaciais dos átomos de uma molécula na sua interação com macromoléculas biológicas e a influencia desse fenômeno nos processos bioquímicos, fisiológicos e farmacológicos (revisado por SMITH, 2009).

Dessa forma, as agências mundiais regulamentadoras de saúde exigem o estudo dos enantiômeros isolados, incluindo a avaliação de racemização do centro quiral, além de preconizar a comercialização de fármacos quirais na forma de enantiômeros puros (SHINDO; CALDWELL, 1995).

No caso em que dois enantiômeros possuem potência de ação diferente, a IUPAC recomenda que o enantiômero de maior ação farmacológica e afinidade pelo receptor seja denominado de eutômero, enquanto que o outro enantiômero, responsável pelo efeito indesejado, seja denominado distômero. Além disso, a

proporção da atividade do eutômero em relação ao distômero recebe a denominação de razão eudísmica e representa a eficácia ou estereoespecificidade do enantiômero mais ativo (SOLOMONS; FRYHLE, 2000).

Vários países possuem legislações próprias quanto ao desenvolvimento e comercialização de fármacos enantioméricos (NOËL et al., 2004). No Brasil, o controle e legislação vigentes são regulamentados pela ANVISA pela RE nº896 e RDC nº135 ambas de 29 de maio de 2003.

O interesse na pesquisa do enantiômero puro é baseado na possibilidade do mesmo resultar em maior segurança e eficácia de tratamento (BARREIRO, 1997).

Devido, em parte, aos encargos associados com a determinação dos perfis e da toxicidade de compostos mistos, os racematos praticamente desapareceram do desenvolvimento de novas moléculas ativas (AGRANAT et al., 2002).

Drogas contendo o único enantiômero do par ou molécula aquiral recentemente dominam as drogas aprovadas nos Estados Unidos e outros países (AGRANAT et al., 2002; CANER et al., 2004). Somente em 2001 o mercado com fármacos enantioméricos puros foi superior a 147 bilhões de dólares (RAMACHANDRAN; SINGLA, 2002).

Encontramos no mercado exemplos de medicamentos comercializados com apenas um dos enantiômeros. Isso ocorre principalmente, quando as pesquisas apontam o fato do outro enantiômero não apresentar efeito clínico ou possuir intenso efeito adverso, como é o caso da levodopa e da levotiroxina (LIMA, 1996).

Porém, enantiômeros puros podem ou não ser uma vantagem terapêutica em relação ao racemato e por isso, pesquisas devem ser realizadas no sentido de avaliar cada caso.

O antidepressivo mirtazapina, um fármaco quiral comercializado na forma de racemato, pertence a uma classe distinta dos antidepressivos tricíclicos clássicos, pois apresentam efeitos simultâneos sobre os mecanismos de neurotransmissão noradrenérgica e serotoninérgica. A (+)-(S)-mirtazapina demonstra ter 10 vezes mais afinidade por receptores α_2 -pós-sinápticos. Em contrapartida, a (-)-(R)-mirtazapina é um inibidor cerca de 140 vezes mais potente do receptor 5-hidroxitriptamina. São essas diferenças farmacodinâmicas dos enantiômeros da mirtazapina que confere

sua aplicação nos casos de depressão. Nesse caso, a comercialização de um dos enantiômeros puros não teria o mesmo efeito do racemato (DE BOER et al., 1995).

As ligações dos enantiômeros com os sistemas biológicos são complexas, e existe a necessidade de interpretar devidamente os dados de eficácia e toxicidade, pois uma droga mesmo que seletivamente produzida, pode sofrer um “curto-circuito”, ou seja, inversão quiral, ocorrendo conversão de um enantiômero em seu oposto (ALI et al, 2007; WSOL et al, 2004). Apesar do efeito teratogênico da talidomida ter sido atribuída a (-)-(S)-talidomida, o (+)-(R)-enantiômero sofre inversão quiral, apresentando também efeitos teratogênicos (REIST et al., 1998).

Consequências da estereoespecificidade foram relatados para múltiplas classes de produtos farmacêuticos, incluindo antibióticos, fármacos cardiovasculares, quimioterápicos, psicotrópicos e drogas com ações pulmonares e reumáticas (BAKER; PRIOR, 2002; HUTT; O'GRADY,1996; KEAN et al., 1991; MEHVAR et al., 2002; RANADE; SOMBERG, 2005; VAKILY et al., 2002; WAINER; GRANVIL, 1993; WILLIAMS, 1990).

A necessidade de se pesquisar detalhadamente a ação dos enantiômeros em sistemas biológicos é justificada não apenas pelo fato da comercialização de enantiômeros isolados representar uma tendência mundial na produção de fármacos, mas também pela necessidade de se obter mais informações a respeito das interações farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas que justifiquem ou não o desenvolvimento seletivo de um dado enantiômero.

1.3 (S)-(+)-carvona e (R)-(-)-carvona

A carvona é uma cetona terpenóide líquida e oleosa, constituinte de muitos óleos essenciais. Estes são líquidos voláteis dotados de aroma forte, característico e frequentemente agradável (KNOBLOCK et al, 2003). Podem ser encontrados de forma abundante em gimnospermas dicotiledôneas e presentes em diversas famílias botânicas (SIMÕES; SPITZER, 1999).

Os óleos essenciais são misturas complexas normalmente contendo centenas de compostos. Seus constituintes podem pertencer às mais diversas classes químicas de metabólitos secundários, embora os terpenos e os fenilpropanóides sejam as classes mais comumente encontradas. O estudo destes compostos orgânicos isolados é de fundamental importância no entendimento da

aplicação dos óleos essenciais na terapêutica (MACIEL et al., 2004). A ação observada de um óleo essencial pode ser resultado do efeito aditivo, do antagonismo ou do sinergismo existente entre as diferentes substâncias que o compõem (DAVIDSON; PARISH, 1989).

O grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais dificulta a elucidação dos mecanismos de ação envolvidos nas suas ações biológicas, pois a atividade inerente de um óleo relaciona-se com a configuração química dos componentes, com as proporções e interações estabelecidas entre eles (DORMAN; DEANS, 2000; MARINO et al., 2001; DELAQUIS et al., 2002).

As substâncias químicas presentes nos óleos essenciais oriundas do metabolismo secundário da planta são produzidos em rotas metabólicas constitutivas e principalmente relacionadas à diferenciação e desenvolvimento dos vegetais (ontogenia) (GARDNER et al., 1991), podendo estar condicionados a diversos fatores estressantes, como aumento de temperatura, escassez de água, doenças, entre outros (SIMÕES; SPITZER, 1999).

Os terpenos, constituintes mais importantes dos óleos essenciais, são substâncias naturais produzidas por uma grande variedade de plantas e animais. Suas moléculas são constituídas por unidades básicas de isopreno e normalmente contêm 10, 15, 20 ou 30 átomos de carbono. Os terpenos podem ser formados pela união de no mínimo duas moléculas de isopreno, contendo cinco átomos de carbono cada uma. Essa união pode ocorrer de quatro maneiras diferentes: cabeça – cabeça, cabeça – cauda, cauda – cabeça e cauda – cauda. Nos monoterpenos (compostos que contêm 10 carbonos), a conexão normalmente encontrada entre unidades de isopreno é a cabeça – cauda, embora existam algumas exceções para este arranjo. Os terpenos podem existir como hidrocarbonetos ou apresentar oxigênio, como grupos hidroxila, cetonas, carbonila, ou aldeído. Terpenos com essas modificações químicas são denominados terpenóides (revisado por PADUCH et al., 2007)

Uma ampla gama de propriedades biológicas de terpenóides é descrito, incluindo os efeitos quimiopreventivos contra o câncer (REDDY et al., 1997; CARVALHO et al., 2006; KRIS-ETHERTON et al., 2002; CROWELL et al., 1999; GUPTA et al., 2004), antimicrobianos (COPP et al., 2003; MALLAVADHANI et al., 2004; TROMBETTA et al., 2005), antivirais (ARMAKA et al., 1999; HARADA et al.,

2005; IKEDA et al., 2005; KHAN et al., 2005; NIEDERMEYER et al., 2005), anti-hiperglicêmicas (CHEN et al., 2006; CHEN et al., 2005; JEPPESEN, 2002; JEPPESEN et al., 2003; WONG et al., 2006), anti-inflamatórias (PEANA et al., 2003; PEANA et al., 2002; REDDY et al., 2006; ESCANDELL et al., 2007; COREA et al., 2005; HART et al., 2000, SANTOS et al., 2000). Terpenos são também apresentados como promotores de penetração cutânea, além de atuarem como inseticidas naturais, podendo ser utilizados na armazenagem de produtos da agricultura (PADUCH, 2007).

O efeito anti-inflamatório na asma brônquica de alguns terpenos tal como o 1,8-cineol (eucaliptol) tem sido descrito (JUERGENSE et al., 2004; VASCO et al., 1998; JUERGENS, 2003). A atividade antiasmática foi descrita também para o L-mentol e atribuída em parte, a inibição da síntese de prostaglandinas e leucotrienos (JUERGENS et al., 1998).

O monoterpeno carvona é encontrado na natureza na forma de enantiômeros: (S)-(+)-carvona e (R)-(-)-carvona e são constituintes de óleos essenciais presentes em diferentes espécies vegetais (Figura 1). A (S)-(+)-carvona é o principal constituinte (50-70%) do óleo de cominho da espécie vegetal *Carum carvi* (Linnaeus, 1753) e é responsável pelo odor característico do cominho. Já a (R)-(-)-carvona é um constituinte abundante do óleo de hortelã (60-70%), encontrado principalmente na *Mentha spicata* Linnaeus 1753, fornecendo seu odor (YOUNIS et al., 2004; HORNOK, 1992).

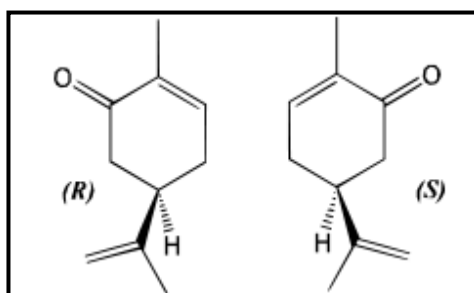


Figura 1. Estrutura química da carvona
(modificada de Sousa e colaboradores (2007))

O hortelã é usado principalmente na culinária, mas apresenta importantes propriedades medicinais: estimulante, carminativo e antiespasmódico. As sementes do cominho, muito utilizadas na fabricação de temperos, também exibem propriedades farmacológicas: antiespasmódica, carmitiva (WILSON, 1988).

A carvona possui atividade inseticida (FRANZIOS, 1997), é utilizada como flavorizante, edulcorante (BUCKINGHAM, 1994) e inibidor de germinação (HARTMANS ; DIEPENHORST, 1994) na indústria. Ambos enantiômeros da carvona são eficazes contra um amplo espectro de fungos e bactérias patogênicos, embora diferenças na potência possam ser verificadas: A (R)-(-)-carvona, por exemplo mostrou-se mais eficaz que seu par complementar contra *Campylobacter jejuni* enquanto que a (S)-(+)-carvone foi mais efetiva contra *Listeria monocytogene* (FRIEDMAN et al., 2002). Foi demonstrado o potencial terapêutico da carvona contra infecções por *Candida albicans* e poucas drogas são eficazes contra essas infecções, a maioria com limitações, em termos de eficácia e efeitos colaterais (MCGEADY et al., 2002).

Zheng e colaboradores (1992) demonstraram que a carvona possui a capacidade de induzir um aumento na atividade da enzima glutathione S-transferase em vários tecidos sendo que a (S)-(+)-carvona exibiu maior atividade quando comparada a (R)-(-)-carvona e que portanto, apresenta potencial quimiopreventivo. Outros estudos demonstram o efeito quimiopreventivo contra o câncer dessa substância (GOULD et al., 2006; WATTENBERGERG et al., 1989).

A carvona, assim como seus análogos, possui atividade anticonvulsivante, sedativa e analgésica (GONÇALVES et al, 2008; ALMEIDA et al, 2008) . Entretanto, ao comparar esses efeitos entre os enantiômeros da carvona, foi observado diferenças relacionadas a potência e tempo de início de ação (SOUZA et al, 2007).

Almeida e colaboradores (2008) demonstraram que epóxi-carvona, um análogo estrutural da carvona, na dose de 300 ou 400 mg/kg foi capaz de gerar proteção contra convulsões induzidas quimicamente pelo pentilenotetrazol (PTZ) e por eletrochoque, além de promover um aumento da latência no desenvolvimento de convulsões induzidas por picrotoxina. Como seu efeito anticonvulsicante não foi afetado pelo pré-tratamento com flumazenil, antagonista do receptor ácido gama-aminobutírico A (GABA A), foi sugerido que a ação anticonvulsivante possivelmente ocorra devido à redução da excitação nervosa. E ainda, que a (S)-(+)-carvona atue também nesse receptor.

Em adição, a (R)-(-)-carvona apresentou atividade antinociceptiva, porém não associada ao sistema opióide, uma vez que a naloxona, um antagonista opióide, não apresentou influencia em seu efeito, sugerindo portanto a não participação do sistema opióide na modulação da dor induzida pela (R)-(-)-carvona. Essa modulação

foi atribuída a diminuição da excitabilidade do nervo periférico (GONÇALVES et al, 2008).

Pouco se conhece quanto ao efeito da carvona no Sistema Imunológico, porém um potencial imunorregulador tem sido sugerido. Raphael e Kuttan (2003) demonstraram que a administração prolongada, de baixas doses da carvona em camundongos, resultou no aumento da produção de leucócitos na medula óssea, aumento na produção de anticorpos, porém inibição das respostas de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH). Em outro estudo, foi verificada redução da aderência de neutrófilos, sugerindo que ela possa atuar na modulação das respostas inflamatórias (SHIGERU et. al, 2003).

Outro fator que aponta para o potencial imunofarmacológico da carvona é o fato de estudos com monoterpenos de estrutura similar apresentar atividade antiinflamatória e antiasmática (JUERGENSE et al., 2004; JUERGENS, 2003).

Adicionalmente, apesar da influência da quiralidade dessa molécula resultar em diferenças no desencadeamento de algumas respostas biológicas, evidenciadas principalmente em estudos relacionados ao sistema nervoso central (SNC), não existem, até o presente momento, estudos que mostrem o efeito da enantiomeria da carvona no Sistema Imunológico.

1.4 Inflamação

A descrição de processos inflamatórios data de 3.000 anos atrás e sua história se entrelaça com a observação das lesões na pele. Na escrita cuneiforme, em textos da Mesopotâmia, vários termos médicos podem ser traduzidos como inflamação; ummu, por exemplo, significa "a coisa quente" e é usado em um contexto que sugere a existência de calor local ou geral (inflamação ou febre). No antigo Egito são encontrados vários escritos que podem ser traduzidos como uma inflamação (por exemplo, *seref shememet*). Ambas palavras quando escritas em hieróglifos originais são seguidas por um hieróglifo especial chamado determinante, que é um braseiro ardente, simbolizando o conceito de "coisa quente" (RYAN; MAJNO, 1977). O primeiro documento descrevendo os quatro sinais da inflamação: rubor, edema, calor e dor é de autoria do Romano Celsus, 30 a.C a 38 d.C (MAJNO, 1975). Outros importantes nomes da história da pesquisa da inflamação incluem Galen, que definiu a inflamação como uma resposta benéfica, Virchow que

descreveu o quinto sinal da inflamação (perda da função) e Elie Metchnikoff (1845-1916) que descobriu que os neutrófilos que migraram no processo inflamatório podem ser englobados por células maiores (macrófagos) retirando-os do tecido periférico (revisado por CHERNYAK; TAUBER, 1988). Desde o início do século XIX, o processo inflamatório tem sido um dos assuntos mais intensamente investigado nas áreas da medicina experimental (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

A inflamação é classicamente definida como uma resposta fisiológica à agressão tecidual e tem por finalidade combater os agentes nocivos (de natureza infecciosa ou não), além de potencializar o reparo tecidual (FLOWER e PERRETTI, 2005). Durante o processo inflamatório são liberados vários mediadores que atuam localmente desencadeando os sinais característicos desse processo, ou seja, dor, calor, rubor e edema, acompanhados ou não da perda de função do tecido ou órgão afetado (ROCHA e SILVA, 1978; SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1985).

As fontes comuns de inflamação são: infecções microbianas e virais; exposição a alérgenos; radiação e substâncias químicas ou tóxicas; doenças crônicas e autoimunes; obesidade; consumo de álcool, uso do tabaco e uma dieta rica em calorias (SCHETTER et al, 2010; revisado por AGGARWAL et al, 2009).

Hoje entende-se a inflamação como uma resposta de adaptação ao mau funcionamento de tecidos ou desequilíbrio homeostático. Isso amplia o conceito da inflamação estar presente apenas em casos de infecção, lesão tecidual e presença de corpos estranhos ou irritantes, extremo do espectro das condições que podem desencadear inflamação. Portanto, os processos inflamatórios podem aumentar a capacidade homeostática do organismo e complementar os controles homeostáticos fornecidos pelo sistema endócrino e o sistema nervoso autônomo (revisado por MEDZHITOV, 2008).

O processo inflamatório mais bem caracterizado é aquele gerado em resposta aos microrganismos infecciosos ou aos tecidos lesados. Nesse caso, é conceituada como inflamação aguda, a resposta rápida, envolvendo recrutamento local e ativação de neutrófilos. Sua função é erradicar o estímulo inicial. Se a inflamação aguda é bem sucedida, restaurando a arquitetura do tecido normal ou formando uma cicatriz de tecido conjuntivo, a homeostasia é restabelecida. A inflamação aguda persiste apenas por um curto tempo e é normalmente benéfica para o hospedeiro (revisado por REUTER et al, 2010) . Porém, se o estímulo não é eliminado, o processo inflamatório irá persistir e evoluir. Neste caso, ocorre

alterações na composição dos leucócitos infiltrantes, que passam de neutrófilos, para uma mistura de células mononucleares. Assim, um estímulo antes “percebido” pelos receptores de reconhecimento de padrões das células da imunidade inata, passa a ser reconhecido como um antígeno, devido a ativação de receptores de células T e B da imunidade adaptativa. A ativação de células T pelos antígenos, pode melhorar as funções efectoras dos fagócitos mononucleares ou recrutar células efectoras alternativas, tais como eosinófilos. As células efectoras especializadas da imunidade adaptativa, muitas vezes consegue eliminar um estímulo que resiste à erradicação da imunidade inata, permitindo a resolução do processo e o reparo tecidual. Porém, a estimulação antigênica prolongada ocasionada por agentes resistentes ou autoantígenos derivados do tecido, pode resultar em uma inflamação crônica, com a formação de um novo tecido inflamado. Tem sido relatado que algumas inflamações crônicas pode predispor o hospedeiro a várias doenças crônicas não diretamente relacionadas, incluindo o câncer (POBER; SESSA, 2007; GRIVENNIKOV et al, 2010).

Durante o processo inflamatório, ocorre vasodilatação nas proximidades da injúria e, portanto aumento do fluxo sanguíneo. A permeabilidade microvascular torna-se também aumentada, acarretando perda de proteínas plasmáticas e de fluido para o tecido. Concomitantemente, o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e Interleucina 1 (IL-1) liberados por células teciduais, principalmente por macrófagos, ativam vias de sinalização em células endoteliais que regulam a expressão de moléculas de adesão, como as selectinas, molécula de adesão das células vasculares 1 (VCAM) e integrinas leucocitárias para que ocorra o processo de migração celular (SIMMONS, 2006).

Os eventos vasculares ocorrem em resposta à ação dos mediadores inflamatórios. Estes podem ser classificados em sete grupos, de acordo com suas propriedades bioquímicas: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos de componentes do complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (MAJNO; JORIS, 2004; KUMAR et al., 2003).

1.5 Mediadores Inflamatórios

As aminas vasoativas (histamina e serotonina), são liberados de uma maneira “tudo-ou-nada” quando mastócitos e plaquetas são degranulados. Elas desencadeiam efeitos complexos sobre a vasculatura, provocando aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação ou vasoconstrição, dependendo do contexto. As consequências imediatas de sua liberação pelos mastócitos pode ser altamente prejudicial em organismos sensíveis, resultando em alguns casos, no colapso vascular e respiratório durante o choque anafilático (REUTER et al, 2010).

Os peptídeos vasoativos podem ser armazenados de forma ativa nas vesículas de secreção (por exemplo, a substância P) ou gerados por processamento proteolítico de precursores inativos no fluido extracelular. A substância P é liberada pelos neurônios sensoriais e pode promover a degranulação dos mastócitos. Outros peptídeos vasoativos são gerados através da proteólise pela trombina, fator de Hageman, ou plasmina e causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (diretamente ou induzindo a liberação de histamina dos mastócitos). O fator Hageman funciona como um sensor de dano vascular e indutor da inflamação, uma vez que ativa a cascata da calicreína cininas, e o principal produto desta cascata, a bradiginina, afeta o sistema vascular, além de ser importante indutor da dor. A sensação de dor tem um papel fisiológico importante na inflamação por alertar o organismo para o estado anormal do tecido danificado (ROCK; KONO, 2008).

Os fragmentos do complemento C3a, C4a e C5a (também conhecidos como anafilatoxinas) podem promover recrutamento de granulócitos e monócitos e induzir a degranulação dos mastócitos (BARTON, 2008).

Os mediadores lipídicos (eicosanóides e fatores de ativação plaquetária) são derivados de fosfolipídeos, como a fosfatidilcolina, presentes na membrana celular. Após a ativação por íons Ca^{+2} intracelular, a fosfolipase A2 citosólica gera ácido araquidônico e ácido lisofosfatídico, a partir da fosfatidilcolina. O ácido araquidônico é metabolizado em eicosanóides, quer por ciclooxigenases (COX1 e COX2), que geram prostaglandinas e tromboxanos, ou por lipoxigenases, que geram leucotrienos e lipoxinas. As prostaglandinas PGE2 e PGI2 produzem vasodilatação e a PGE2 também é um potente indutor de dor e febre. Lipoxinas inibem a inflamação, além de promover a resolução do processo inflamatório e reparo tecidual. A

segunda classe de mediadores lipídicos, fator de ativação plaquetária (PAF), são gerados a partir da acetilação do ácido lisofosfatídico e são responsáveis por ativar vários processos que ocorrem durante a resposta inflamatória, incluindo o recrutamento de leucócitos, vasodilatação e vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e ativação de plaquetas (HIGGS et al., 1984; SERHAN, 2007).

As citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-1, IL-6, IL-8 e outras) são produzidos por vários tipos celulares, principalmente pelos macrófagos e mastócitos. Essas citocinas possuem diversos papéis na resposta inflamatória, incluindo a ativação do endotélio e de leucócitos, além da indução da resposta de fase aguda. Adicionalmente, as quimiocinas são produzidas por muitos tipos celulares em resposta a indutores da inflamação. Elas controlam o extravasamento de leucócitos e a quimiotaxia para os tecidos afetados (HUME, 2006).

Várias enzimas proteolíticas (incluindo a elastina, catepsinas e metaloproteinases de matriz) têm diversos papéis na inflamação, em parte por degradar proteínas da matriz extracelular e da membrana basal. Estas proteases têm um papel importante em muitos processos, incluindo defesa do hospedeiro, remodelação do tecido e migração de leucócitos (JIANG et al., 2007).

O óxido nítrico (NO), produzido em grandes quantidades durante o processo inflamatório, é um radical livre de meia-vida curta, gerado a partir de L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e é bastante eficaz na eliminação de patógenos (NATHAN et al., 1994). As isoformas constitutivas (cálcio-dependente), NOS neuronal (nNOS ou bNOS) e a NOS endotelial (eNOS), produzem pequenas quantidades de NO, que atua como neurotransmissor e vasodilatador, respectivamente. A isoforma induzível (cálcio-independente), iNOS, produz quantidades muito maiores de NO e é expressa apenas durante a inflamação. Enquanto a iNOS pode produzir quantidades prejudiciais de NO, a eNOS e a nNOS, em condições fisiológicas, produzem quantidades benéficas desse radical livre. A iNOS é induzida por citocinas, como interferon- γ (IFN- γ), TNF- α , IL-1 e lipopolissacarídeo (LPS) (DAVIS et al., 2001; moncada et al., 1993; LOWENSTEIN; PADALKO, 2004; XIE et al., 1994).

As enzimas NADPH oxidase e a xantina oxidase, produtoras de espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido (O_2^-) são também ativadas durante um

processo inflamatório. A produção simultânea de NO e O_2^- resulta na geração de peroxinitrito ($ONOO^-$) que, por sua vez, prejudica o funcionamento de moléculas e organelas alvo, como proteínas, glutathione (GSH), mitocôndrias e DNA (DYKE e SERHAN, 2003; PACHER *et al.*, 2007). A lesão do DNA pode iniciar a morte apoptótica, que é o gatilho para ativação da polimerase poli ADP-ribose (PARP). Essa enzima é capaz de induzir a necrose celular, pela depleção de ATP. Tanto o peroxinitrito como o PARP, contribui para a intensificação das vias de transdução do sinal inflamatório, produzindo, desta forma, um ciclo de auto-amplificação da lesão celular inflamatória (PACHER *et al.*, 2007).

No processo inflamatório há uma linha tênue entre os efeitos benéficos da inflamação e a possibilidade do processo causar e agravar uma lesão tecidual, levando a apoptose e necrose (ALLER *et al.*, 2006). A inflamação é limitada por respostas antiinflamatórias, intrínsecas ao organismo e integradas ao sistema nervoso (TRACEY, 2002; revisado por NATHAN, 2002). Quando as forças de contenção intrínsecas falham ou não são suficientes faz-se uso de auxiliares extrínsecos que quando administradas ao organismo possuem ação antiinflamatória e atuam na recuperação da homeostasia corpórea. Dentre as principais terapias anti-inflamatórias, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) representam a classe mais amplamente aplicada (BURIAN e GEISLINGER, 2005).

Os fármacos anti-inflamatórios utilizados na terapêutica, muitas vezes, mostram-se apenas paliativos, e/ou apresentam efeitos colaterais que se sobrepõem às vantagens do tratamento (BERTOLINI, *et al.*, 2001). Desta forma, é necessária a busca por novas abordagens terapêuticas, e/ou tratamentos antiinflamatórios com menos efeitos colaterais. Além disso, alguns estudos relatam que a quiralidade de uma substância pode interferir em seu efeito anti-inflamatório (BOLE-VUNDUK *et al.*, 1996).

1.6 Perfis de Respostas Imunológicas Adquiridas

Linfócitos são células imunológicas que apresentam, em sua maioria, receptores específicos para antígenos, ou seja, para substâncias capazes de provocar respostas imunológicas específicas. Eles são classificados como linfócitos B e linfócitos T. Os primeiros são células que sofrem maturação na medula óssea e são responsáveis pela produção de anticorpos ou imunoglobulina (Ig). Já os

linfócitos T, assim chamados por sofrerem maturação no timo, podem ser ainda subdivididos com base em proteínas específicas expressas em sua superfície, conhecidas como grupo de diferenciação ou *cluster of differentiation* (CD). Anticorpos monoclonais específicos contra os CDs tem sido utilizados para marcação de células imunológicas (JANEWAY et al., 2001).

Os linfócitos T que expressam CD₈+, quando efetores conhecidos como linfócito T citotóxico (CTLs), são importantes na resposta a vírus e tumores. Já os linfócitos T que expressam CD₄+ apresentam como atividade efetora a produção de citocinas, por isso são conhecidos como linfócitos T auxiliares e frequentemente são nomeados de linfócitos T *helper* ou LT_H (JANEWAY et al., 2001; WILSON; TRUMPP, 2006).

Citocinas são proteínas importantes para sinalização de respostas biológicas. De acordo com a natureza do antígeno, o LT_H pode produzir padrões específicos de citocinas. Linfócitos T CD₄+ que produzem preferencialmente as citocinas IL-2 e IFN- γ são conhecidos como linfócitos T_{H1}, já os que produzem IL-4, IL-13, IL-5, IL-9 e IL-10 são chamados de linfócitos T_{H2} (COLLONA, 2001).

Os clones de linfócitos T_{H1} e T_{H2} têm a capacidade de regular negativamente e mutuamente o desenvolvimento um do outro. É conhecido que o IFN- γ proveniente dos linfócitos T_{H1} diminui a diferenciação dos clones T_{H2}. Além disso, a IL-4 e a IL-10 do T_{H2} diminuem a diferenciação em T_{H1} (revisado por HWANG et al., 2005).

Para a diferenciação de células T_{H1}, o fator de transcrição T-bet é fundamental, já o fator de transcrição GATA-3 é crucial para diferenciação de células T em células T_{H2}. T-bet pode inibir a função do GATA3 e por isso, a resposta T_{H1} pode modular a resposta T_{H2} (HWANG et al., 2005).

Linfócitos T CD₄+ associados à maior produção de citocinas IL-17A, IL-17F e IL-22 e ao fator de transcrição específico ROR γ T, são denominados de LT_{H17}. As células T CD₄+ que produzem grande quantidade de IL-9 têm sido reconhecidas como pertencente a outro subtipo de célula T: LT_{H9} (NEILL et al., 2010).

As células T com marcação CD₄+CD₂₅+ e que expressam o fator de transcrição FoxP3 produzem preferencialmente as citocinas IL-10 e TGF- β e são reconhecidas como linfócitos T reguladores (T_{Reg}). Elas possuem a capacidade de suprimir a resposta imune, sendo importantes na manutenção da homeostasia (LANGIER et al., 2010).

As respostas imunológicas adquiridas, normalmente são iniciadas nos órgãos linfóides periféricos, principalmente nos linfonodos. Esses são pequenos agregados de tecidos ricos em linfócitos localizados em toda a extensão dos canais linfáticos ao longo do corpo e tem a função de otimizar as interações celulares necessárias para a fase de reconhecimento e ativação das respostas imunológicas adquiridas (ADKINS et al., 2003).

1.7 Asma Alérgica

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a asma como uma doença crônica caracterizada por ataques recorrentes de falta de ar e chiado no peito. Esses sintomas variam quanto a gravidade e frequência nos indivíduos acometidos e é relatado uma maior incidência de ataques no período noturno e na realização de atividades físicas. Durante um ataque de asma, a mucosa dos brônquios intumescem, resultando em estreitamento das vias aéreas e redução do fluxo de ar para dentro e para fora dos pulmões.

Embora a asma resulte uma taxa de mortalidade relativamente baixa, em comparação com outras doenças crônicas, os sintomas frequentemente causam insônia, fadiga diurna, níveis reduzidos de atividade, levando ao absenteísmo na escola e no trabalho. Estima-se que 300 milhões de pessoas atualmente sofram de asma. É também, a doença crônica mais comum entre as crianças. A asma é um problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, porém a maioria das mortes ocorrem em países de renda baixa e média. É uma doença sub-diagnosticada, sub-tratada e cria encargos substanciais para os indivíduos acometidos, famílias, governos e muitas vezes restringe as atividades desses indivíduos (Organização Mundial da Saúde) (www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/05/12/10).

Apesar de o Brasil ser um país carente em dados epidemiológicos que estime a prevalência dessa doença na população, as estatísticas existentes no país aponta dados alarmantes (AGUIAR-FILHO et al., 2005). Dados obtidos no Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS) do Ministério da Saúde relatam que em 2006, entre as causas de morte definidas, as doenças do aparelho respiratório representaram a quarta causa de óbito no Brasil. Quanto a internações, entre 2003 e

2008, as doenças pulmonares foram responsáveis por aproximadamente 12% do total de internações na rede SUS, representando um custo superior a cinco bilhões de reais por ano. Entre essas doenças, destacam-se: a asma, a doença pulmonar obstrutiva crônica, pneumonia e tuberculose. Com relação à asma, anualmente ocorrem cerca de 250.000 internações no Brasil, estando entre as cinco maiores causas de hospitalizações pelo SUS (2,3% do total), sendo a segunda na faixa etária de menores de um ano a 24 anos (AGUIAR-FILHO et al., 2005).

Dados epidemiológicos apontam esta doença como um dos principais problemas de saúde pública, afetando cerca de 20% da população e demandando altos custos com internações e tratamentos (EDWARDS et al., 2009).

A incidência global da asma continua aumentando embora a diferença na prevalência entre os países tenha reduzido pelo decréscimo de incidência nos países de língua inglesa da Europa Ocidental e aumento em regiões onde anteriormente a incidência era baixa como África, América Latina e partes da Ásia. Parte dessa modificação é atribuída ao fato de ter ocorrido uma melhor padronização das características patológicas dessa doença e/ou de mudanças na prática do diagnóstico (PEARCE et al, 2007).

Muitos fatores têm contribuído para o aumento da prevalência da asma brônquica, tais como, o aumento da poluição atmosférica e a rápida modernização. O aumento da urbanização explica em parte, a modificação na tradicional baixa incidência da asma nos países subdesenvolvidos (RAMOS et al., 2006; PEARCE et al, 2007). Além disso, o difícil acesso a serviços médicos, o preço das medicações e falta de informação da população afetada torna a situação ainda mais complicada (RAMOS, et al., 2006).

Alguns estudos relatam que a exposição a determinados antígenos durante a infância pode estar relacionado a proteção contra a asma (RIEDLER et al., 2001; EGE et al., 2007). Porém, os mecanismos envolvidos nessa proteção ainda não estão claramente definidos (MUTIUS; VERCELLI, 2010).

A maioria dos pacientes com asma são atópicos (asma extrínseca), mas alguns pacientes são não-atópicos (asma intrínseca), e esses pacientes freqüentemente desenvolvem a forma mais severa da doença (WENZEL, 2006). Há um círculo na asma severa, que tende a ser mantido durante toda a vida (PHELAN, 2002). Aproximadamente 5% dos pacientes têm asma severa que é de difícil

controle por terapia inalatória conhecida e por isso é necessário a procura por novas terapias (revisado por BARNES, 2008).

A etiologia da asma é multifatorial, uma vez podem estar envolvidos tanto fatores genéticos que predisõem o indivíduo à doença, quanto os fatores ambientais como poluição atmosférica, fumo e exposição à poeira (WENZEL, 2006).

1.8 Características Imunopatológicas da Asma Alérgica

A asma é considerada uma doença inflamatória crônica do pulmão, caracterizada por hiper-responsividade das vias aéreas, infiltrado inflamatório nas paredes brônquicas contendo eosinófilos, e níveis elevados de IgE no soro dos indivíduos acometidos. O processo inflamatório característico da asma alérgica é resultado da reação de hipersensibilidade imediata. Essa reação consiste em uma resposta imune exacerbada contra substâncias que para a maioria dos indivíduos são inócuas. O processo é desencadeado quando indivíduos atópicos, previamente sensibilizados, entram em contato com o antígeno (KEYNAN et al, 2008).

A sensibilização consiste na polarização de linfócitos T CD4+ para um perfil de resposta T_H2. A IL-4 produzida por células T_H2 promove a recombinação de genes responsáveis pela formação das cadeias pesadas de imunoglobulinas nos linfócitos B. Após essa sinalização, as células B passam a sintetizar imunoglobulina E (IgE) (WILLS-KARP, 2000). A IgE liberada por linfócitos B diferenciados, chamados de plasmócitos, podem se ligar a receptores FCεRI presente na superfície de mastócitos, ocorrendo assim o processo de sensibilização (HOGAN et al., 1998).

Em contatos subseqüentes com o mesmo antígeno, também chamado de desafios, este poderá se ligar a IgEs presentes em mastócitos sensibilizados. Quando essa ligação ocorre de forma cruzada, ou seja a pelo menos duas IgEs, ocorrerá a liberação de mediadores inflamatórios presentes em grânulos pré-formados: histamina, serotonina e promover a síntese e liberação de prostaglandinas, leucotrienos, fator de ativação plaquetária (PAF) e citocinas (MCKAY, 2004; BARNES, 2008). Esses mediadores quando liberados nas vias áreas aumentam a permeabilidade vascular, induzem contração da musculatura lisa causando dificuldade respiratória bem como a proliferação de fibroblastos e células musculares lisas, contribuindo para o remodelamento das vias aéreas (KANAOKA; BOYCE, 2004). As citocinas IL-4, IL-13 e IL-5 produzidas pelos linfócitos TH2

promovem recrutamento de eosinófilos e a IL-5 promove ativação e gera sinais de sobrevivência para essas células, que são as principais causadoras dos danos tissulares (revisado por KAY, 2006).

Embora a característica unificadora fisiopatológica da asma seja a hiperreatividade das vias aéreas (AHR) que leva à obstrução dinâmica, a expressão clínica da doença é heterogênea. Por exemplo, uma grande porcentagem de pacientes asmáticos são atópicos, com maiores concentrações séricas de imunoglobulina E (IgE), em outros não há evidência de atopia. Além disso, apesar do infiltrado granulocítico das vias aéreas da maioria dos asmáticos ser dominado por eosinófilos, os neutrófilos predominam em pacientes no espectro final da doença grave (WENZEL, 2006).

Hoje se sabe que a asma alérgica, uma doença com aspecto clínico tão variável, não é resultado apenas do desenvolvimento da resposta TH2 exacerbada, mas também de outros perfis de respostas imunológicas, desencadeados principalmente por linfócitos T_H9 e T_H17 , importantes, sobretudo, no desencadeamento da asma severa. Por outro lado, células T reguladoras desempenham um papel primordial na supressão dessas respostas. Essa nova concepção surgiu pela observação que apenas o paradigma TH2 não é capaz explicar todo o espectro da asma. A doença grave não está associada a uma propensão exclusiva para a produção de citocinas T_H2 , portanto fatores adicionais além dessas citocinas, provavelmente desempenham um papel importante na patogênese da doença (LAJOIE et al, 2010).

Pacientes com asma grave têm não só a exacerbação do processo de hiperresponsividade das vias aéreas, como também neutofilia e aumento na produção de IL-17A. Tem sido proposto que o aumento da IL-17A conduza a formas graves da doença (CHAKIR et al, 2003; AL-RAMLI et al.,2009). Um estudo publicado recentemente relatou que a susceptibilidade ao desenvolvimento dos processos graves estava associado à maior produção de citocinas T_H17 (IL-17A, IL-17F e IL-22), enquanto que os processos leves, foram associados a abundante produção de citocinas TH2, mas pouca ou nenhuma produção de citocinas T_H17 . Uma das explicações para esse fato é que a IL-17 A reforça a sinalização da IL-13 em células do músculo liso e fibroblasto, contribuindo no processo de remodelamento das vias aéreas (LAJOIE et al, 2010).

Outro ponto chave na patogênese da asma severa é a participação da citocina IL-9, principalmente devido ao fato dessa citocina ser importante para crescimento de vários tipos de células envolvidos na asma. Como citado anteriormente, as células T CD4⁺ que produzem grande quantidade de IL-9 têm sido reconhecidas como pertencente a outro subtipo de célula T: LT_H9 (NEILL et al, 2010).

Existem mecanismos responsáveis por regular as respostas imunológicas e nesse contexto, tem se destacado o papel das células T reguladoras (T_{Reg}), com efeito supressor sobre outras células T CD4⁺. Essas células têm mostrado importante papel na regulação da função das células T_H2 na asma (UMETSU; DEKRUYFF, 2006). Foi relatado que essas células regulatórias estão diminuídas em indivíduos com rinite alérgica (febre do feno) (BARNES, 2008).

Os modelos animais têm sido utilizados por mais de 100 anos para elucidar a fisiopatogenia de doenças humanas e para avaliar novos alvos terapêuticos. Em relação à asma, desde o início da década de 1990 foram estabelecidos modelos com camundongos para estudar aspectos específicos da doença, permitindo realizar estudos em animais isogênicos com os sistemas imune e respiratório intactos. Esses modelos representam o único método disponível para estudar alguns processos *in vivo* da doença (NIALS, 2008). Dentre os modelos mais utilizados estão àqueles induzidos com ovalbumina (OVA) em camundongos BALB/c. A OVA quando administrada em condições e intervalos adequados leva ao desencadeamento de vários sintomas da asma, como intenso infiltrado de células inflamatórias no pulmão, liberação de mediadores inflamatórios, produção exacerbada de muco por células califormes e de citocinas do perfil TH2 (FACINCONE et al, 1997).

Em virtude da complexidade fisiopatológica, a asma é uma doença de difícil controle e as substâncias atualmente utilizadas na terapia visam uma combinação de alívio dos sintomas e controle terapêutico, incluindo: corticosteróides, anti-histamínicos, agonistas β_2 -adrenérgicos e inibidores de fosfodiesterases (HOLGATE; POLOSA, 2008). Entretanto, a maioria destas drogas provoca efeitos colaterais graves, como: alterações endócrinas, efeitos sedativos e anticolinérgicos (ALEN, 2006), o que torna importante o desenvolvimento de pesquisas de novos fármacos para o tratamento desta doença.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Avaliar os efeitos dos enantiômeros da carvona em modelos experimentais de inflamação aguda e de hipersensibilidade das vias aéreas induzida por ovalbumina.

2.2 Específicos:

- Avaliar a produção de NO (óxido nítrico) e a citotoxicidade em função de diferentes concentrações dos enantiômeros da carvona na linhagem de macrófagos J774A.1.
- Estudar o efeito do tratamento com *S*-(+)-carvona ou *R*-(-)-carvona (substâncias teste) no edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos: carragenina, zimosan, composto 48/80 e histamina em camundongos *Swiss*.
- Investigar o efeito do tratamento com as substâncias teste no infiltrado de células inflamatórias induzido por zimosan no espaço peritoneal de camundongos *Swiss*, bem como a produção de TNF- α e IL-1 β .
- Avaliar a presença de células inflamatórias na cavidade pleural de camundongos BALB/c em modelo experimental de pleurisia induzida por ovalbumina (OVA).
- Avaliar a presença de células inflamatórias, bem como a produção de IFN- γ , IL-10 e IL-13 no lavado bronco alveolar (BAL) de camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com ovalbumina, tratados ou não com as substâncias teste 1 hora antes dos desafios.

-
- Determinar a produção de IgE OVA-específica no soro dos animais sensibilizados e desafiados com OVA tratados ou não com os enantiômeros da carvona
 - Analisar o infiltrado de células e a produção de muco nos cortes histológicos do pulmão de camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com ovalbumina, tratados ou não com as substâncias teste.
 - Estudar o efeito do tratamento com os enantiômeros da carvona antes das sensibilizações quanto aos seguintes parâmetros: celularidade do BAL, produção de IgE OVA-específica e produção de IFN- γ .

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos monoterpenos: (*S*)-(+)-carvona e (*R*)-(-)-carvona

As substâncias foram adquiridas da empresa Sigma Aldrich (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO-USA) e gentilmente cedidas pelo professor Dr. Damião Pergentino de Sousa da Universidade Federal de Sergipe.

3.2 Preparação e utilização dos enantiômeros para testes *in vitro*

Os enantiômeros da carvona eram diluídos em dimetilsufóxido (DMSO-VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) para a realização dos ensaios *in vitro*, devido à hidrofobicidade desses monoterpenos. Esse solvente foi previamente filtrado em filtro milipore de 13 mm de diâmetro (MILIPORO, Japão), e sua concentração ajustada de forma que a concentração final de DMSO em cada poço da placa de cultura fosse igual a 0.5 %.

Os compostos eram testados nas concentrações finais de 1, 3, 10, 50 e 100 µg/mL. Assim, uma solução mãe de *S*-(+)-carvona ou *R*-(-)-carvona de 1000 µg/mL era preparada pesando-se, em placa de petri contendo 0,5 mL de DMSO, 10 mg de cada enantiômero. Após homogeneização, eram adicionados 9,5 mL de uma solução de RPMI 1640 suplementado com 5 % de soro fetal bovino, 1 % de aminoácidos não essenciais e 1 % de antibiótico penicilina-estreptovidina (GIBCO – Introgen, CA, USA). Essa solução, após adicionada na cultura, era diluída 10 vezes. As diluições sucessivas das substâncias teste eram realizadas com meio RPMI suplementado, contendo 5 % de DMSO, de forma a assegurar que a concentração final de DMSO em cada solução a ser testada, independente da concentração de enantiômeros, se mantivesse constante.

3.3 Cultura celular da linhagem de macrófagos murinos J774

Para avaliar a produção de NO (óxido nítrico) bem como a viabilidade celular, era realizada cultura de células da linhagem celular murina J774 A.1 (ATCC n°. TIB 67). Esta linhagem foi adaptada para cultura a partir de um tumor em fêmeas de camundongos BALB/c em 1968 (HAY et al., 1994). Alíquotas de células J774 contidas em suspensão com DMSO em criotubos, armazenadas em um tambor de nitrogênio líquido, eram descongeladas em fluxo laminar e transferidas para tubos tipo Falcon contendo 8 mL de meio RPMI completo (RPMI 1640 com 10 % de soro fetal bovino, 1 % de L-glutamina, 1 % de aminoácidos não essenciais e 0,5 % de penicilina-estreptomicina (GIBCO – Invitrogen, CA, USA)) para lavagem. Essas suspensões de células eram centrifugadas (CR422, JONAM) à 1000 RPM por 10 min em uma temperatura de 4° C; os sobrenadantes eram desprezados e os *pellets* formados eram ressuspensos em 5 mL de RPMI completo. O conteúdo de cada suspensão formada era transferido para um frasco de cultura (garrafa plástica de cultura estéril NUNC) e incubado à 37° C em estufa de CO₂ (MODEL-5415, IRCO₂ SYSTEM, NAPCO®).

Para manutenção das células em cultura, o meio contido nos frascos eram trocados quando necessário: o meio consumido era desprezado e 5 mL de meio RPMI completo, adicionado ao frasco de cultura. Quando o grau de confluência de células em um frasco era igual ou superior 80 %, eram então, realizados repiques. Para tal, era desprezado o meio de cultura do frasco, adicionado 5 mL de RPMI completo e “raspava-se” cuidadosamente o fundo do frasco de cultura a ser repicado com o auxílio de um espalhador de células: “rodinho” estéril (BECTON DICKINSON, NJ-USA) . Posteriormente, transferia-se 2,5 mL dessa suspensão para um novo frasco estéril e acrescenta-se mais 2,5 mL de meio RPMI completo nesse novo frasco e também no frasco repicado.

Após atingirem confluência, eram coletadas e lavadas em meio RPMI completo, por centrifugação a 1200 rpm a 4°C por 10 minutos e a viabilidade determinada utilizando o corante vital Azul de Trypan (MERCK, São Paulo, SP) pela contagem em câmara hemocitométrica. As células eram ressuspensas na concentração de 4×10^5 células/mL de meio RPMI completo e distribuídas em poços de placa de 96 poços (100µL/poço- NUNC). Em seguida, as células eram cultivadas por 48 horas, na presença ou não de 10 µL dos estímulos (sobrenadante

enriquecido com IFN- γ a 9 ng/mL e LPS a 10 μ g/mL) (FUNDAÇÃO ATAULPHO DE PAIVA, São Cristovão –Rio de Janeiro), seguida da adição ou não de 10 μ L das substâncias teste (S-(+)-carvona ou R-(-)-carvona), nas concentrações de 0 (apenas o meio RPMI completo, acrescido de 5% de DMSO), 10, 30, 100, 500 e 1000 μ g/mL, resultando respectivamente nas concentrações de 0 (0,5% de DMSO), 1, 3, 10, 50 e 100 μ g/mL nos poços testados.

Após a incubação por 48 h os sobrenadantes eram coletados e analisados quanto à produção de NO e a viabilidade celular, determinada.

3.4 Avaliação da produção de NO

A produção de NO foi avaliada *in vitro* pela dosagem do seu produto de degradação mais estáveis, nitrito, pelo método colorimétrico indireto conhecido como Reação de Griess (GREEN et al., 1982). Neste método, o nitrito, quando presente na amostra, reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, podendo assim ser analisado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 550 nm.

Eram adicionados 0,1 mL de reagente de Griess a 0,1 mL dos sobrenadantes das culturas (obtidos e processados como descrito acima). Esse reagente é constituído pela mistura de duas soluções A e B na proporção 1:1, que eram preparadas imediatamente antes do uso. A solução A é constituída por: naftiletilenodiamino 0,1 % (p/v) em ácido orto-fosfórico 5 % (v/v), e a solução B por sulfonamina p-aminobenzeno 1 % (p/v) em ácido fosfórico 5 % (v/v) (MERCK BIOSCIENCES, Germany). Após o reagente de Griess reagir por 10 min a 26° C com as amostras, era realizada a leitura em leitor de microplaca utilizando filtro de 550 nm em leitor de microplaca (SPECTRAMAX 190 – Molecular Device). Os resultados em μ moles eram determinados pela comparação com a curva padrão (realizada com nitrito de sódio nas concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5 μ M).

3.5 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT. Neste método, o MTT, brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio, é reduzido em células metabolicamente ativas por desidrogenases mitocondriais. Nesta reação é formado cristal de formazan, um produto de cor roxa solúvel em DMSO e em álcool ácidos (REILLY et al., 1998).

Após 48h de cultura celular, o sobrenadante era retirado para dosagem de óxido nítrico (NO), como descrito acima. Às células que permaneciam nos poços da placa eram adicionados 90 µL de meio RPMI completo e 10 µL de uma suspensão de MTT (SIGMA CHEMICAL, St. Louis, MO-USA) a 5 mg/mL. Essas suspensões celulares eram incubadas por 4 horas, à temperatura de 37° C e 5 % de CO₂. Após esse período, o sobrenadante era removido e 100 µL de uma solução a 0,1 M de isopropanol/ácido clorídrico (Merck Biosciences, Germany) era adicionada em cada poço para dissolver o formazan formado. A viabilidade celular era quantificada pela medida da densidade óptica no comprimento de onda de 570 nm, determinada por um leitor de microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device). A média dos valores das absorvâncias obtida nas células não tratadas era considerada como 100 % de viabilidade (MOSMANN, 1983; WILSON, 2000).

3.6 Animais

Para a realização dos experimentos *in vivo* eram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c fêmeas, de 6 a 8 semanas, pesando de 20 g a 25 g, camundongos *Swiss* também fêmeas de 6 a 8 semanas, com peso entre 25 e 30 g e ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando cerca de 200 g. Os animais eram fornecidos pelo Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os animais eram submetidos a ciclo de claro e escuro de 12 horas, mantidos a uma temperatura de 25 ± 2 °C com livre acesso à água, com uma alimentação balanceada a base de ração tipo *pellets* (Purina). Antes do início dos experimentos os animais eram mantidos no laboratório por um período de pelo menos 1 hora para adaptação.

Os experimentos eram conduzidos de forma a preservar ao máximo o bem-estar dos animais no laboratório, sendo respeitados os Princípios Éticos em Pesquisa Animal. A manipulação dos animais foi realizada de acordo com o guia de cuidado animal (SHERWIN et al., 2003) e posteriormente submetidos a um procedimento terminal por meio de eutanásia por overdose de anestésicos (Ketamina e Xilazina - Virbac, São Paulo, Brasil).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do LTF da Universidade Federal da Paraíba quanto ao uso dos animais experimentais (Parecer N^o 0604/08).

3.7 Preparação dos enantiômeros para testes *in vivo*

Por se tratar de substâncias oleosas, as mesmas eram emulsificadas em tween 80 (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) de forma que a concentração final do tensoativo na emulsão resultante fosse de 5 %.

A dose escolhida para todos os testes *in vivo* foi de 10 mg/kg, visto que doses menores (0.1 e 1 mg/Kg) testadas na triagem, em modelo de pleurisia induzido por ovalbumina, não foi capaz de promover diminuição significativa do influxo de leucócitos para a cavidade pleural. Adicionalmente, essa dose está muito abaixo da dose letal 50 (DL50) relatada por Sousa e colaboradores (2007) para os enantiômeros da carvona: 485.2 mg/Kg para a (S)-(+)-carvone e 426.6 mg/kg para a (R)-(-)-carvona.

As emulsões eram preparadas pesando-se 3 mg de cada enantiômero em uma placa de petri contendo 0,15 mL de tween 80. Após homogeneização com o auxílio de um bastão de vidro, o volume de 2,85 mL de água filtrada era acrescentado aos poucos, formando uma emulsão cuja concentração final era de 1mg/mL. O volume de 0,1 mL dessa emulsão para cada 10 g de animal, o que corresponde a dose de 10 mg/kg, era administrada por gavagem nos camundongos.

Adicionalmente, nos testes *in vivo*, as substâncias foram administradas por gavagem para simular administração oral, uma vez que a carvona é facilmente absorvida pelo Trato Gastrointestinal (MASCHER et al., 2001).

3.8 Edema de pata induzido por carragenina, zimosan, composto 48/80 e histamina

Primeiramente, a espessura das patas traseiras de camundongos *Swiss* era avaliada com o uso de um micrômetro digital (GREAT, MT – 04513) e a diferença entre a pata direita e esquerda era considerada como a medida basal. Em seguida, para avaliar o efeito da (*S*)-(+)-carvona e da (*R*)-(-)-carvona na formação do edema de pata, as mesmas eram administradas por gavagem, 60 min (minutos) antes da administração dos agentes flogísticos. Nos experimentos realizados com a carragenina ou zimosan, era acrescentado um grupo de animais tratados com 0,5 mg/kg de dexametasona (droga padrão), por via intraperitoneal (i.p.), 30 min antes da indução do edema.

Os agentes flogísticos eram suspensos ou dissolvidos em salina de forma que a concentração preparada de carragenina, zimosan, composto 48/80 e histamina (todos adquiridos da SIGMA CHEMICAL Co, EUA) era de 2,5 %, 1 %, 0,0005 % e 0,0002 %, respectivamente, conforme Castardo e colaboradores (2008).

Para indução dos edemas, era realizada a injeção por via intraplantar (i.pl.), onde 20 µL do agente flogístico eram injetados na pata traseira direita e 20 µL de salina, na pata traseira esquerda.

A diferença entre a espessura da pata traseira direita e esquerda era avaliada novamente com o micrômetro 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a aplicação da carragenina e 1, 2, 3 e 4 h após a injeção com zimosan. Os edemas induzidos pelo composto 48/80 e histamina eram mensurados nos tempos de 30 minutos e 1h da aplicação desses agentes inflamatórios.

3.9 Peritonite induzida por zimosan

A inflamação peritoneal era induzida em camundongos *Swiss* pela injeção i.p de 500 µL de uma suspensão de zimosan em salina, na concentração de 2 mg/mL (DOHERTY et al., 1985; KOLACZKOWSKA et al., 2001). Os animais do grupo controle negativo recebiam a injeção 500 µL de salina no peritônio.

Os tratamentos eram realizados com a (*S*)-(+)-carvona ou (*R*)-(-)-carvona ou veículo (5 % de tween em água), por gavagem, 60 min antes da administração do zimosan.

Após 2 e 6 h da injeção de zimosan, os animais eram eutanaziados por overdose de anestésicos. Os peritônios dos animais eram expostos e 1 mL de PBS gelado, injetado na cavidade peritoneal. Cuidadosamente, o peritônio era massageado por 60 segundos e em seguida, realizado a punção do exudato contendo fluidos e leucócitos.

O exudato coletado era transferido para tubos tipo “eppendorf” e centrifugados a 1200 rpm, por 5 minutos a 4° C. Após, o sobrenante era coletado e armazenado a -20° C para posterior dosagem das citocinas TNF- α e IL-1 β .

As células presentes *pellet* eram diluídas em azul de Turk (0,01 % de cristal violeta em 3 % de ácido acético), na proporção de 1:40 e contadas em um hemocitômetro.

O efeito dos enantiômeros era avaliado pela comparação entre o número de células inflamatórias presentes no lavado peritoneal de animais tratados com as carvonas e a quantidade de células presentes no peritônio de camundongos que receberam apenas com o veículo.

3.10 Pleurisia alérgica induzida por OVA

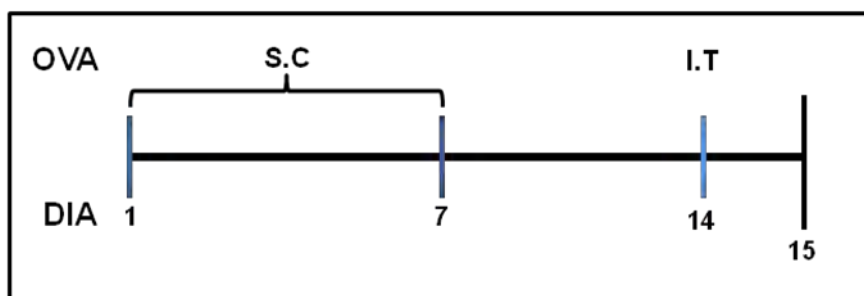
Para induzir migração de células para cavidade pleural, camundongos BALB/c eram sensibilizados com 0,2 mL de uma suspensão contendo 50 μ g de OVA grade V (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) e 5 mg de hidróxido de alumínio (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), dissolvidos em salina estéril e administrado por via subcutânea (s.c.) no primeiro e sétimo dia do protocolo experimental (BEZERRA-SANTOS et al, 2006) (Esquema 1). Essa suspensão era preparada pela dissolução de 1 mg de OVA grade V em 15 mL de solução salina. Posteriormente, 100 mg de Al(OH)₃ eram adicionados a solução de OVA e o volume final da suspensão formada era ajustado em 20 mL com o acréscimo de salina.

No 14° dia do protocolo experimental, 1 hora após o tratamento com veículo ou 10 mg/kg de (S)-(+)-ou (R)-(-)-carvona ou 0,1 mg/kg de dexametasona, os animais eram desafiados com uma injeção intratorácica (i.t.) de 0,1 mL de OVA grade V (12 μ g/cavidade) dissolvida em salina estéril.

Após 24 horas do desafio com OVA, procedia-se a eutanásia dos animais utilizando-se uma dose letal (0,4 mL) por via intramuscular de uma solução

anestésica composta de xilasina 0,2 % e quetamina 1,5 % para coleta do lavado pleural.

O lavado pleural era realizado injetando-se uma solução de HBSS⁻ livre de cálcio e magnésio (KCL 0.04%, KH₂PO₄ 0.06%, NaCl 0.8%, Na₂HPO₄ 0,048%, D-Glucose 0.1% - SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO-USA) com pH 7.2, gelado, na cavidade pleural. Depois de aspirado, o lavado pleural era utilizado para contagem total de células.



Esquema 1. Protocolo de pleurisia alérgica induzida por OVA. **OVA**: ovalbumina; **i.p.**: intraperitoneal; **i.t.**: intratorácica.

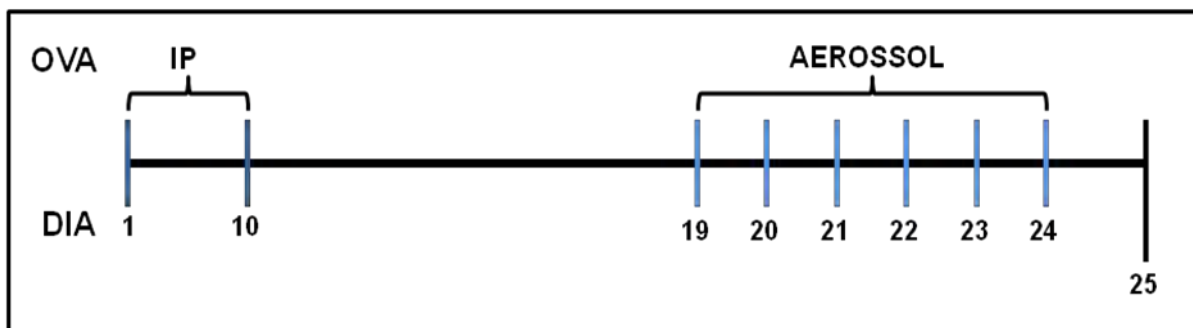
3.11 Modelo murino de hipersensibilidade imediata induzido por OVA

Para indução do modelo de hipersensibilidade imediata na vias aéreas era utilizado o protocolo descrito por Lloyd e colaboradores (2001). Nos dia 1 e 10 do protocolo experimental, camundongos BALB/c eram sensibilizados com a injeção de 200 µL (i.p.) de uma suspensão contendo 50 µg/mL de OVA grade V (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) e 10 mg/mL de Al(OH)₃ (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) em solução salina (Figura 2).

Essa suspensão era preparada pela dissolução de 1mg de OVA grade V em 15 mL de solução salina. Posteriormente, 200 mg de Al(OH)₃ eram adicionados a solução de OVA e o volume final da suspensão formada, era ajustado para 20 mL com o acréscimo de salina. A velocidade de sedimentação dessa suspensão é alta, portanto ela era cuidadosamente homogeneizada antes de cada injeção.

Entre os dias 19 e 24 após a primeira sensibilização, os animais eram desafiados com aerossol de OVA grade II (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) a 5 % em solução salina (Esquema 2). A suspensão utilizada no desafio era preparada triturando-se, com o auxílio de grau e pistilo, 2,5 mg de OVA grade II em um pequeno volume de salina, adicionada aos poucos. O volume final de 50 mL era

ajustado com solução salina. Os desafios eram realizados durante 20 minutos diários em uma câmara fechada, sob um fluxo contínuo de aerossol, com o auxílio de um nebulizador ultra-sônico (Inalador/ Nebulizador Ultra-Sônico 0003-soniclear).



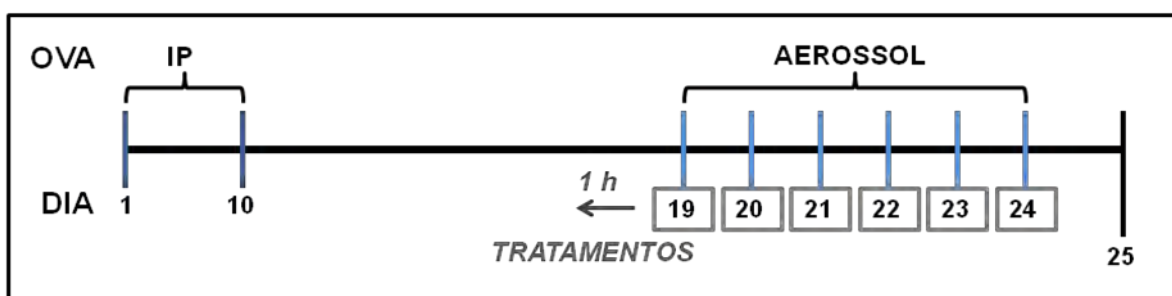
Esquema 2. Protocolo de inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA. **OVA:** ovalbumina; **i.p.:** intraperitoneal.

Os animais sensibilizados e desafiados com OVA eram divididos em grupos de acordo com os tratamentos:

- Grupo controle OVA: animais não tratados (receberam apenas veículo) – (v.o)
- Grupo (+)-carvona: animais tratados com (S)-(+)-carvona (10mg/mL) – (v.o)
- Grupo (-)-carvona: animais tratados com (R)-(-)-carvona (10mg/mL) – (v.o)
- Grupo dexametazona: animais tratados com dexametazona (0,1 mg/kg – 200 µL/ via subcutânea (s.c.))

Os animais do grupo controle salina eram sensibilizados e desafiados com solução salina e receberam apenas veículo como tratamento.

Exceto quando especificado, os tratamentos foram realizados 1 h antes de cada desafio nos experimentos conduzidos para avaliar a resposta dos animais frente a hipersensibilidade das vias aéreas induzida por OVA (modelo de asma alérgica experimental). Portanto, nesse caso, eram realizados seis tratamentos.



Esquema 3. Protocolo do tratamento realizado em modelo de inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA. **OVA:** ovalbumina; **i.p.:** intraperitoneal.

3.12 Coleta do Lavado Broncoalveolar (BAL)

Para avaliar o processo de hipersensibilidade imediata o BAL era coletado no 25º dia do protocolo experimental. Assim, os camundongos eram submetidos à eutanásia com uma dose letal (400 µL) por via intramuscular de uma solução anestésica composta de xilasina 0,2 % e quetamina 1,5 %. Era realizada à assepsia dos animais com álcool 70° e a traquéia, isolada com auxílio de pinça e tesoura. Para uma melhor visualização da traquéia, os lobos da glândula tireóide eram separados e uma cânula de poliestireno era introduzida na traquéia. Essa cânula foi conectada a uma seringa contendo inicialmente 1 ml de HBSS⁻ gelado, porém apenas 0,5 ml era injetado no pulmão do animal e aspirado todo o volume introduzido. Em seguida, sem retirar a cânula da traquéia, era injetado todo o conteúdo presente na seringa, para a realização de uma segunda lavagem e novamente, era aspirado todo o líquido contido no pulmão e transferido para tubos tipo eppendorf, acondicionados em gelo para que a viabilidade celular fosse mantida. Posteriormente, os tubos eppendorf eram centrifugados (centrífuga CR422, JONAM) a 1200 rpm, em uma temperatura de 4°C, por 5 minutos.

Os sobrenadantes eram separados das amostras e congelados em freezer a uma temperatura de -20°C para posterior dosagem de citocinas. As células presentes no *pellet* eram ressuspensas em 1mL de HBSS⁻ para contagem total e específica dos leucócitos.

3.13 Contagem Total e Diferencial de Células do BAL

A contagem do número total de células no BAL era realizada em câmara hemocitométrica. Inicialmente o BAL, devidamente homogeneizado, era diluído (1: 4) em solução de Turk (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), para facilitar a visualização das células. A leitura era realizada no microscópio óptico em objetiva de 40 X (Microscópio óptico; BX40, OLYMPUS).

Para contagem diferencial, a suspensão de células de cada lavado era ajustada com HBSS⁻ para 8×10^5 células/mL. Lâminas de microscopia (uma para cada lavado) eram devidamente identificadas e acopladas na citocentrífuga (citospin- FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). Da suspensão (8×10^5 células/mL) de cada lavado eram retirados 100µL e inseridos nos seus respectivos

orifícios, contidos no prisma do citospin e centrifugados por 15 minutos a 1500 rpm. As lâminas obtidas eram então fixadas em álcool metílico absoluto por 15 minutos utilizando cuba de Coplin. Em seguida, sem secar, as lâminas eram colocadas no corante de May-Grunwald (MERCK, São Paulo - SP) por 15 min e após ser retirado o excesso do corante sobre um papel de filtro, elas eram deixadas imersas no corante de Giemsa (MERCK, São Paulo - SP) por 30 minutos. Terminada a etapa de coloração, as lâminas eram lavadas em água corrente e secas em temperatura ambiente. A contagem diferencial de células era realizada por microscopia óptica (Microscópio óptico; BX40, OLYMPUS). Cada lâmina era percorrida até a contagem de 100 células, utilizando para isso a objetiva de imersão com aumento final de 1000X.

3.14 Coleta de pulmão para análise histológica

No intuito de avaliar as características histológicas do pulmão dos camundongos sensibilizados e desafiados de acordo com o protocolo de inflamação pulmonar alérgica induzida por OVA, o pulmão esquerdo dos animais era coletado 24 h após o último desafio.

Os camundongos eram eutanasiados por “overdose” de quetamina e xilasina (como descrito no item 3.12) e coletado o BAL. Em seguida, o tórax do animal era aberto com auxílio de pinça e tesoura e realizado a perfusão cardíaca com administração de 20 ml de salina no coração, no intuito de realizar uma lavagem do pulmão.

Para evitar a digestão do tecido por enzimas presentes no interior das células (autólise) ou por enzimas bacterianas, os cortes eram colocados em fixadores: formol 10% por 24 h e logo após em álcool etílico 70 % até o momento do corte histológico. Desta forma, a integridade do tecido tende a ser mantida, uma vez que os fixadores preservam a estrutura dos tecidos ao interagirem com os grupos aminos das proteínas, através de pontes de hidrogênio.

3.15 Preparo do corte histológico

Para a observação ao microscópio de luz a espessura da secção do tecido presente em uma lâmina deve ser delgada o suficiente para que possa ser

atravessado por um raio de luz. Para tal os tecidos foram criteriosamente preparados para receber um meio endurecedor, ou seja, meio de inclusão. Desta forma era possível a obtenção de cortes delgados, obtidos no processo de microtomia.

Os pulmões fixados como descrito no item 3.14 eram inicialmente desidratados por imersões de 1h em diferentes concentrações de álcool etílico (60, 70, 80, 90 e 100 %). O processo de desidratação é realizado porque a água presente nos tecidos não é miscível em substâncias apolares como a parafina e as resinas de inclusão, além disso, a graduação nas concentrações de álcool é imprescindível para que ocorra a desidratação homogênea dos tecidos, evitando danos na estrutura tecidual.

A inclusão em parafina era precedida pela imersão do material em tolueno por uma hora (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), este miscível tanto em álcool quanto em parafina.

Após a remoção do álcool, o tecido passava por uma infiltração em parafina líquida (parafina histológica- ERVIEGAS, São Paulo, SP), mantida nesse estado com o auxílio de estufa a 56°C – ponto de fusão (CR422, JONAM) e posteriormente, o tecido era transferido para o molde (forma histológica) contendo parafina líquida. Poucos minutos após ser colocada na forma, a parafina endurecia e obtia-se o "bloco" de parafina contendo o fragmento do tecido em seu interior. Os blocos de parafina assim formados, eram retirados das fôrmas e realizados cortes histológicos com espessura de 5 µm, com o auxílio de um micrótomo (SP Labor 300). Os cortes eram colocados em banho-maria (38 – 39°C), sendo retirados após, com lâminas preparadas com albumina. A secagem das lâminas era realizada em uma placa aquecedora (60°C) (Slide Warmer).

Com os cortes aderidos as lâminas, eram realizadas as colorações Hematoxilina-Eosina (HE) e Ácido Periódico – Schiff (PAS).

3.16 Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)

Os cortes de tecidos apresentam-se incolores após a microtomia. A coloração visa contrastar as estruturas teciduais. A ação da maioria dos corantes se baseia na interação entre os radicais ácidos ou básicos dos elementos químicos dos mesmos com os dos tecidos.

Para coloração, as lâminas eram inicialmente desparafinadas em xilol e em seguida, hidratadas sucessivamente em álcool absoluto, álcool 90 %, álcool 70 % e água destilada para então serem imersas em hematoxilina (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO-USA) por dois minutos. Com a finalidade de retirar o excesso de corante, as lâminas eram mergulhadas rapidamente em água destilada e depois em água acética e mantidas em 10 min em água de torneira. Posteriormente, eram colocadas no corante eosina (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO-USA), por 1 min, desidratadas com álcool absoluto e banhadas em xilol.

Após a coloração, as lâminas eram montadas, ou seja, os fragmentos eram protegidos pela cobertura com lamínulas de vidro. Esta era colada sobre lâmina pela substância selante resina Entellan (MERCK, Darmstadt-Germany). Após a secagem, as lâminas eram analisadas ao microscópio de luz.

Essa técnica proporcionava uma observação geral das estruturas dos tecidos porque é composta de dois corantes: hematoxilina, corante básico que cora componentes ácidos como os núcleos das células, e a eosina corante ácido que cora os componentes básicos como o citoplasma. Portanto, foram observados em azul escuro os núcleos, em rosa os citoplasmas e em vermelho as hemácias.

3.17 P.A.S. (ácido periódico – Schiff)

As lâminas eram inicialmente desparafinadas em xilol, hidratadas em álcool absoluto e água destilada e depois, colocadas no ácido periódico a 0,5 % por 5 minutos. Posteriormente, elas eram lavadas em água destilada, coradas com o reativo de Schiff (MERCK, Darmstadt-Germany) por dez minutos e recebiam 3 banhos sulfurosos. Após serem mergulhadas por dez minutos em água de torneira, as lâminas eram desidratadas com álcool absoluto e xilol.

A função do ácido periódico de Schiff é corar glicogênio e mucina intracelular. Portanto, ao observar as lâminas ao microscópio óptico, a coloração vermelha indicava a presença de glicogênio (ou polissacarídeos neutros) e da glicoproteína mucina (principal constituinte do muco). Os núcleos e os citoplasmas eram observados com coloração rosa claro.

3.18 Coleta de sangue do plexo venoso oftálmico e preparação do soro

Para avaliar a produção de IgE nos camundongos sensibilizados e desafiados com OVA, tratados ou não com as substâncias teste, o sangue periférico dos animais no 25º dia do protocolo experimental era coletado. Antes da realização da coleta, os camundongos recebiam uma dose anestésica (50 µL) de uma solução contendo xilasina 0,2 % e quetamina 1,5 % por via intramuscular. A amostra do sangue do plexo oftálmico de cada animal era coletada com o auxílio de uma pipeta tipo *pauster* de vidro e um pequeno pipetador de borracha. Posteriormente, as amostras eram transferidas para tubos tipo eppendorfs, estes eram mantidos inclinados a 45º e estocados a 4°C por 24 h para facilitar a retração do coágulo. O soro era obtido após a centrifugação das amostras de sangue a 3000 rpm e 17°C por 10 min. Em seguida, as amostras dos soros eram transferidas para novos tubos devidamente etiquetados e armazenadas a -20 °C.

3.19 Teste de anafilaxia cutânea passiva – PCA

O título de IgE-OVA-específica era determinado pelo teste de anafilaxia cutânea passiva. As amostras de soros dos camundongos obtidas como no item 3.18 eram descongeladas e diluídas em salina. Para cada amostra eram realizadas oito diluições seriadas (1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 e 1:1024) e um volume de 50 µL dessas amostras diluídas eram injetadas por via intradérmica (i.d.) em oito diferentes sítios do dorso de ratas Wistar previamente anestesiadas com tiopental (45 mg/kg) por via i.p. e depiladas.

Como a região intradérmica é rica em mastócitos, caso a IgE esteja presente nas amostras diluídas do soro dos camundongos, essa imunoglobulina se ligará a receptores presentes na superfície dos mastócitos das ratas, sensibilizando-os.

Após 48 horas, as caudas das ratas eram lavadas com água e sabão para realização do desafio antigênico. O desafio era realizado pela administração de 500µL de uma solução contendo o corante Azul de Evans (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) 1 % e 2,0 mg de OVA grade V na veia caudal. Após 30 min., os animais eram sacrificados por deslocamento cervical e os diâmetros das manchas formadas no dorso eram medidas com o auxílio de uma régua. O título era determinado pela

maior diluição do soro capaz de promover mancha mensurável ≥ 5 mm (HOLT et al., 1981), medida com o auxílio de uma régua de 20 cm.

A mancha no dorso dos animais é formada quando há mastócitos sensibilizados com IgE específica para OVA, pois nesse teste, após o desafio, a OVA é distribuída pela circulação do animal se ligando a regiões que contêm a IgE específica, correspondendo àquelas onde as amostras de soro foram injetadas. Essa ligação promove a desgranulação de mastócitos, com a liberação de substâncias que promovem aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos (como a histamina) e, portanto, o azul de Evans extravasa para o tecido, formando as manchas no dorso do animal.

3.20 Quantificação das citocinas IFN- γ , IL-13 e IL-10 no BAL e de TNF- α e IL-1 β no lavado peritoneal

As citocinas IFN- γ , IL-13 e IL-10 presentes no BAL de camundongos sensibilizados e desafiados e as citocinas TNF- α e IL-1 β do lavado peritoneal foram quantificadas por ELISA, de acordo com o protocolo especificado no *Kit* do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

Placas de ELISA (NUNC-Immuno™) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-IFN- γ , anti-IL-13, anti-IL-10, anti-TNF- α e anti-IL-1 β diluídos em tampão fosfato pH 6.5 (1:1000, 1:250, 1:250, 1:1000, e 1:1000, respectivamente) e incubadas por 18 h a 4°C.

Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de tween 20 (PBST) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO-USA) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10 % de SFB), por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e foram adicionadas tanto as amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações das citocinas recombinantes IFN- γ (2000 pg/mL a 15,1 pg/mL), IL-13 (500 pg/mL a 3,78 pg/mL), IL-10 (4000 pg/mL a 31,25 pg/mL), IL-1 β e TNF- α (1000 pg/mL a 7,55 pg/mL) para a realização da curva. As placas foram novamente incubadas por 18 horas a 4°C.

Terminada a incubação, as placas foram lavadas e o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotinilado foi adicionado às placas e incubadas por uma hora. Posteriormente, foram novamente lavadas e o complexo enzimático avidina-peroxidase (*avidin-HRP*) foi adicionada. As placas foram incubadas por mais

meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1N e a leitura realizada em leitor de placa (MICROPLATE READER versa Max, tunable, BN 2529 Molecular Devices) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão.

3.21 Análise estatística

Os resultados do presente trabalho foram expressos como média \pm SEM e representam pelo menos dois experimentos independentes. Os resultados foram analisados pelo método de Análise de Variância (ANOVA) não paramétrico com pós-teste de *Tukey*. Para todas as análises foi utilizado o programa GrafPad Prism versão 4.0 e valores com $P < 0,05$, considerados significantes (GraphPad Software Inc., San Diego, U.S.A.).

Resultados

4. Resultados

4.1 Efeito dos enantiômeros da carvona na produção de NO em cultura de células J774 A.1

O NO é um importante mediador do processo inflamatório e, uma maneira de avaliar se a (S)-(+)- e a (R)-(-)-carvona apresentam potencial antiinflamatório é determinar a concentração de nitrito em culturas de macrófagos J774 A.1 na presença de diferentes concentrações desses monoterpenos.

O tratamento com (S)-(+)- ou (R)-(-)-carvona, em todas as concentrações testadas, reduziu de forma significativa a concentração de nitrito presente no sobrenante de cultura de células estimuladas, quando comparada a concentração presente na cultura de macrófagos apenas estimulados (Gráfico 1).

O percentual de inibição obtida pelas concentrações de 1, 3, 10, 50 e 100 µg/mL dos enantiômeros foi respectivamente, de 22,5 %, 20,29 %, 33,36 %, 42,58 % e 41,97 % para a (S)-(+)-carvona e de 26,04 %, 19,30 %, 38,01 %, 35,90 % e 52,10 % para a (R)-(-)-carvona. Embora a (R)-(-)-carvona pareça ter promovido uma maior inibição, ela não foi significativamente diferente de seu isômero.

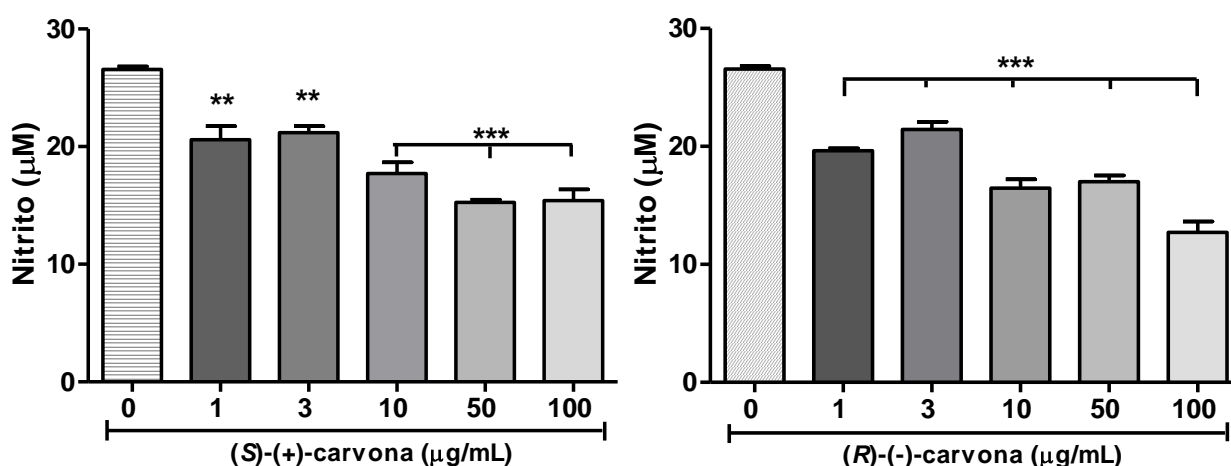


Gráfico 1. Efeito da (S)(+)- e da (R)(-)-carvona sobre a produção de nitrito por células da linhagem J774 A.1. Células J774 A.1 foram cultivadas por 48 horas em meio RPMI completo na presença de estímulos (9 ng/mL de IFN- γ e 10 µg/mL de LPS) e de diferentes concentrações dos enantiômeros da carvona. A produção de NO foi determinada pelo método de Griess. Os dados são expressos como média \pm erro padrão. A análise estatística foi realizada com o teste ANOVA *one-way* e pós teste de *turkey's* e ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados significativos quando comparados ao grupo de células estimulas e não tratadas (0 µg/mL).

4.2 Efeito dos enantiômeros da carvona na viabilidade de células J774 A.1

O ensaio do MTT foi realizado para verificar se a diminuição na produção de nitrito e, portanto de NO, verificada em função dos enantiômeros da carvona, foi resultante da morte das células em cultura.

Não houve redução na viabilidade das células cultivadas na presença das diferentes concentrações dos enantiômeros, quando comparadas aquelas cultivadas apenas em meio de cultura RPMI ou de RPMI acrescido do DMSO (Figura 2).

Considerando como 100 % a viabilidade as células não tratadas (meio + DMSO), a viabilidade quando cultivadas com 1, 3, 10, 50 ou 100 µg/mL de (S)-(+)-carvona foi de 137,5 %, 96,68 %, 105,26 %, 92,5 % e 92,5 %, respectivamente e de (R)-(-)-carvona foi de 136,6 %, 119,94 %, 118,84 %, 143,49 % e 133,79 %, respectivamente. Os resultados indicam ainda, uma possível proliferação das células tratadas com os enantiômeros, quando comparadas as células não tratadas

Portanto, a ação dos enantiômeros em diminuir a produção de NO na cultura de células J774 não é resultante de citotoxicidade.

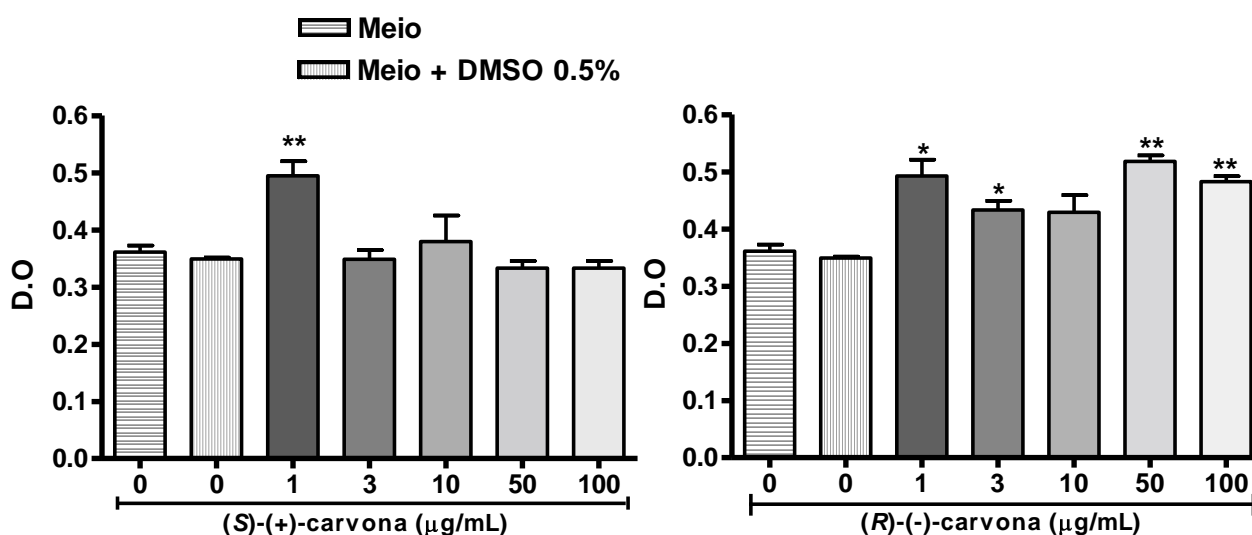


Gráfico 2. Efeito dos enantiômeros da carvona sobre a viabilidade de macrófagos J774 A.1. As células foram mantidas em cultura por 48h na presença ou ausência de diferentes concentrações dos enantiômeros da carvona. A viabilidade foi analisada pelo ensaio do MTT. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão e foram analisados usando o teste ANOVA *one-way* e pós teste de *turkey's*. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ foram considerados significantes, quando comparados ao grupo de células não tratadas (meio + DMSO).

4.3 Efeito dos enantiômeros da carvona na formação do edema de pata induzido por carragenina em camundongos

Uma vez que os enantiômeros da carvona reduziram a produção de NO *in vitro*, foram realizados estudos *in vivo* para investigar uma possível atividade anti-inflamatória. Para tanto foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina (agente flogístico derivado de algas), que é amplamente utilizado para testar novos medicamentos anti-inflamatórios, bem como, para estudar os mecanismos envolvidos no processo inflamatório (POSADAS et al., 2004).

O gráfico 3 demonstra que ambos monoterpenos, foram capazes de inibir até a terceira hora, a formação do edema de pata induzido por carragenina, quando comparados aos animais que receberam o veículo (grupo carragenina). Essa redução na primeira, segunda e terceira hora foi respectivamente de 51,64 %, 42,87 % e 23,35 % para a (S)-(+)-carvona e de 24,53 %, 31,70 % e 20 % para a (R)-(-)-carvona.

Entretanto, apenas o tratamento com (S)-(+)-carvona demonstrou redução significativa na quarta hora após a indução do edema, quando comparado ao grupo carragenina (22,58 %). Em adição, na primeira hora de observação, a administração da (S)-(+)-carvona resultou em maior inibição do edema que a administração da (R)-(-)-carvona ($p < 0.05$).

Na quinta e sexta horas de observação, nenhum dos monoterpenos foi capaz de reduzir o edema de pata, quando comparados ao grupo carragenina. Adicionalmente, a dexametasona, um conhecido antiinflamatório esteroidal, reduziu o edema induzido pela carragenina em todos os tempos de observação.

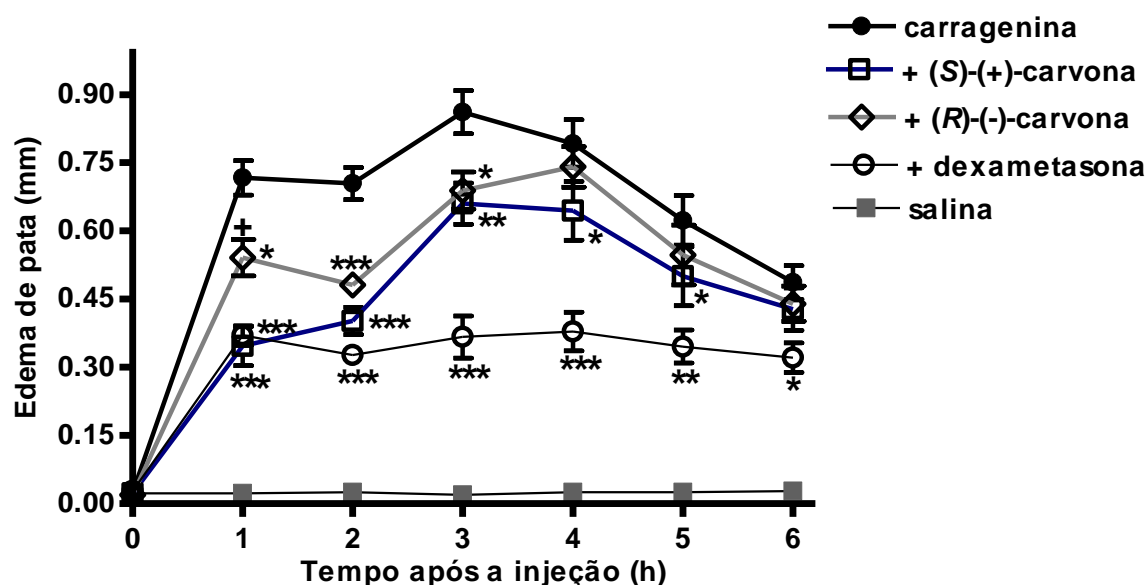


Gráfico 3. Efeito do tratamento com (S)-(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre o edema de pata induzido por carragenina Camundongos Swiss foram tratados com 10 mg/kg de (S)-(+)-carvona ou (R)-(-)-carvona (por gavagem) ou 0,5 mg/kg de dexametasona (s.c). Os animais dos grupos salina e carragenina (controles do modelo experimental) foram tratados com veículo (tween 5%). Após 1 h, ou 30 min, receberam injeção intraplantar de carragenina (2,5%) na pata direita e salina na pata esquerda. O grupo controle salina recebeu injeção de salina em ambas as patas. O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura das patas direita e esquerda, medida com um micrômetro digital, antes e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a injeção intraplantar. Os pontos representam a média de 5 animais e as barras verticais o E.P.M. Diferenças entre grupos experimentais foram analisadas por ANOVA e comparações individuais foram realizadas com pós teste de Tukey's. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle carragenina e * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$, considerado significativo. Ainda, os grupos (S)-(+)- e (R)-(-)-carvona foram comparados e + $P < 0.5$, considerado significativo.

4.4 Efeito dos enantiômeros da carvona na formação do edema de pata induzido por zimosan em camundongos

O zimosan, uma fração insolúvel obtida de leveduras, é um clássico ativador da via alternativa do sistema complemento, além de estar relacionado à liberação e/ou ativação de diferentes mediadores inflamatórios. Da mesma forma que a carragenina, a formação do edema e a migração induzidas por esse produto são muito utilizadas para triagem de substâncias anti-inflamatórias (DUDHGAONKAR et al., 2006)..

O tratamento com ambos enantiômeros inibiram a formação do edema de pata até a terceira hora de observação, quando comparado aos animais do grupo zimosan (Gráfico 4). Essa inibição na primeira, segunda e terceira horas foi respectivamente de 48,35%, 35,30% e 27,89% para a (S)-(+)-carvona e de 31,44%, 24,01% e 16,67% para a (R)-(-)-carvona. Entretanto, a (S)-(+)-carvona foi capaz de inibir até a quarta hora após a indução do edema (18,67%). Esse resultado foi semelhante ao observado no edema de pata induzido por carragenina.

O tratamento com a dexametazona mostrou-se eficaz em inibir a formação do edema de pata induzido por zimosan, se comparado ao grupo não tratado, em todos os tempos observados.

Vários mediadores inflamatórios são liberados e formados a partir da administração da carragenina e do zimosan. Nas primeiras horas são liberadas principalmente substância P, histamina e serotonina, seguida pela produção de NO e posteriormente, de prostaglandinas e outros mediadores (POSADAS et al., 2004).

Ambos enantiômeros inibiram o edema produzido por carragenina ou zimosan principalmente nas primeiras horas após a indução do processo, indicando uma possível participação desses monoterpenos nos mecanismos envolvidos com a liberação e/ou ação da histamina e serotonina.

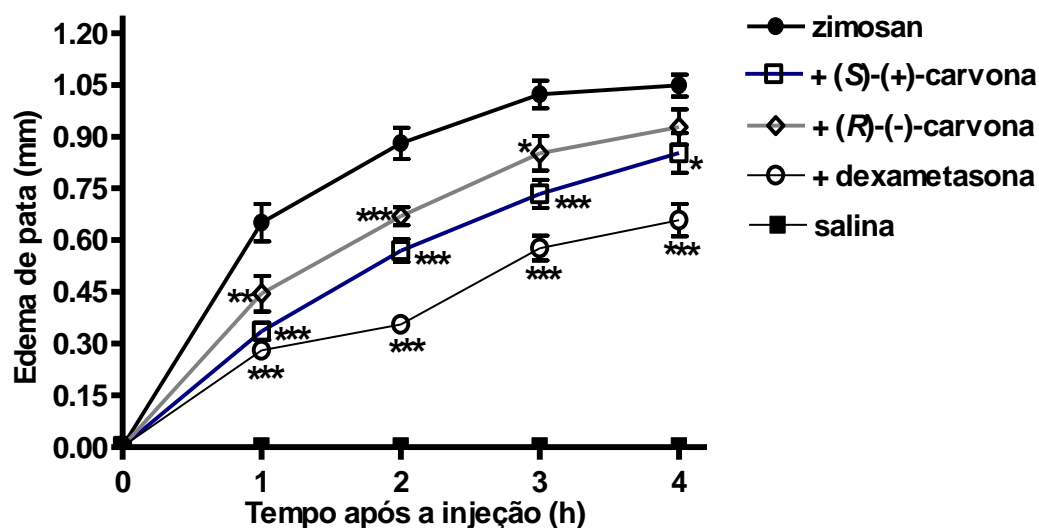


Gráfico 4. Efeito do tratamento com a (S)-(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre o edema de pata induzido por zimosan. Camundongos Swiss foram tratados com 10 mg/kg de (S)-(+)-carvona ou (R)-(-)-carvona (por gavagem) ou 0,5 mg/kg de dexametasona (s.c). Os animais dos grupos salina e zimosan (controles do modelo experimental) foram tratados com veículo (tween 5%). Após 1 h, ou 30 min, receberam injeção intraplantar de zimosan (1%) na pata direita e salina na pata esquerda. O grupo controle salina recebeu injeção de salina em ambas as patas. O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura das patas direita e esquerda, medida com um micrômetro digital, antes e 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção intraplantar. Os pontos representam a média de 5 animais e as barras verticais o E.P.M. Diferenças entre grupos experimentais foram analisadas por ANOVA e comparações individuais foram realizadas com pós teste de Tukey's. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle zimosan e * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$, considerado significativo.

4.5 Efeito dos enantiômeros da carvona na formação do edema de pata induzido pelo composto 48/80 em camundongos

Para avaliar se a inibição produzida pelos monoterpenos no edema de pata induzido por carragenina ou zimosan, pode ser atribuída, em parte, à inibição da ação ou liberação de estoques de aminas vasoativas foi realizada a indução do edema de pata com um conhecido degranulador farmacológico de mastócitos: o composto 48/80.

Tanto a (S)-(+)-carvona quanto a (R)-(-)-carvona foram capazes de inibir o edema de pata induzido pelo composto 48/80, quando comparado ao grupo zimosan. Essa inibição, verificada apenas 30 minutos após a indução do edema, foi de 28% para a (S)-(+)-carvona e de 11,4% para a (R)-(-)-carvona. A inibição resultante do tratamento com (S)-(+)-carvona foi significante maior que aquela observada com a (R)-(-)-carvona ($p < 0.01$) (Gráfico 5).

Mastócitos são células teciduais que apresentam um grande reservatório de aminas vasoativas em seus grânulos. Essas células, quando ativadas, são capazes de degranular e liberar esses mediadores, representados em um primeiro momento principalmente por histamina e serotonina (TATEMOTO et al., 2006). Portanto, o fato do tratamento com os enantiômeros da carvona terem inibido o edema formado por um degranulador de mastócitos, indica que essas substâncias podem estar impedindo tal degranulação e/ou inibindo a ação da histamina e/ou serotonina liberadas.

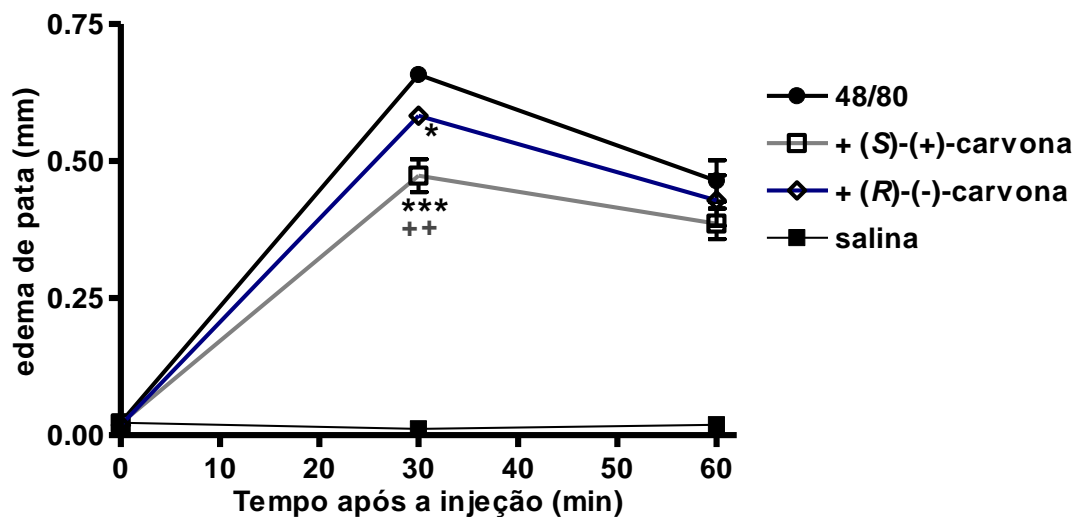


Gráfico 5. Efeito do tratamento com (S)-(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre o edema de pata induzido pelo composto 48/80. Camundongos Swiss foram tratados com 10 mg/kg de (S)-(+)-carvona ou (R)-(-)-carvona (por gavagem). Os animais dos grupos salina e composto 48/80 (controles do modelo experimental) foram tratados com veículo (tween 5 %). Após 1 h, receberam injeção intraplantar do composto 48/80 (0.0005 %) na pata direita e salina na pata esquerda. O grupo controle salina recebeu injeção de salina em ambas as patas. O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura das patas direita e esquerda, medida com um micrômetro digital, antes e 30 e 60 min após a injeção intraplantar. Os pontos representam a média de 5 animais e as barras verticais o E.P.M. Diferenças entre grupos experimentais foram analisadas por ANOVA e comparações individuais foram realizadas com pós teste de Tukey's. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle composto 48/80 e *P < 0.05, **P < 0.01 e ***P < 0.001, considerado significativo. Ainda, os grupos (S)-(+)- e (R)-(-)-carvona foram comparados e **P < 0.01, considerado significativo.

4.6 Efeito dos enantiômeros da carvona na formação do edema de pata induzido por histamina em camundongos

A histamina foi introduzida diretamente na pata de camundongos Swiss e o edema, desencadeado pela ação direta desse mediador, foi avaliado frente ao tratamento prévio com os enantiômeros da carvona.

Ambos os monoterpênos foram capazes de inibir o edema de pata desencadeado por histamina quando comparado ao edema formado pela histamina na ausência de tratamento (grupo histamina) (Gráfico 6). Essa inibição, verificada 30 e 60 minutos após indução do edema, foi respectivamente de 26,06% e 36,24% para a (S)-(+)-carvona e de 19,6% e 29,18% para a (R)-(-)-carvona.

Assim, o efeito anti-edematogênico verificado, pode ser em parte atribuído à inibição da ação da histamina pelos enantiômeros da carvona.

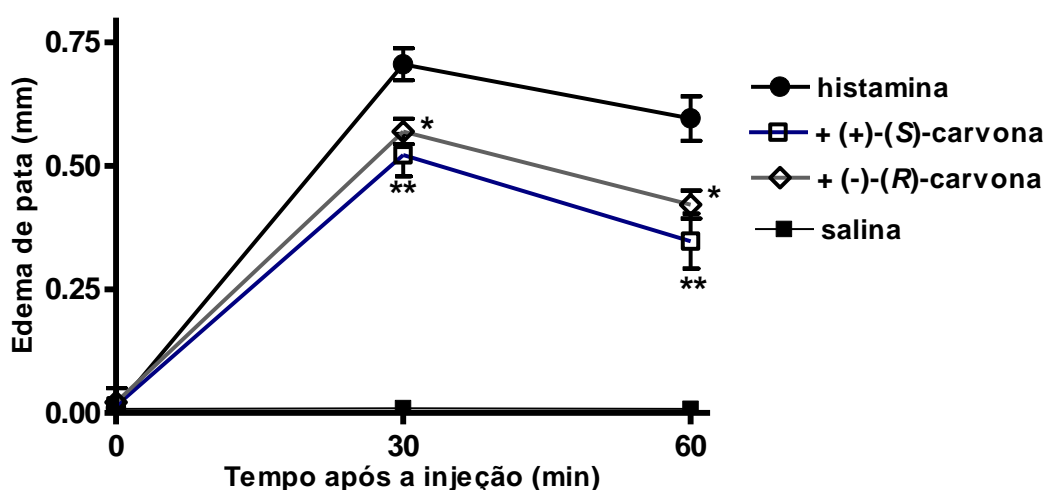


Gráfico 6. Efeito do tratamento com a (S)-(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre o edema de pata induzido por histamina. Camundongos Swiss foram tratados com 10 mg/kg de (S)-(+)-carvona ou (R)-(-)-carvona (por gavagem). Os animais dos grupos salina e histamina (controles do modelo experimental) foram tratados com veículo (tween 5 %). Após 1 h, receberam injeção intraplantar do histamina (0.0002 %) na pata direita e salina na pata esquerda. O grupo controle salina recebeu injeção de salina em ambas as patas. O efeito anti-edematogênico foi avaliado pela diferença entre a espessura das patas direita e esquerda, medida com um micrômetro digital, antes e 30 e 60 min após a injeção intraplantar. Os pontos representam a média de 5 animais e as barras verticais o E.P.M. Diferenças entre grupos experimentais foram analisadas por ANOVA e comparações individuais foram realizadas com pós teste de Tukey's. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle composto 48/80 e *P < 0.05, **P < 0.01 e ***P < 0.001, considerado significativo.

4.7 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre o influxo de células em modelo de peritonite induzida por zimosan

Além da atividade anti-edematogênica dos enantiômeros da carvona, foi também avaliada a capacidade desses monoterpenos de interferir no influxo de leucócitos para o sítio da inflamação em modelo de peritonite induzida por zimosan.

O tratamento com ambos monoterpenos promoveu a inibição do influxo de células para a cavidade peritoneal nos tempos de 2 e 6 horas após a injeção de zimosan, quando comparada ao grupo controle zimosan (Gráfico 7). A proporção de inibição da (S)-(+)-carvona foi de 74 % na segunda hora e 44 % na sexta hora e da (R)-(-)- foi de 57 % e de 45 %, nos respectivos tempos.

Portanto, parte da atividade anti-inflamatória da carvona pode ser atribuída a redução do influxo de células inflamatórias.

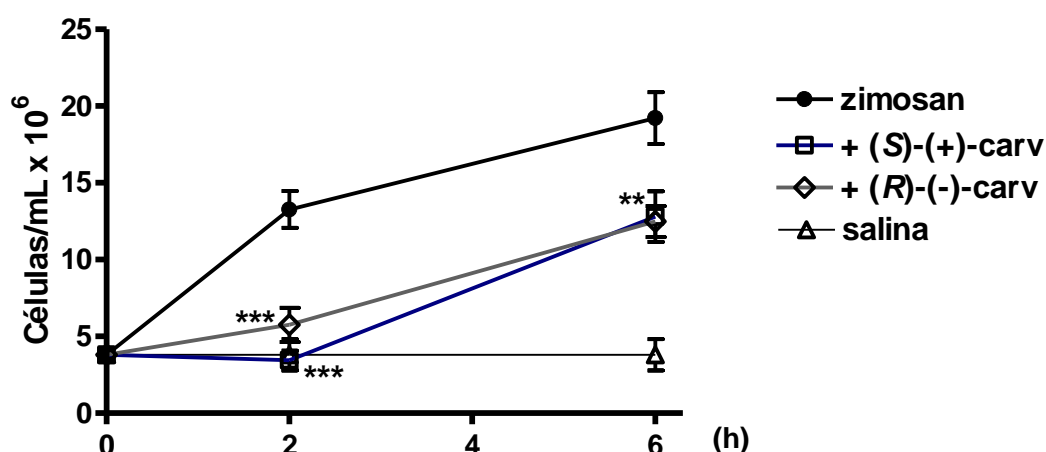


Gráfico 7. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre a celularidade do lavado peritoneal em modelo de peritonite induzido por zimosan. Camundongos Swiss foram tratados com 10 mg/kg de (S)-(+)-carvona ou (R)-(-)-carvona (por gavagem). Os animais dos grupos salina e zimosan (controles do modelo experimental) foram tratados com veículo (tween 5 %). Após 1 h, receberam injeção i.p de zimosan (2 mg/mL) e 2 e 6 h após a injeção com zimosan, o exsudato do peritônio foi coletado e as células contadas. Os pontos representam a média da concentração de células de 6 animais e as barras verticais o E.P.M. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA, seguida de pós teste de Tukey's. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle zimosan e **P < 0.01, ***P < 0.001, considerado significativo.

4.8 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre os níveis das citocinas TNF- α e IL1- β em modelo de peritonite induzido por zimosan

Vários mediadores estão direta ou indiretamente envolvidos no influxo de células durante o processo inflamatório. As citocinas TNF- α e IL-1- β , estão relacionadas ao recrutamento e sobrevivência de neutrófilos no foco inflamatório. (KOLACZKOWSKA et. al., 2010). Portanto, os níveis dessas citocinas foram avaliados para verificar se a redução do influxo de células em função do tratamento com os enantiômeros resulta da modulação dessas citocinas.

Apenas o tratamento com a (*R*)-(-)-carvona reduziu significativamente os níveis de TNF- γ no lavado peritoneal, quando comparado ao grupo controle zimosan. Adicionalmente, não foi verificada diferença significativa nos níveis de IL1- β exibidos por ambos monoterpenos, quando comparados ao grupo controle zimosan (Gráfico 8).

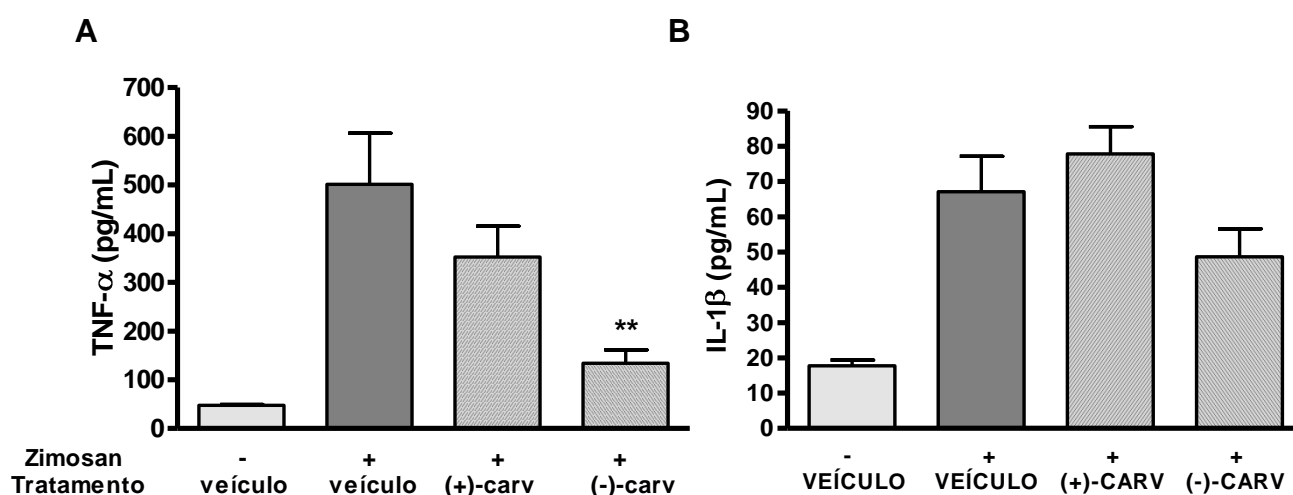


Gráfico 8. Efeito do tratamento com (*S*)(+)- ou (*R*)-(-)-carvona sobre os níveis das citocinas TNF- α e IL1- β no lavado peritoneal em modelo de peritonite induzido por zimosan. Camundongos Swiss foram tratados com 10 mg/kg de (*S*)-(+)-carvona ou (*R*)-(-)-carvona (por gavagem). Os animais dos grupos salina e zimosan (controles do modelo experimental) foram tratados com veículo (tween 5 %). Após 1 h, receberam injeção i.p de zimosan (2 mg/mL) e 2 h após a injeção com zimosan, o exsudato do peritônio foi coletado e centrifugado. Os níveis das citocinas TNF- α (A) e IL-1 β (B) foram mensurados no sobrenadante do exudato por ELISA. As barras representam a média dos níveis de citocinas de 6 animais \pm E.P.M. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA, seguida de pós teste de *Tukey's*. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle zimosan e ** $P < 0.01$, considerado significativo.

4.9 Efeito dos enantiômeros da carvona no modelo de pleurisia induzida por ovalbumina

Para avaliar se os enantiômeros da carvona também apresentam atividade na inflamação alérgica, foi utilizado o modelo de pleurisia induzida por ovalbumina (OVA) em camundongos BALB/c.

Camundongos sensibilizados e desafiados com OVA e tratados tanto com a (S)-(+)-carvona quanto com a (R)-(-)-carvona apresentaram redução significativa na quantidade de células presentes na cavidade pleural, quando comparados aos animais também sensibilizados e desafiados com OVA, porém tratados apenas com o veículo (Gráfico 9).

Essa redução foi de 57,92 % no grupo tratado com (S)-(+)-carvona e de 35,36 % nos animais que receberam (R)-(-)-carvona.

Além disso, o tratamento com (S)-(+)-carvona resultou em maior redução na quantidade de células quando comparada ao seu enantiômero ($p < 0.001$).

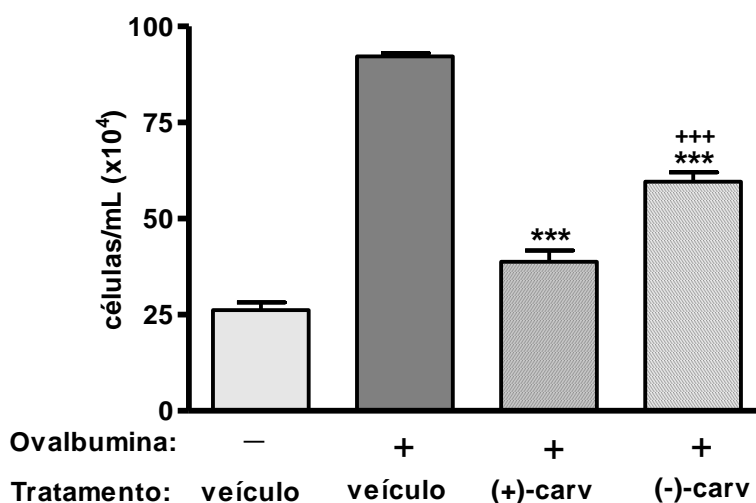


Gráfico 9. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)(-)-carvona sobre a celularidade do lavado pleural em modelo de pleurisia induzido por OVA. Camundongos BALB/c ($n=5$) foram sensibilizados (dias 1 e 7) e desafiados (dia 14) com ovalbumina. Os animais foram tratados com 10 mg/kg de (S)-(+)-carvona ou (R)-(-)-carvona ou com veículo (grupo controle salina e OVA), 1 hora antes do desafio. O número de células presentes no lavado pleural foi contado 24 horas após o desafio e os dados são expressos como média \pm erro padrão. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA, seguida de pós teste de Tukey's. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle ovalbumina (ovalbumina:+, tratamento: veículo) e $***p < 0.001$, considerado significativo. Ainda, os grupos (S)-(+)- e (R)-(-)-carvona foram comparados e $***P < 0.001$, considerado significativo.

4.10 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre a celularidade do BAL em modelo de asma experimental

Uma vez que foi verificada redução da quantidade de leucócitos presentes na cavidade pleural no modelo de pleurisia alérgica, outro modelo de inflamação alérgica foi utilizado (modelo de asma experimental).

A migração de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar (BAL) é uma importante característica da asma alérgica e o tratamento com ambos enantiômeros 1 hora antes de cada desafio promoveu redução do número de células presentes do BAL, quando comparado ao controle OVA (Gráfico 10 A). A proporção de redução foi de 40,6% para a (S)-(+)-carvona e 33,17% para a (R)-(-)-carvona.

Adicionalmente, o tratamento com dexametasona também inibiu a quantidade de células no BAL, quando comparado ao grupo controle OVA (56,27% de redução).

A asma alérgica é caracterizada por um intenso influxo de eosinófilos no BAL (CORRY et al., 2003), portanto foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos para verificar se os tratamentos com os enantiômeros da carvona influenciam nesse parâmetro da hipersensibilidade.

O tratamento com ambos enantiômeros resultou na diminuição da proporção de eosinófilos presentes no BAL, quando comparado ao grupo controle OVA. O tratamento com dexametasona também foi capaz de reduzir esse parâmetro, se comparada ao controle (gráfico 10 B).

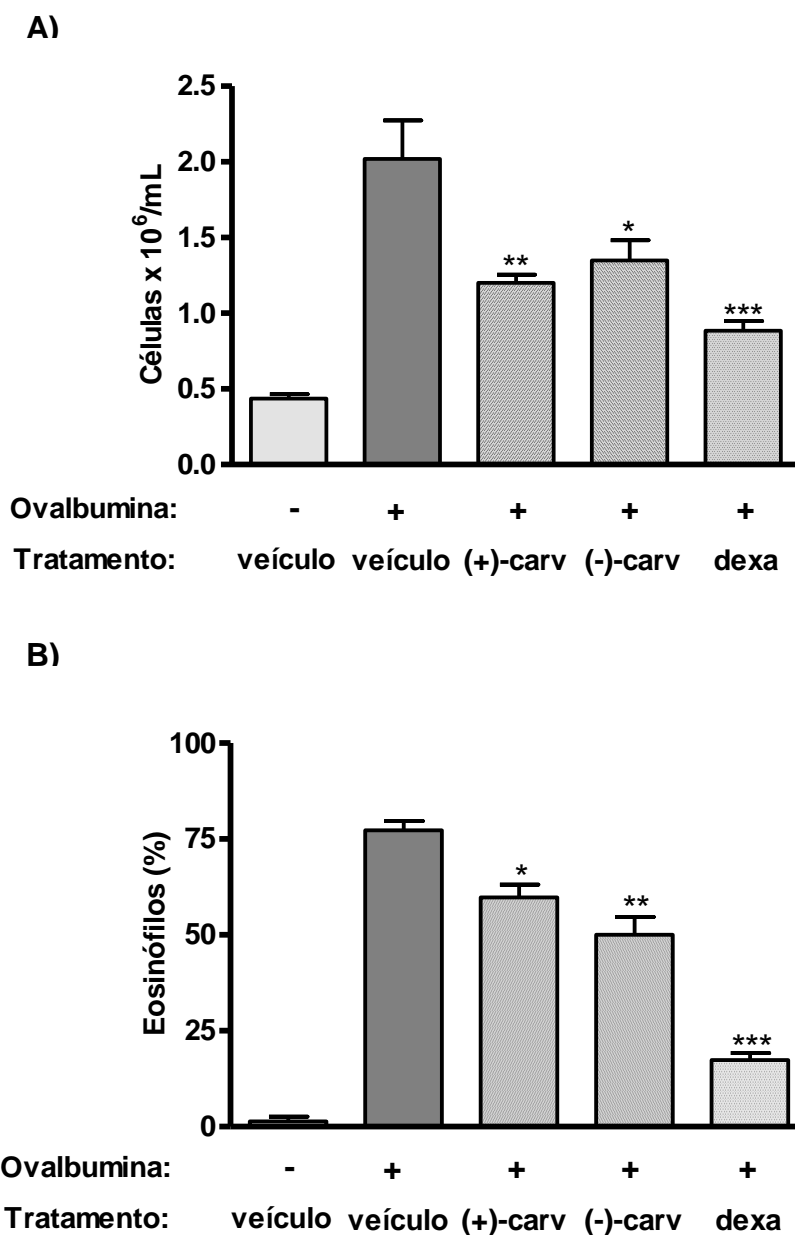


Gráfico 10. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre a concentração de leucócitos e proporção de eosinófilos no BAL em modelo de asma alérgica experimental. Camundongos BALB/c (n=5) foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina e tratados com 10 mg/kg de (S)-(+)-carvona ou (R)-(-)-carvona, com 0,1 mg/kg de dexametasona, ou ainda veículo, 1 hora antes dos desafios. O número de leucócitos totais **(A)** e eosinófilos **(B)** presentes no BAL foi analisado 24 horas após o último desafio com OVA. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA, seguida de pós teste de *Tukey's*. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle (ovalbumina:+, tratamento: veículo) e * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$ considerado significativo.

4.11 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre o influxo de células mononucleares e neutrófilos no BAL em modelo de asma experimental

Os tratamentos com (*R*)-(-)-carvona ou dexametasona resultaram no aumento da proporção de células mononucleares no BAL dos camundongos sensibilizados e desafiados com OVA, comparado ao grupo não tratado, sendo que o mesmo não foi observado com o outro enantiômero (Figura 11 a).

Entretanto, não foi observada diferença na proporção de neutrófilos presentes no BAL entre os grupos tratados (com enantiômeros da carvona ou dexametasona) e não tratado (Figura 11 b).

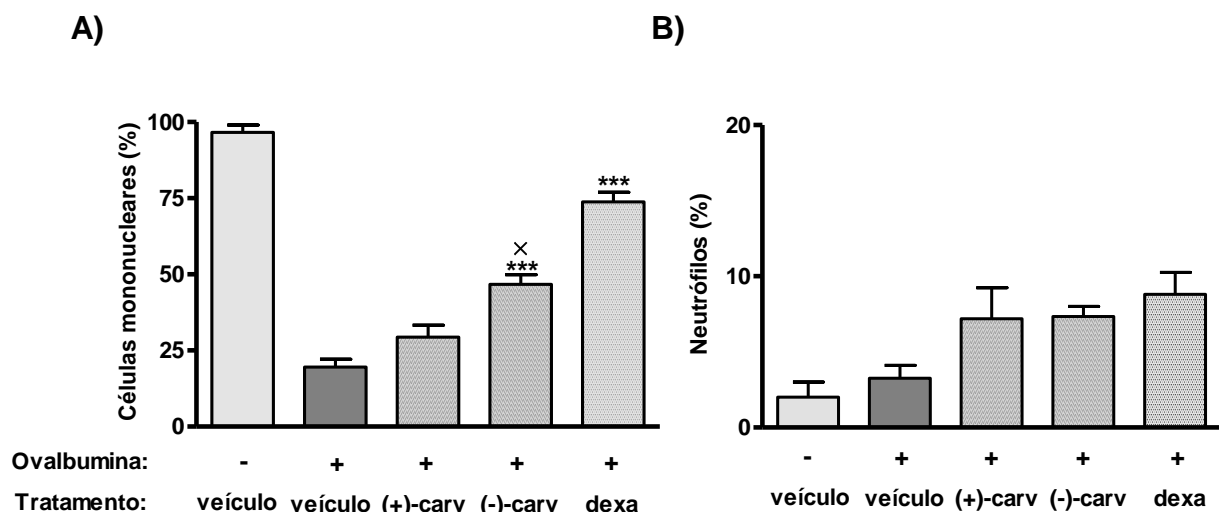


Gráfico 11. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre a proporção de células mononucleares e neutrófilos no BAL em modelo de asma alérgica experimental. Camundongos BALB/c (n=5) foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina e tratados com 10 mg/kg de (S)-(+)-carvona ou (R)-(-)-carvona, 0,1 mg/kg de dexametasona ou veículo, 1 hora antes do desafio. A proporção de células mononucleares **(A)** e neutrófilos **(B)** presentes no BAL foram analisadas 24 horas após o último desafio com OVA. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA, seguida de pós teste de *Tukey's*. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle (ovalbumina:+, tratamento: veículo) e * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, considerado significativo. Ainda, os grupos (S)-(+)- e (R)-(-)-carvona foram comparados e ^x $P < 0.05$, considerado significativo.

4.12 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre o infiltrado de células no pulmão em modelo de asma experimental

Como foi observada diminuição significativa do número de leucócitos presentes no BAL em resposta aos tratamentos com ambos monoterpenos, o pulmão foi analisado para verificar se essa redução se refletiu no infiltrado de células no tecido pulmonar.

A coloração por hematoxilina-eosina permite avaliar a presença de células inflamatórias no pulmão. Para uma análise panorâmica do corte histológico e caracterização do tipo de processo inflamatório instalado, os cortes foram analisados com aumento de 20x.

O pulmão dos animais não sensibilizados e desafiados (grupo controle salina) apresentou parênquima bem conservado e não foi observada a presença de infiltrado de leucócitos nas regiões perivasculares e perialveolares (Figura 2 A). Já no grupo de animais sensibilizados e desafiados com OVA (grupo controle OVA) observou-se um intenso infiltrado de células situado nas regiões peribronquiolar e perivascular e ausência de infiltrado nos alvéolos pulmonares, demonstrando a instalação de processo inflamatório pulmonar característico da asma (Figura 2 B).

O tratamento com (*R*)-(-)-carvona inibiu representativamente o infiltrado de células presentes no pulmão, quando comparado ao grupo controle OVA (Figura 2 D), o mesmo foi observado no pulmão dos animais tratados com dexametasona (Figura 2 E). Entretanto, embora o tratamento com (*S*)-(+)-carvona tenha resultado em diminuição de células no BAL, este não foi capaz de impedir o infiltrado de leucócitos no pulmão de camundongos quando comparado ao controle OVA (Figura 2 C).

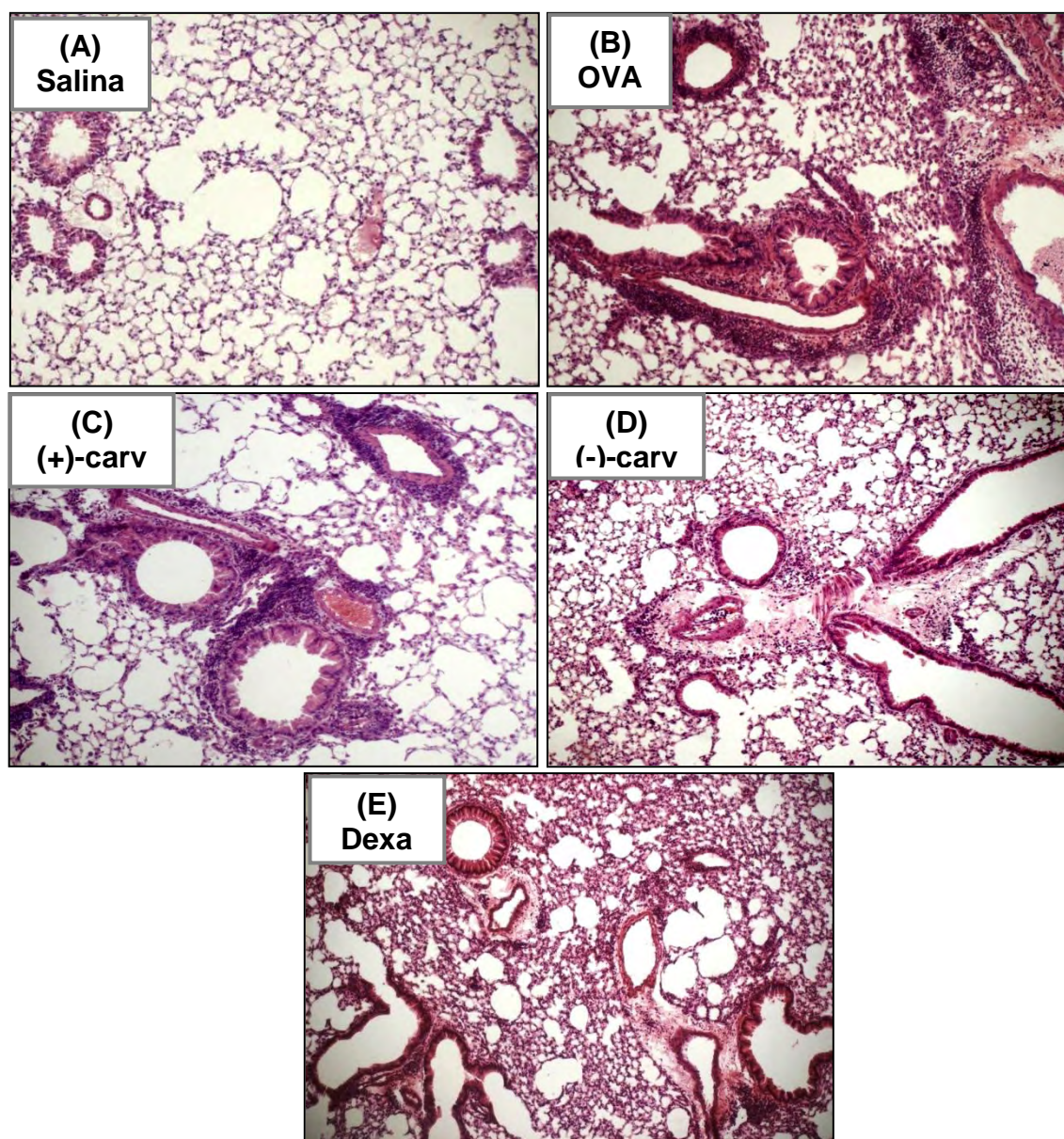


Figura 2. Efeito dos enantiômeros da carvona sobre o infiltrado de células em cortes histológicos de pulmões. Fotomicrografia das vias aéreas e parênquima pulmonar por H&E de camundongos BALB/c: **(A)** sensibilizados e desafiados com salina e tratados com veículo (controle negativo), **(B)** sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com veículo (controle positivo), **(C)** sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com (+)-(*S*)-carvona, **(D)** sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com (-)-(*R*)-carvona e **(E)** sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com dexametasona. Aumento de 20x.

4.13 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre a produção de muco no pulmão em modelo de asma experimental

O aumento na produção de muco é outra importante característica da asma alérgica, portanto além dos aspectos gerais dos pulmões, observados nos cortes histológicos corados com H&E, a presença de muco, produzido principalmente pelas células caliciformes, foi evidenciado pela coloração por P.A.S, uma vez que esta coloração é útil para demonstrar a presença de mucopolissacarídeos (constituintes do muco).

No grupo controle negativo da doença (grupo salina) não foi observada células produtoras de muco nos epitélios bronquiolares de revestimento (Figura 3 A). Entretanto, no grupo controle positivo da doença (grupo OVA) a produção de muco (glicogênio) foi evidenciada (Figura 3 B e C). Mais uma vez pode-se evidenciar a presença maciça de infiltrado de células no pulmão dos animais do grupo controle OVA (Figura 3 B e C).

O tratamento com (S)-(+)-carvona não foi capaz de reduzir a produção de muco e parece ainda exacerbar esse processo, quando comparado ao grupo controle OVA (Figura 3 D). Entretanto, o tratamento com (R)-(-)-carvona reduziu representativamente a produção de muco no pulmão de camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com OVA, quando comparado ao grupo OVA (Figura 3 E).

A análise desse corte histológico do pulmão permite evidenciar ainda, a diminuição de infiltrados de leucócitos nos de animais tratamentos com (R)-(-)-carvona.

O tratamento com dexametasona também foi capaz de reduzir a produção de muco, comparado ao grupo controle OVA (Figura 3 F).

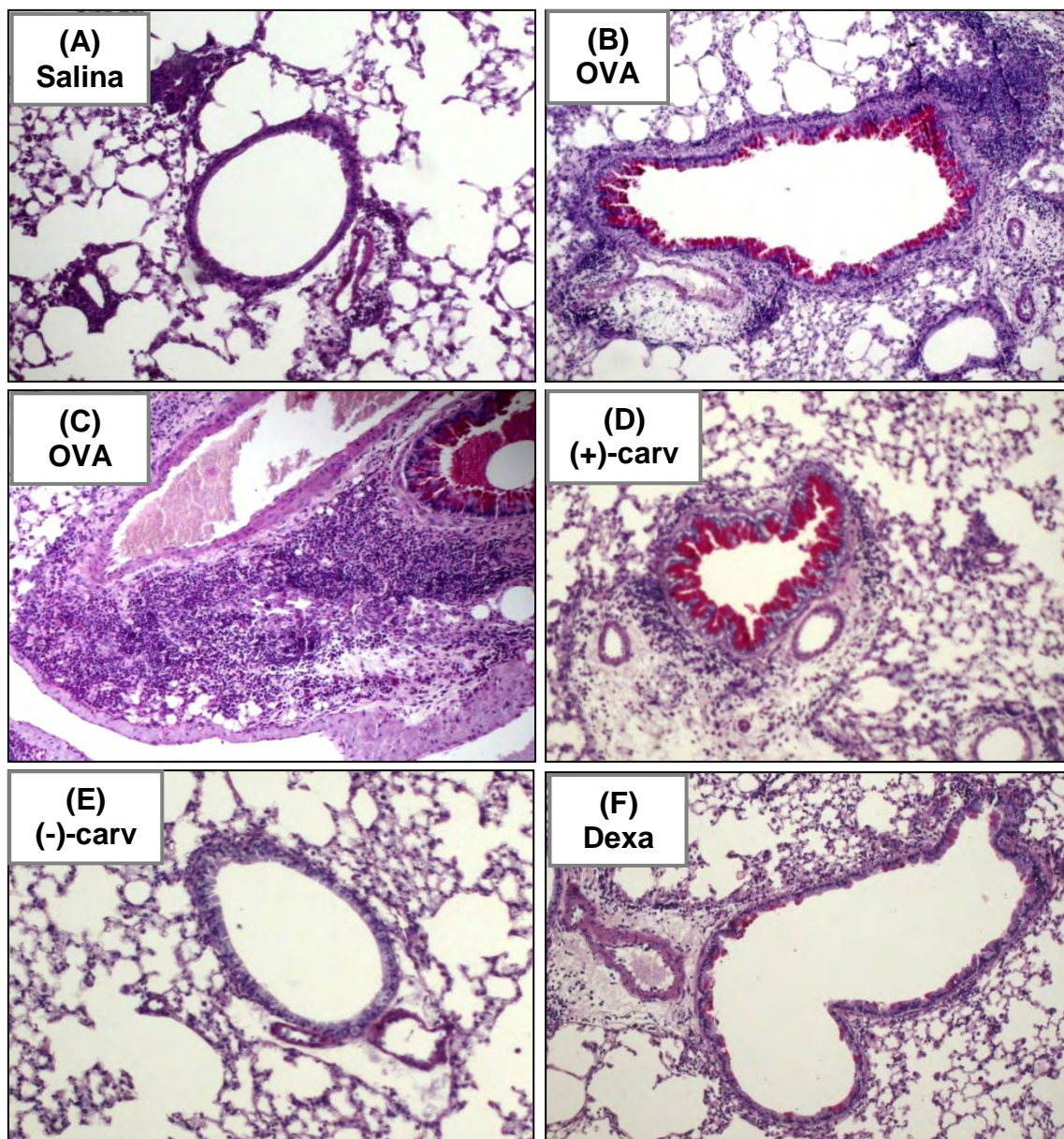


Figura 3. Efeito dos enantiômeros da carvona sobre a produção de muco em cortes histológicos de pulmões. Fotomicrografia das vias aéreas e parênquima pulmonar corados pelo Ácido Periódico – Schiff (P.A.S.) de camundongos BALB/c: **(A)** sensibilizados e desafiados com salina e tratados com veículo (controle salina), **(B e C)** sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com veículo (controle OVA), **(D)** sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com (+)-(S)-carvona, **(E)** sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com (-)-(R)-carvona e **(F)** sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com dexametasona. Aumento de 20 X.

4.14 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre os níveis séricos de IgE OVA-específica

Um importante parâmetro observado no processo de hipersensibilidade imediata, é a produção exacerbada de IgE específica para um dado alérgeno. Para avaliar se os enantiômeros da carvona influenciam na produção de IgE OVA-específica, o soro de camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com OVA foi testado quanto a produção de IgE OVA-específica pelo teste de anafilaxia cutânea passiva (PCA).

O tratamento com a (S)-(+)-carvona não resultou em alterações significativas nos níveis séricos de IgE OVA-específica 24 horas após o último desafio. Já o tratamento com (R)-(-)-carvona, inibiu significativamente (24,8 % de inibição) a produção de IgE OVA-específica comparada ao grupo controle OVA, sugerindo que a (R)-(-)-carvona esteja modulando a resposta de linfócitos B (Gráfico 11). Quando administrado a droga padrão dexametasona 0,1 mg/mL não foi observado alteração significativa.

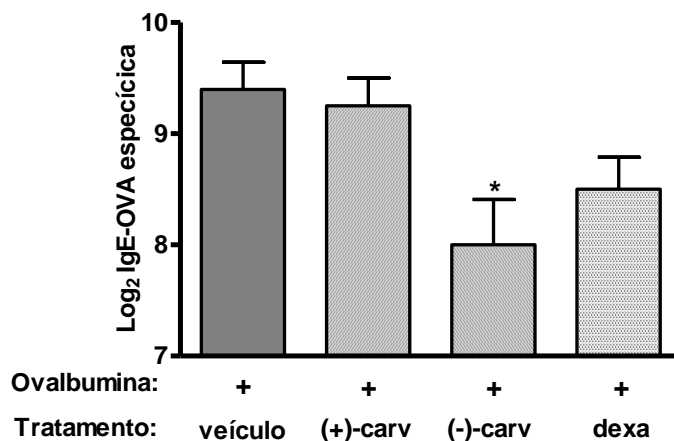


Gráfico 12. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre os níveis séricos de IgE OVA-específica em modelo de asma alérgica experimental. Camundongos BALB/c (n=5) foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina e tratados com 10 mg/kg de (S)-(+)- ou (R)-(-)-carvona ou com 0,1 mg/kg de dexametasona 1 hora antes de cada desafio. O soro dos animais foram coletados 24h após o último desafio e título de IgE OVA-específica, determinado. Os resultados foram expressos como média do log₂ do título de IgE \pm erro padrão. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA, seguida de pós teste de Tukey's. *p < 0.05, comparado ao controle OVA (OVA +, tratamento: veículo).

4.15 Efeito dos enantiômeros da carvona sobre os níveis das citocinas IL-13, IL-10 e IFN- γ em modelo de asma experimental

As citocinas IL-13, IL-10 e IFN- γ foram quantificadas no BAL de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA, e tratadas com os enantiômeros da carvona uma hora antes dos desafios.

A citocina IL-13 é produzida principalmente por linfócitos do perfil de células T_H2, sendo importante sinalizadora da produção de muco por células caliciformes do pulmão (KELLER et al., 2006). Entretanto, o tratamento com os enantiômeros não foram capazes de diminuir a produção de IL-13, quando comparados ao grupo controle OVA (Gráfico 13 A).

Quanto à produção da IL-10, importante citocina envolvida na supressão das respostas imunológicas, foi verificado um aumento significativo no BAL de camundongos tratados com a (*R*)-(-)-carvona, quando comparado ao grupo controle OVA. O aumento resultante na produção de IL-10 foi de 91% comparado ao grupo controle OVA. Porém, o tratamento com (*S*)-(+)-carvona não foi capaz de modular a produção desta citocina, comparado ao controle (Gráfico 13 B).

A produção de IFN- γ , relacionada ao perfil de resposta imunológica desencadeada por células T_H1, também foi avaliada. O tratamento com (*R*)-(-)-carvona não foi capaz de promover alterações significativas no nível desta citocina, quando comparado ao grupo OVA. Entretanto, foi verificado que tratamento com (*S*)-(+)-carvona aumentou significativamente a concentração IFN- γ no BAL (97,7% de aumento), comparado ao grupo controle (Gráfico 13 C).

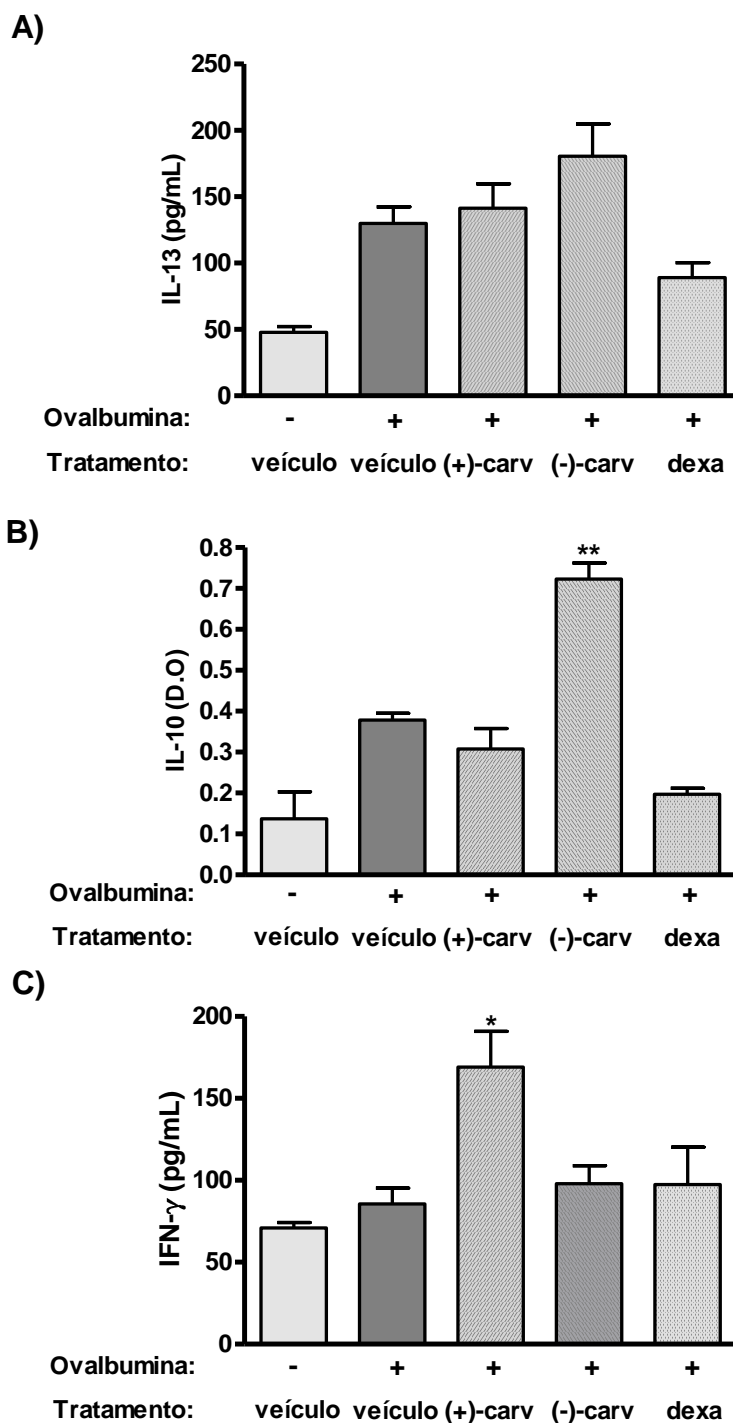


Gráfico 13. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)-(-)-carvona sobre os níveis de IL-13, IL-10 e IFN- γ no BAL em modelo de asma alérgica experimental. Camundongos BALB/c (n=5) foram sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com (S)(+)- ou (R)-(-)-carvona ou dexametasona 1 hora antes de cada desafio. O BAL foi coletado 24h após o último desafio e a concentração de IL-13 (A), densidade óptica de IL-10 (B) e concentração de IFN- γ (C) mensuradas por ELISA. Os resultados foram expressos como média da concentração ou D.O \pm erro padrão. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA, seguida de pós teste de *Tukey's*. *p < 0.05 **p<0.01, comparado ao controle OVA (OVA +, tratamento: veículo).

4.16 Efeito do tratamento com os enantiômeros da carvona antes das sensibilizações sobre o influxo de células em modelo de asma experimental

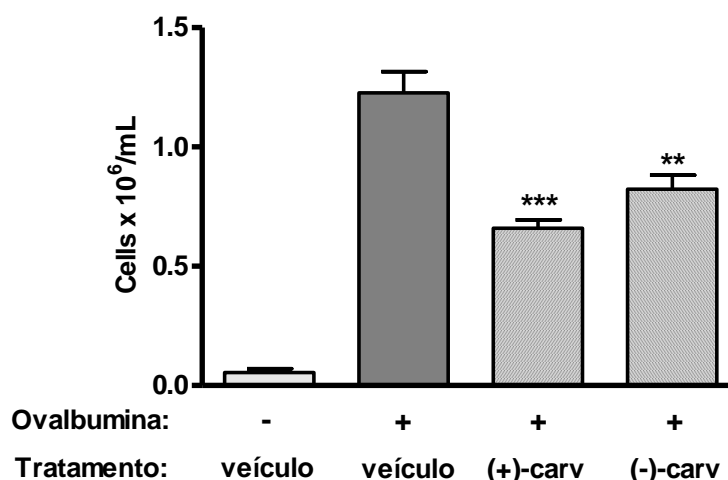
Visto que os tratamentos durante a etapa de desafio alergênico com (S)-(+)-carvona ou (R)-(-)-carvona aumentaram a produção de IFN- γ ou IL-10, respectivamente, foi realizado o tratamento com os monoterpenos antes das sensibilizações com OVA para verificar se os enantiômeros modulariam o processo de desencadeamento de hipersensibilidade.

O tratamento com ambos enantiômeros nessa fase do processo promoveu redução no número de células presentes no BAL, quando comparados com o grupo controle OVA (Gráfico 14 A).

A redução resultante do tratamento com a (S)-(+)-carvona foi de 40,6% e com (R)-(-)-carvona, de 33,17%.

Apesar do tratamento antes das sensibilizações, ter reduzido o número de células presentes no BAL, ele não foi capaz de modificar a proporção entre os leucócitos infiltrantes no espaço broncoalveolar, comparado ao grupo controle (Gráfico 14 B).

A)



B)

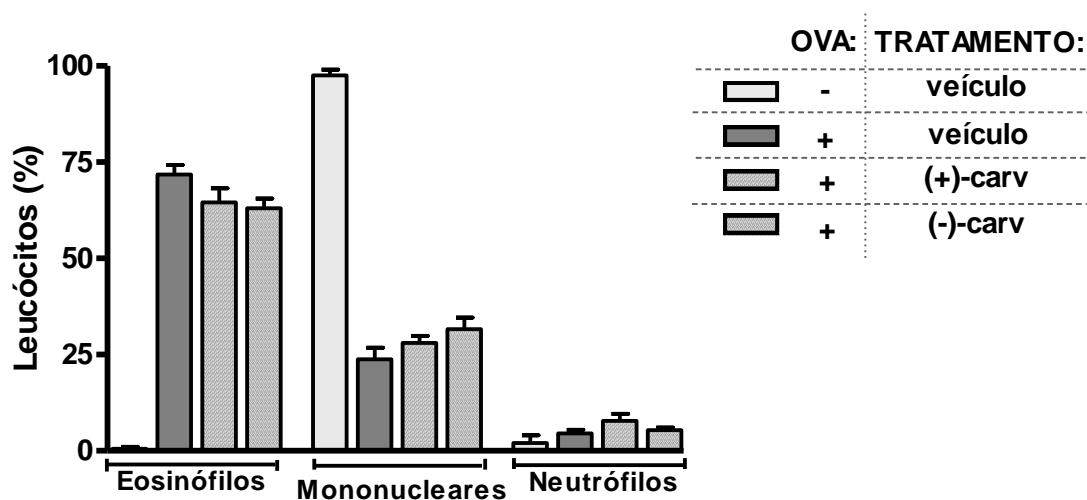


Gráfico 14. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)(-)-carvona antes das sensibilizações no recrutamento e proporção de leucócitos no BAL em modelo de asma alérgica experimental. Camundongos BALB/c (n=5) foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina e tratados com 10 mg/kg de (S)(+)-carvona ou (R)(-)-carvona ou apenas com o veículo, 1 hora antes das sensibilizações. A concentração de leucócitos totais **(A)** e a proporção de leucócitos **(B)** presentes no BAL foram analisadas 24 horas após o último desafio com OVA. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA, seguida de pós teste de *Tukey's*. Todos os grupos foram comparados ao grupo controle OVA (ovalbumina:+, tratamento: veículo) e **p < 0.01 ***p < 0.001, considerado significativo.

4.17 Efeito do tratamento com os enantiômeros da carvona antes das sensibilizações sobre o níveis séricos de IgE OVA-específica

Para avaliar se os enantiômeros da carvona quando administrados antes das sensibilizações influenciariam na produção de IgE OVA-específica, os soros de camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com OVA foram testado quanto a produção de IgE OVA-específica pelo teste da Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA)..

O tratamento com a (S)-(+)-carvona ou (R)-(-)-carvona antes das sensibilizações não resultou em alterações significativas nos níveis séricos de IgE OVA-específica 24 horas após o último desafio, comparada ao controle. Esse dado sugere que o tratamento antes da sensibilização não é capaz de modular a resposta de linfócitos B (Gráfico 15).

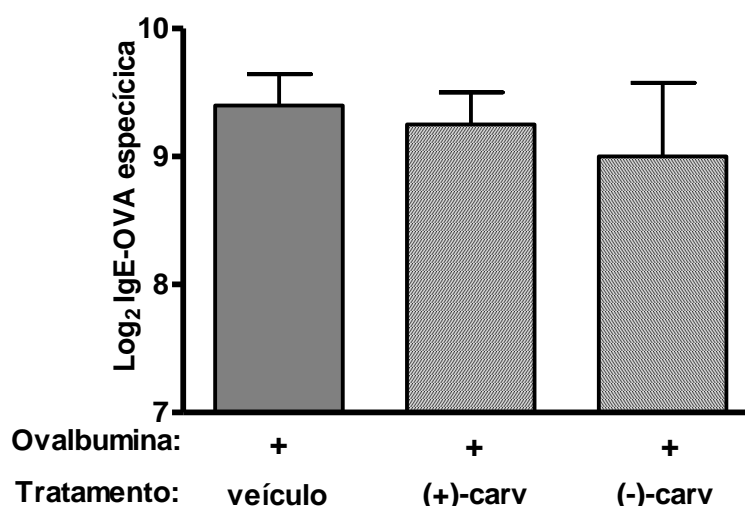


Gráfico 15. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)(-)-carvona antes das sensibilizações sobre os níveis séricos de IgE OVA-específica em modelo de asma alérgica experimental. Camundongos BALB/c (n=5) foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina e tratados com 10 mg/kg de (S)-(+)- ou (R)-(-)-carvona 1 hora antes das duas sensibilizações. O soro dos animais foram coletados 24h após o último desafio e título de IgE OVA-específica, determinado. Os resultados foram expressos como média do log₂ do título de IgE \pm erro padrão. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA, seguida de pós teste de *Tukey's*, comparado ao controle OVA (OVA +, tratamento: veículo).

4.18 Efeito do tratamento com os enantiômeros da carvona antes das sensibilizações sobre os níveis de IFN- γ em modelo de asma experimental

A produção de IFN- γ , relacionada ao perfil de resposta imunológica desencadeada por células T_H1, também foi avaliada. O tratamento antes de cada sensibilização com (S)-(+)-carvona ou (R)-(-)-carvona não foi capaz de promover alterações significativas no nível dessa citocina no BAL, quando comparado ao grupo controle OVA (Gráfico 16).

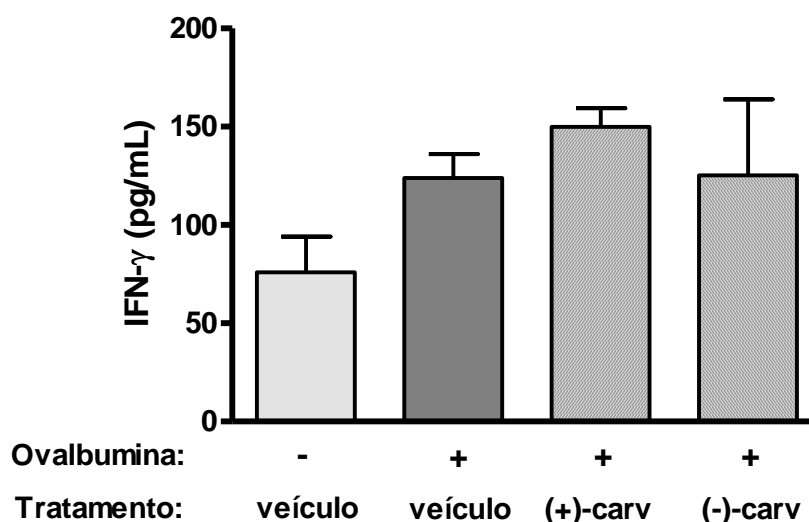


Gráfico 16. Efeito do tratamento com (S)(+)- ou (R)(-)-carvona antes das sensibilizações sobre os níveis de IFN- γ no BAL em modelo de asma alérgica experimental Camundongos BALB/c (n=5) foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina e tratados com 10 mg/kg de (S)-(+)- ou (R)-(-)-carvona 1 hora antes das sensibilizações. O BAL foi coletado 24h após o último desafio e a concentração de IFN- γ mensurada por ELISA. Os resultados foram expressos como média da concentração \pm erro padrão. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA, seguida de pós teste de Tukey's, comparada ao controle OVA (OVA +, tratamento: veículo).

Discussão



5. Discussão

Uma substância que possua um centro quiral em sua estrutura e que, portanto, apresente o fenômeno de enantiomeria pode gerar as mais diversas respostas biológicas. O conhecimento da estreita relação existente, entre a atividade farmacológica e a enantiomeria das substâncias ativas, aliada à necessidade de se obter maior compreensão no reconhecimento molecular em muitos eventos farmacologicamente relevantes, tem impulsionado os estudos relacionados à quiralidade (NÚÑEZ et al., 2009).

A função primordial do Sistema Imunológico ou Imunitário é a defesa do organismo contra microrganismos patogênicos e o estabelecimento da homeostasia. Porém, algumas vezes a resposta imune está associada a patologias, entre elas podemos citar: inflamações exacerbadas, auto-imunidades, hipersensibilidades, rejeição de transplantes, e imunodeficiências. Entretanto, uma resposta imune indesejada, pode ser manipulada por substâncias ativas, tanto para reprimir uma reação exacerbada, quanto para ativar uma resposta protetora (revisado por HOLGATE; POLOSA, 2008). Porém, poucos estudos relatam a influência da quiralidade de moléculas ativas na modulação da resposta imunológica.

No presente trabalho, foi realizado um estudo comparativo entre a ação dos enantiômeros da carvona (monoterpeno que pode ser isolado a partir de uma grande variedade de óleos essenciais) em modelos de inflamação e de hipersensibilidade imediata das vias aéreas.

A inflamação é uma complexa resposta fisiológica do organismo e ocorre, por exemplo, quando um tecido sofre uma agressão, de natureza infecciosa ou não. Há o envolvimento de numerosos mediadores nesse processo: histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e o óxido nítrico (NO), entre outros. Esses mediadores são produzidos ou liberados por diferentes tipos celulares, como leucócitos, células endoteliais e células nervosas sensoriais, e estão envolvidos no aumento da permeabilidade vascular e posterior, recrutamento de leucócitos (POSADAS et al., 2004).

A indução da iNOS e consequente aumento na produção de NO tem sido relatada em quase todos os tipos de inflamação (MILLER e GRISHAM, 1995). Em muitas condições inflamatórias, a inibição da iNOS tem se mostrado benéfica, principalmente devido a redução na produção de NO e a diminuição da geração de

peroxinitrito. O NO produzido por macrófagos ativados, é capaz de lesar hepatócitos, células das ilhotas pancreáticas e linfócitos (HIBBES et al, 1984; DRAPIER et al., 1986; DRAPIER et al, 1988). O mecanismo da lesão tecidual, resultante da produção excessiva de NO, inclui mecanismos de liberação de ferro intracelular, inibição da função mitocondrial e diminuição da síntese de DNA (DRAPIER et al, 1988; ALLER et al., 2006; PADALCO, 2004). Adicionalmente, ele promove a reação inflamatória por aumentar a liberação e promover a síntese de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, espécies reativas de oxigênio e derivados do ácido araquidônico (MARCINKIEWICZ et al. 1995; SAUTEBIN et al., 1995). Em adição, tem sido demonstrado que o aumento de prostanóides é resultado da capacidade do NO em promover ativação da COX-2 (ciclooxigenase-2) (DUDHGAONKAR et al., 2004).

Linhagens de células tumorais foram estabelecidas em cultura celular e proporcionam uma população de células uniformes e com características funcionais de culturas primárias, por isso com grande aplicação na pesquisa (ALBERTS, 2002). As linhagens de macrófagos são muito utilizadas para avaliar a produção de diversos mediadores inflamatórios e citocinas (KLASING, 1998). Adicionalmente, o IFN- γ (interferon gama) e o LPS (lipopolissacarídeo) atuam sinergicamente na produção de altas concentrações de NO em cultura de macrófagos (PUFAHL et al., 1992).

Nesse trabalho foi demonstrado que ambos enantiômeros da carvona inibiram a produção de NO em cultura de macrófagos J774 A.1 estimuladas com IFN- γ e LPS, indicando que esses monoterpenos apresentam potencial anti-inflamatório. A inibição verificada na produção de NO, não foi resultante da redução da viabilidade dos macrófagos em cultura, uma vez que o teste do MTT revelou que o tratamento das células com ambos enantiômeros resultou em 100% de viabilidade. Ainda, esse ensaio forneceu indícios de que, principalmente a (*R*)-(-)-carvona, atue em macrófagos J774 A.1 promovendo a proliferação dessas células. Porém, ensaios de proliferação mais específicos, como a marcação do ciclo celular, são necessários para confirmar tal efeito.

Alguns estudos relatam, que monoterpenos com estrutura similar ao da carvona e também extratos ou óleos essenciais que apresentam a carvona como um dos constituintes, possuem efeitos similares na redução da produção de NO. O (-)-linalol, um enantiômero constituinte de alguns óleos essenciais, caracterizado

quimicamente como um monoterpeno alcoólico terciário, inibiu de maneira concentração dependente a produção de NO e a expressão da iNOS em cultura de macrófagos J774 A.1 estimuladas com LPS (PEANA et al, 2006). O mesmo efeito foi relatado para o citral (um dos principais componentes do óleo essencial de capim-limão) em cultura de macrófagos RAW 264.7. Nesse estudo, a redução da expressão na iNOS foi relacionada à supressão da ativação do fator de transcrição NF- κ B (LEE et al., 2008). Além disso, o extrato metanólico de alecrim, cujo óleo essencial é rico em carvona e o extrato das folhas de *Mentha vensis* L. var. *piperascens*, que contém carvona entre seus constituintes, promoveram redução dos produtos de oxidação do NO em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (TSAI et al, 2006; KIM et al., 1998).

Adicionalmente, a quiralidade de uma molécula pode influenciar na formação do NO. Esse efeito pode ser evidenciado pela comparação entre o efeito do éster metílico NG-nitro-L-arginina (L-NAME) e seu isômero D-NAME. Apenas o L-NAME inibe a produção de NO, sendo o D-NAME inativo (LIPPE et al, 1993). Porém, esse fenômeno não foi observado nos resultados obtidos pelos enantiômeros da carvona, uma vez que comparando-os, não foi verificada diferença estatística na redução de NO pelos macrófagos J774 A.1.

Gonçalves e colaboradores (2008) relataram que a (*R*)-(-)-carvona foi capaz de inibir a resposta de nocicepção induzida por formalina. No teste da formalina, há uma resposta bifásica nociceptiva distinta, denominada fases precoce e tardia. A fase inicial é decorrente do estímulo direto de nociceptores e reflete a dor mediada por mecanismos centrais. Já a fase tardia, é resultante da liberação de mediadores inflamatórios, como serotonina, histamina, bradicinina, prostaglandinas e, pelo menos em menor grau, da sensibilização dos neurônios nociceptivos centrais (TJOLSEN et al., 1992). Uma vez que a (*R*)-(-)-carvona inibiu a resposta nociceptiva na fase precoce e tardia do teste, os autores sugeriram que a molécula possui efeito analgésico por atuar tanto na dor central (dor neurogênica) quanto na dor inflamatória (periférica), neste caso com a inibição de mediadores inflamatórios.

Nossos resultados demonstram que não apenas a (*R*)-(-)-carvona, como também a (*S*)-(+)-carvona, atuam em mediadores do processo inflamatório, uma vez que foram capazes de reduzir o edema de pata induzido por dois agentes flogísticos distintos: carragenina e zimosan.

O aumento da permeabilidade vascular é uma importante característica relacionada ao início das reações inflamatórias, levando ao extravasamento de plasma e conseqüente formação de edema nos locais da injúria. O edema de pata induzido por carragenina é utilizado como triagem no estudo de compostos com ação anti-inflamatória, uma vez que essa substância induz um processo inflamatório característico e bem descrito na literatura, promovendo a liberação e síntese de vários mediadores. Durante as primeiras horas, é verificada principalmente, a liberação de bradicinina, histamina e serotonina, seguida pela formação de radicais livres e pelo aumento na expressão de iNOS e COX e conseqüentemente, aumento de NO e de prostaglandinas (POSADAS et al., 2004).

Outro agente flogístico muito utilizado na triagem de substâncias com potencial anti-inflamatório é o zimosan, uma fração insolúvel da parede celular de levedura. O zimosan produz resposta inflamatória via múltiplos fatores que incluem a geração de anafilotoxinas pelo sistema complemento (C3a, C4a, C5a) capazes de induzir a liberação de histamina dos mastócitos, biossíntese de eicosanóides por macrófagos e neutrófilos, geração e liberação de fatores de ativação plaquetária, radicais livres de oxigênio e enzimas lisossomais. Além disso, o NO é liberado entre 1 e 6 horas após a indução da resposta inflamatória induzida por carragenina ou zimosan (DUDHGAONKAR et al., 2004; SALVEMINI et al., 1996).

Os enantiômeros da carvona foram capazes de reduzir o edema de pata induzido por carragenina ou zimozan, sugerindo que eles atuem em um ou mais mediadores inflamatórios supracitados.

O óleo essencial extraído das folhas *Lippia gracilis*, contendo uma série de monoterpenos, representados principalmente pelo timol, p-cimeno e carvacrol, foi capaz de reduzir o edema de pata e a migração de leucócitos para cavidade peritoneal, após indução com carragenina (MENDES et al., 2010). Foi também demonstrado, que o carvacrol é capaz de suprimir a atividade da COX-2 (HOTT et al., 2010).

Santos e Rao (2000) sugeriram que o 1,8-cineol, eucaliptol, apresenta efeito anti-inflamatório e analgésico, uma vez que foi capaz de promover inibição do edema induzido por carragenina, redução do aumento da permeabilidade capilar, e inibição na formação de granulomas. Em outro estudo, o efeito anti-inflamatório do 1,8 cineol foi relacionado com a inibição da produção de citocinas e metabolismo do ácido araquidônico (JUERGENS et al., 1998). Portanto, sumarizando as informações

descritas acima sobre diversos monoterpenos com estruturas relacionadas a da carvona todos apresentam atividade anti-inflamatória.

Adicionalmente, o bloqueio de prostaglandinas e aminas simpaticomiméticas é conhecido por diminuir a hipernocicepção induzida pela inflamação (CUNHA et al, 2005; VERRI et al, 2006). A redução de nocicepção está relacionada a ação direta desses mediadores em nociceptores periféricos (FERREIRA et al, 1978;. KHASAR et al, 1999). Como tanto as prostaglandinas quanto as aminas simpaticomiméticas, são produzidas após o estímulo com carragenina ou zimosan, os resultados apresentados neste estudo indicam, que ambos enantiômeros, atuam na dor inflamatória por reduzir a formação, liberação ou ação desses mediadores, corroborando com Gonçalves e colaboradores (2008) que relataram que a (*R*)-(-)-carvona apresenta ação na hipernocicepção inflamatória.

Os radicais livres desempenham importante papel na inflamação local induzida por carragenina e o aumento da atividade da glutathione, enzima capaz de converter a formação desses radicais, tem sido relacionada a redução do processo inflamatório. Zheng e colaboradores (1992) demonstraram que a carvona possui a capacidade de aumentar a atividade da enzima glutathione S-transferase em vários tecidos, sendo que a (*S*)-(+)-carvona exibiu maior atividade que seu enantiômero (ZHENG et al, 1992). Adicionalmente, o aumento na atividade redutora da glutathione desempenha importante papel na inibição da indução da NOS durante a ativação de macrófagos (HOTHERSALL et al., 1997). Portanto, a capacidade dos enantiômeros da carvona aumentarem a atividade da glutathione pode resultar na redução dos níveis de NO observados no presente trabalho e consequentemente, na redução do edema de pata, induzido por carragenina ou zimosan.

O fato dos tratamentos com os enantiômeros da carvona reduzirem o edema principalmente na primeira hora, sugere que esses monoterpenos atuem nos mediadores liberados nessa primeira etapa da formação do edema, como por exemplo a histamina.

A histamina se liga a receptores denominados H1, H2, H3 e H4, presentes em diversos tipos celulares, incluindo células endoteliais e leucócitos. O aumento na permeabilidade vascular é mediado principalmente pelo receptor H1 (revisado em HILL et al., 1997).

O composto 48/80 (degranulador farmacológico de mastócitos), é um agente flogístico responsável pela degranulação de mastócitos via ativação da proteína G1

(TATEMOTO et al., 2006). O processo de degranulação dessas células leva a liberação imediata de histamina e serotonina (5 hidroxi-triptamina), uma das aminas vasoativas responsáveis pelo aumento da permeabilidade celular e consequente extravasamento de plasma para o tecido infamado

Nesse trabalho, foi verificado que tanto a (S)-(+)- quanto a (R)-(-)-carvona reduziram o edema de pata induzido pelo composto 48/80 indicando que essas substâncias atuem na degranulação de mastócitos ou na ação dos mediadores liberados nesse processo, tais como serotonina e histamina. Adicionalmente, os enantiômeros também inibiram a formação do edema de pata induzido por histamina, fornecendo indícios que essas substâncias antagonizem o efeito desta, interagindo com seus receptores e/ou atuando nas vias de sinalização desencadeadas por esse mediador. Esses dados corroboram com os resultados de Silva e colaboradores (2003) onde demonstraram o efeito inibitório do óleo essencial de eucalipto na formação do edema de pata induzido tanto por carragenina quanto por histamina.

Portanto, o efeito anti-edematogênico da carvona pode ser, pelo menos em parte, explicado pela inibição da ação da histamina em um primeiro momento, e posteriormente na capacidade em promover o aumento da glutathione e reduzir a síntese de NO.

Outro importante aspecto do processo inflamatório, secundário as mudanças observadas na microvasculatura é a migração de leucócitos do sangue para o tecido. O início desse evento é normalmente caracterizado por intenso influxo de neutrófilos no local da injúria. Posteriormente, células mononucleares e algumas vezes, eosinófilos são recrutados (KOLACZKOWSKA et al. 2006).

Para verificar o efeito dos enantiômeros da carvona no processo de migração celular desencadeado pelo processo inflamatório, foi utilizado o modelo de peritonite induzida por zimosan.

Durante a peritonite induzida por zimosan, os fagócitos englobam partículas do patógeno (polissacarídeos da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*) para eliminá-los pela ação de substâncias antimicrobianas (reativos intermediários do oxigênio (ROI) e NO. Além disso, essas células são estimuladas a sintetizar e liberar numerosos mediadores inflamatórios (AJUEBOR et al. 1999; DOHERTY et al. 1985; KOLACZKOWSKA et al. 2002). A inflamação induzida por zimosan é dependente de um rápido influxo de células polimorfonucleares (PMNs) e

formação de anafilatoxinas oriundas do sistema complemento (C4a e C5a) com ação quimiotática para PMNs. Em adição, C5a induz direta e indiretamente a expressão da P-selectina em células endoteliais e ainda o zymosan induz a produção de citocinas como IL-1 β e TNF- α , capazes de promover a expressão de selectinas nas células endoteliais para facilitar o mecanismo de transmigração de células para o sítio inflamatório (FOREMAN et al., 1994; JONES et al., 1993; BISCHOFF et al., 1995; OLOFSSON et al., 1994).

Ambos os enantiômeros inibiram a migração de neutrófilos para o lavado peritoneal induzido por zimosan confirmando portanto, a ação anti-inflamatória dessas moléculas.

Alguns estudos relatam que uma grande variedade de óleos essenciais, que contem carvona, apresentam a capacidade de reduzir o influxo de PMNs em modelos de inflamação (BIGHETTI et al., 1999; SILVA et al., 2003; PASSOS et al., 2007; MEDIEIROS et al., 2007; LEITE et al., 2010; LEE et al., 2011). Recentemente, foi relatado que o óleo essencial das folhas *Cymbopogon winterianus*, constituído de uma grande variedade de monoterpenos, reduziu a migração de PMNs em modelo de pleurisia induzido por carragenina em camundongos (LEITE et al., 2010).

O recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório no modelo de peritonite induzido por zimosan envolve citocinas tais como TNF- α e IL-1 β (ISSEKUTZ et al., 1993; KOLACZKOWSKA et al., 2009). Assim, os efeitos do tratamento com os enantiômeros da carvona na produção dessas citocinas foram analisados.

O tratamento com (*R*)-(-)-carvona foi capaz de inibir o TNF- α , mas não a IL-1 β , sugerindo que a inibição do infiltrado de PMNs observada, derive, pelo menos em parte, da inibição na produção de TNF- α .

Efeito similar foi obtido em um estudo realizado por Passos e colaboradores (2007), que demonstraram que o óleo essencial de *Cordia verbenacea* foi capaz de inibir o edema de pata e o infiltrado de leucócitos induzido por carragenina na cavidade pleural de ratos, além de ter inibido TNF- α , sem interferir nos níveis de IL-1 β .

O tratamento com a (*S*)-(+)-carvona não foi capaz de promover redução nos níveis de TNF- α no modelo de pleurisia induzido por zimosan. Portanto, a inibição no influxo de PMNs por este enantiômero pode ser devido, em parte, ao fato de antagonizar o efeito edematogênico da histamina e interferir na expressão de

moléculas de adesão no endotélio. Takeshita e colaboradores (2003) relataram que a tioperamida, antagonista dos receptores de histamina H3/4, reduziu significativamente a migração de células induzida pela injeção de zimosan no peritônio de forma dose-dependente. Outros estudos tem demonstrado que leucotrienos (LTC4, LTB4) e prostaglandinas (PGE2) participam no recrutamento de PMNs, no modelo de peritonite induzida por zimosan (BYRUM et al., 1999; RAO et al., 1994). Estudos demonstram que antagonistas de receptores H4 promovem diminuição nos níveis de LTB4, um dos mais potentes agentes quimioatraentes conhecido para neutrófilos (TAKESHITA et al., 2003). Estes dados respaldam parcialmente o efeito anti-inflamatório dos enantiômeros da carvona.

Existem alguns relatos sobre a influência da quiralidade de moléculas (enantiômeros) na ação anti-inflamatória entrento, raramente enantiômeros (estruturas quirais) apresentam potências e atividades similares, pois os receptores e as enzimas envolvidas nos mecanismos de ação normalmente atuam seletivamente frente a diferentes arranjos espaciais (HYNECK et al. 1990). Enantiômeros com atividades similares, mas potências diferentes são mais comuns, como é o caso da warfarina, um anti-coagulante de uso terapêutico, em que a potência do isômero S (-) *in vivo* é cerca de 2 a 5 vezes maior que seu antípoda R (+) (THALL, 1996). Peana e colaboradores (2002) observaram que embora o (-)-linalol e sua mistura racêmica apresentavam efeito anti-inflamatório, evidenciado pela redução na formação do edema de pata induzido por carragenina, o enantiômero puro, apresentou um efeito retardado e mais prolongado. A prometazina e da terfenadina, quando comparados separadamente, possuem atividades e potências antihistamínica similares, ligando-se aos receptores H1, embora estes apresentem alta enantiosseletividade (ZHANG, 1993; LIMA et al., 1997). Em contrapartida o estudo sobre estrutura atividade do (S)-(+)-ibuprofeno e o seu racemato demonstrou que ambos não apresentaram diferença na redução do edema de pata induzido por carragenina em ratos (BOLE-VUNDUK et al., 1996).

Os resultados aqui apresentados onde ambos os enantiômeros da carvona apresentaram efeito anti-inflamatório e apenas a (R)-(-)-carvona modulou a produção de TNF- α e, indicam que a quiralidade da molécula esta parcialmente influenciando nos mecanismos anti-inflamatórios dessas moléculas.

O presente estudo também avaliou o efeito dos enantiômeros da carvona no processo inflamatório alérgico pulmonar.

A alergia pulmonar é caracterizada pela hiperreatividade das vias aéreas, gerada por mecanismos complexos e desencadeada pelo Sistema Imunológico. A hiperreatividade das vias aéreas pode resultar na obstrução das vias aéreas. As principais características histopatológicas das alergias pulmonares incluem o acúmulo de células inflamatórias, principalmente eosinófilos, dentro do pulmão e presença de células caliciformes metaplásicas no epitélio das vias respiratórias, as quais apresentam um fenótipo secretor de muco. Apesar de estarem presentes em menor proporção, linfócitos T *helper* tipo 2 (T_H2) é dominante e responsável por sustentar a doença pulmonar alérgica (BARNES et al., 2001). Células T_H2 são recrutadas para o pulmão em resposta a alérgenos inalados e as citocinas liberadas por essas células contribuem para doença. A interleucina 4 (IL-4) é necessária para o desenvolvimento da resposta T_H2, pela síntese de IgE e pelas reações atópicas. Adicionalmente, células T_H2 e eosinófilos são fortemente implicados na patogênese de doenças alérgicas como a asma, o acúmulo dessas células juntamente com mediadores liberados correlacionam com a severidade da doença (CORY et al., 2002).

Animais sensibilizados com ovalbumina têm sido utilizados para estudar as alterações fisiopatológicas da inflamação alérgica nas vias aéreas inferiores. Nesse modelo animal é observado as principais características da asma alérgica, entre elas, a hiperresponsividade das vias aéreas, recrutamento de eosinófilos para o pulmão, extravasamento de plasma, muco e broncoconstrição (BLYTH et al., 1996).

Os resultados apresentados demonstram que ambos enantiômeros da carvona foram capazes de reduzir a quantidade de células presentes na cavidade pleural e no lavado broncoalveolar (BAL) em modelo murino de pleurisia e de asma induzidos por OVA, demonstrando a capacidade dessas moléculas em interferir no processo de migração celular.

Os eosinófilos nas vias aéreas são responsáveis por danos epiteliais e estão estritamente relacionados à fisiopatologia da asma. Os eosinófilos e seus produtos são fatores importantes no desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas e severidade da asma (revisado por LAMPINEM et. al., 2004). Estas células produzem uma grande variedade de mediadores inflamatórios, tais como: cis-leucotrienos (LTC₄) e PAF. Produzem também diferentes citocinas e quimiocinas, tais como: IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, RANTES, eotaxinas, TGF- α , TGF- β e TNF- α . Além disso, as proteínas presentes em seus grânulos (proteína catiônica eosinofílica-ECP,

proteína básica principal-MBP e a peroxidase eosinofílica-EPO) podem também gerar danos teciduais (revisado por LAMPINEN et al., 2004).

Os resultados do presente estudo demonstram que os tratamentos com os monoterpenos antes dos desafios alergênicos promoveram uma redução significativa na proporção de eosinófilos no BAL, quando comparada a de outros leucócitos.

Estudos têm demonstrado que o NO induz, em eosinófilos murinos, a produção de fatores quimiotáticos (quimiocinas), sugerindo um “feedback” positivo, isto é, células inflamatórias produzem NO que induz a produção de agentes quimiotáticos, que por sua vez, recruta mais células tal como eosinófilos para o foco da inflamação. Adicionalmente, foi demonstrado que o NO inibe a liberação de IL-12 derivada de macrófagos, considerada uma citocina indutora do perfil T_H1 , prevenindo portanto a amplificação de células T_H1 e induzindo a expansão das células T_H2 com secreção de IL-4 (HUANG et al., 2000). Esse achado mostra a ampla contribuição do NO no estabelecimento da hipersensibilidade tipo I. Portanto, a inibição do NO pelos enantiômeros da carvona em macrófagos J774 A.1 sugere uma contribuição direta na diminuição do recrutamento de células inflamatórias incluindo os eosinófilos.

A histamina altera o equilíbrio de secreção de citocinas dos perfis celulares T_H1/T_H2 , desencadeando um desvio de resposta para o perfil T_H2 , que consequentemente desempenha um papel importante nas doenças alérgicas. Essa ação da histamina é resultante da hiper-fosforilação do fator de transcrição STAT-6, gerada pela ligação da histamina aos receptores $H1$. A fosforilação do STAT-6 leva ao desenvolvimento de células T_H2 e de repostas mediadas por IgE. Portanto, a fosforilação de STAT-6 desempenha um importante papel na hiperreatividade alérgica agravando os sintomas da alergia (KHARMATE et al., 2007). Adicionalmente, o tráfico de leucócitos tem sido relacionado com os receptores de histamina. Os receptores $H4$ estão relacionados a quimiotaxia de eosinófilos e mastócitos induzida por histamina (O'REILLY et al., 2002; HOFSTRA et al., 2003). Em adição, recentemente foi relatado a presença de receptores de glutamato do tipo NMDA em linfócitos T e, que a ativação desses receptores promove a polarização dessas células para um perfil T_H2 (ORIHARA et al., 2010). Esses receptores têm sido encontrados em células do pulmão (DICKMAN et al., 2004, GOLÇALVES ET al. 2008).

Como os enantiômeros da carvona inibiram a ação edematogênica da histamina e apenas o tratamento com (*R*)-(-)-carvona promoveu redução nos níveis séricos de IgE-OVA-específico (imunoglobulina responsável pelas alergias) podemos inferir que a redução no recrutamento de eosinófilos para os pulmões está associada, pelo menos em parte, a inibição da ação da histamina e que a (*R*)-(-)-carvona esteja inibindo a polarização para T_H2 devido a inibição dos receptores NMDA ou ainda a inibição dessas células na produção de citocinas responsáveis pela troca de isotipo de imunoglobulina.

Para verificar se a redução de células inflamatórias no BAL de camundongos tratados com os isômeros da carvona se refletia também no parênquima pulmonar, cortes histológicos do pulmão corados com H&E foram analisados. A (*R*)-(-)-carvona diminuiu substancialmente as células da inflamação no parênquima pulmonar o que não foi observado para a (*S*)-(+)-carvona. A redução verificada na quantidade de leucócitos presentes no BAL pela (*S*)-(+)-carvona e a não redução dessas células no parênquima pulmonar sugere que esse enantiômero atue sobre moléculas teciduais responsáveis pela saída das células para o lumen do pulmão.

Um estudo utilizando camundongos *knockout* para metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) revelou que esses animais quando sensibilizados e desafiados com OVA, embora apresentassem redução no influxo de células para o BAL, numerosas células inflamatórias foram acumuladas no parênquima pulmonar, e que, portanto, a MMP-2 parece ser importante para estabelecer o gradiente quimiotático necessários para egresso de células inflamatórias pulmonares e para a prevenção de asfixia letal. Além disso, a inibição das MMPs não impediu o recrutamento de células inflamatórias para o tecido pulmonar, impedindo apenas sua saída (CORRY et al., 2003).

De fato, estudos anteriores revelam que as MMPs, uma família de endopeptidases cálcio-zinco dependentes que degradam vários componentes da matriz do tecido conjuntivo, desempenham importante papel na infiltração de células, remodelamento do tecido e cura nas doenças inflamatórias das vias aéreas (revisado por EMONARD; GRIMAUD, 1990; O'CONNOR; FITZGERALD, 1994).

Dai e colaboradores (2009) demonstraram que o borneol, monoterpene com estrutura similar a carvona pois compartilham o mesmo ligante, o receptor GABA-A, reduziu a atividade da MMP-2 na mucosa oral de camundongos BALB/c. Portanto os

nossos resultados sugerem que a (S)-(+)-carvona esteja inibindo a atividade da MMP-2, embora estudos adicionais relacionados a atividade dessa molécula devam ser realizados.

O fato da (R)-(-)-carvona ter promovido redução no infiltrado de células na região peribroncovascular do pulmão sugere uma ação inibitória nos receptores NMDA e/ou indução da apoptose.

O receptor Fas (CD95) é ubiquamente expresso e relacionado à indução da apoptose, e o FasL (CD95L) é expresso em células do sistema imunológico, incluindo eosinófilos, neutrófilos e células dendríticas. A ligação do Fas com FasL leva à apoptose das células pela trimerização desse receptor e ativação subsequente de caspases (HAMANN et al., 1998). Gould e colaboradores (2006) demonstraram que a carvona, assim como alguns outros monoterpenos, induz a expressão de FasL em linhagem de células oriundas de glioma humano. Nesse estudo, foi utilizado a mistura racêmica da carvona, e portanto, a possibilidade da (S)-(+)-carvona induzir o mesmo efeito, não pode ser excluída.

Hipersecreção de muco é uma característica importante da inflamação alérgica do epitélio respiratório como na asma brônquica. A produção excessiva de muco resulta na obstrução das vias aéreas inferiores e insuficiência respiratória progressiva, sendo a principal causa de morte na asma grave (FAHY et al., 2002).

Estudos mostram que a IL-13 está diretamente envolvida nesse processo, sendo, portanto, uma citocina responsável pela hipersecreção de muco por células caliciformes e formação de fibrose subepitelial em pulmões (KELLER et al., 2006, COHN et al 1998). Entretanto, a IL-13 não é a única responsável pela produção de muco, uma grande variedade de mediadores e células inflamatórias é capaz de estimular a síntese e secreção de muco (BLYTH et al., 1996; HAILE et al., 1999; SHIMIZ et al., 2000). Vários produtos de eosinófilos, como CysLTs, PAF, e ECP, são conhecidos por induzir a secreção de muco (LIU et al., 1998). Adicionalmente, o trabalho realizado por Shimiz e colaboradores (2003) demonstrou que o infiltrando eosinófilos pode induzir secreção de muco devido a liberação de CysLTs.

Nos cortes histológicos dos pulmões corados com PAS observou-se que o tratamento com a (R)-(-)-carvona inibiu fortemente a produção de muco. Entretanto, o tratamento com (S)-(+)-carvona, parece ter aumentado a produção de muco.

Considerando que a IL-13 a principal citocina responsável pelo aumento da produção de muco por células caliciformes, investigou-se a capacidade dos

isômeros da carvona em modular a produção dessa citocina. Apesar de se esperar uma modificação nos níveis da IL-13 no pulmão, em virtude da alteração induzida pelos isômeros da carvona na produção de muco, nenhum dos enantiômeros foi capaz de modular os níveis de IL-13.

Similar aos nossos resultados onde a (*R*)-(-)-carvona foi capaz de reduzir a produção de muco, embora sem modular os níveis de IL-13, Henderson e colaboradores (2005) relataram que o (*R*)-albuterol reduziu a produção de muco por células caliciformes, sem também interferir no nível de IL-13, embora com redução de IL-4. O fato de em nossos estudos a (*R*)-(-)-carvona ter reduzido o nível de IgE OVA-específica (como citado anteriormente) este evento pode ser reflexo da redução de IL-4 demonstrado por Henderson e colaboradores (2005).

O fato dos enantiômeros da carvona modularem a produção de muco pode decorrer da alteração no número de células presentes no parênquima pulmonar. Embora a (*S*)-(+)-carvona module a produção de mediadores inflamatórios importantes como a histamina e o NO, o grande número de células inflamatórias encontradas no parênquima pulmonar podem ser as responsáveis pela produção aumentada de muco. Ainda podemos inferir que este aumento na produção do muco observada com o tratamento com a (*S*)-(+)-carvona pode ser explicado também pela ativação do receptor GABA_A.

Subunidades do receptor ácido gama-aminobutírico A (GABA_AR) são expressos nas células epiteliais alveolares do tipo II e em condições normais, esses receptores e o GABA estão presentes nessas células, embora em pequenas quantidades (JIN et al, 2005). O transporte de cloreto nas células epiteliais das vias aéreas é capaz de regular a proliferação celular e a produção de muco. XIANG e colaboradores (2007) relataram que a ativação GABA_AR aumenta a proliferação das células epiteliais e a produção de muco no epitélio das vias aéreas e que a expressão de subunidades do GABA_AR foram aumentadas significativamente após o desafio com alérgeno em camundongos. Este estudo também demonstrou que o receptor da IL-13 é responsável por regular positivamente o sistema GABAérgico epitelial, resultando na metaplasia de células caliciformes e produção excessiva de muco.

Sousa e colaboradores (2007) demonstraram que a (*S*)-(+)-carvona, mas não a (*R*)-(-)-carvona, apresenta efeito anticonvulsivante provavelmente por ativar

receptores GABA_A, uma vez que ela foi capaz de reverter o efeito convulsivante produzido pela picrotoxina (PIC), um conhecido antagonista GABA-adrenérgico.

A IL-10 é uma citocina envolvida da regulação da resposta imunológica. Devido as suas propriedades imunossupressoras e antiinflamatórias, a administração dessa citocina tem sido sugerida para o tratamento da asma. Ela foi originalmente descrita em camundongos como um fator inibidor da produção de citocinas do perfil T_H1 (FIORENTINO et al, 1989). Subsequentemente, estudos mostraram que a IL-10 também pode regular negativamente clones T_H2 e a produção de IL-4 e IL-5 (BORISH, 1998). Adicionalmente, na presença de inflamação eosinofílica, a IL-10 atua na musculatura lisa reduzindo a hiperresponsividade brônquica (MÄKELÄ et al., 2000). Um estudo realizado com a administração de plasmídeos de IL-10 em camundongos sensibilizados e desafiados com OVA mostrou redução da hiperreatividade das vias aéreas, diminuição na eosinofilia e na neutrofilia, mostrando que a IL-10 desempenha um papel regulador importante nesse modelo (FU et al., 2006).

O tratamento com (*R*)-(-)-carvona foi capaz de aumentar os níveis dessa citocina no BAL de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA enquanto que o tratamento com (*S*)-(+)-carvona não foi capaz de modular a produção de IL-10. Estes resultados sugerem que a melhora no processo inflamatório pulmonar, resultante do tratamento com (*R*)-(-)-carvona, seja atribuída a imunoregulação pela IL-10.

Outra citocina avaliada no presente estudo foi o IFN- γ . A ativação de células T_H1 está associada com a inibição do perfil de resposta desencadeada por células T_H2 embora, alguns estudos relatam que camundongos deficientes em IFN- γ apresentam baixos níveis de IgE específica e de responsividade brônquica (HACHEM et al., 2005). Tem ainda sido relatado que o aumento da produção de IFN γ , após o estabelecimento de uma resposta TH2, resulta em um aumento do processo inflamatório, possivelmente por induzir a apoptose de células epiteliais e danificar a barreira epitelial, além de induzir a contração de células musculares lisas e promover o remodelamento das vias aéreas (REISINGER et al., 2005; revisado por HOLGATE; POLOSA, 2008).

Nesse estudo apenas o tratamento com (*S*)-(+)-carvona foi capaz de modular a produção de IFN- γ com aumento no infiltrado de células e muco no pulmão, sugerindo que o aumento na produção de IFN- γ , nesse cenário, não tenha sido protetor ou tenha ainda, exacerbado o processo inflamatório.

Com o objetivo de verificar se os enantiômeros da carvona apresentam efeitos inibitórios sobre o processo de sensibilização com OVA, os animais foram tratados 1 hora antes de cada sensibilização. Embora, ambos enantiômeros foram capazes de promover redução do recrutamento de leucócitos no BAL eles não alteraram a proporção de eosinófilos, os níveis séricos de IgE e IFN- γ . Portanto, este tratamento não foi capaz de inibir a sensibilização.

O monoterpeno 1,8-cineol (eucaliptol) apresenta efeito anti-inflamatório na asma brônquica. Esse estudo relata a atividade inibitória desse monoterpeno na produção das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-4 e IL-5 em linfócitos e de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 em monócitos isolados do sangue periférico e, a redução de muco observada nas vias aéreas após o tratamento com esse monoterpeno, se deve ao seu efeito mucolítico direto e a redução da produção de citocinas (JUERGES et al., 2004; BASTOS et al., 2010). Um estudo duplo-cego, realizado em pacientes com asma grave, que receberam juntamente ao tratamento com a dexametasona, 220 mg diários de eucaliptol revelou uma diminuição de 36% na dose diária do glicocorticoide, já os pacientes do grupo placebo tiveram uma redução de dose de 16% (JUERGENS, 2003). A atividade antiasmática foi descrita também para o L-mentol e foi atribuída em parte, a inibição da síntese de prostaglandinas e leucotrienos (JUERGENS et al., 1998).

Poucos trabalhos tem demonstrado a capacidade de moléculas quirais influenciar diretamente a indução de respostas induzidas por células T ou a produção específica de citocinas. A quiralidade de um peptídeo sintético, o Pam₃CysSK₄, ligante do TLR-2 (receptor semelhante ao Toll-2), mostrou modular diferentemente a indução de células T específicas (KHAN et al., 2008). Adicionalmente, Hong e colaboradores (2008) relataram que modificações na estrutura química e na quiralidade do nafitopirano foram capazes de modular respostas imunológicas mediadas por células T *helper*.

Um estudo comparativo, em modelo de asma murino, entre o (*R*) e o (*S*)-albuterol, um agonista β -adrenérgico, revelou que embora ambos sejam capazes de reduzir a migração de células inflamatórias para o pulmão e a produção de muco, apenas o (*R*)-albuterol foi capaz de modular negativamente a produção de IL-4. Adicionalmente, foi verificado que o (*S*)-albuterol aumentou o edema intersticial induzido por alérgeno (HENDERSON et al., 2005)..

Esses dados refletem as diferenças nas respostas fisiológicas que podem ser geradas em virtude do arranjo molecular dos átomos no espaço.

Embora nesse estudo ambos os monoterpenos, (*S*)-(+)-carvona e (*R*)-(-)-carvona, tenham apresentado efeitos anti-inflamatórios em modelos de inflamação aguda e reduzido alguns dos aspectos da asma alérgica, apenas a (*R*)-(-)-carvona apresentou potencial anti-asmático, por ter reduzido tanto a produção de IgE OVA-específica como também por ter inibido fortemente o infiltrado de células e muco no pulmão. Ainda, o fato da (*S*)-(+)-carvona inibir a saída de células inflamatórias do parênquima pulmonar e aumentar a produção de muco indica um efeito adverso desse enantiômero em pacientes com asma.

Conclusão



6. Conclusão

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que os enantiômeros da carvona apresentam efeito anti-inflamatório e que a (*R*)-(-)-carvona possui potencial anti-asmático, uma vez que:

1. Em linhagem de células:

- Os enantiômeros da carvona foram capazes de inibir a produção de NO em cultura de macrófagos J774A.1 estimulados com IFN- γ e LPS, sem reduzir a viabilidade dessas células.

2. No modelo murino de inflamação aguda:

- O tratamento com (*S*)-(+)-carvona ou (*R*)-(-)-carvona promoveu a inibição do edema de pata formado por diferentes agentes flogísticos: carragenina, zimosan, composto 48/80 e histamina.
- O tratamento com ambos enantiômeros foram capazes de inibir a migração de células para cavidade peritoneal após 2 e 6 horas do estímulo com zimosan.
- O tratamento com os isômeros da carvona não interferiu na produção de IL-1 β em modelo de peritonite induzida por zimosan.
- O tratamento com (*R*)-(-)-carvona, mas não com (*S*)-(+)-carvona inibiu significativamente a produção de TNF- α na peritonite induzida por zimosan.

3. Em modelo de hipersensibilidade das vias aéreas induzido por OVA:

- A quantidade de leucócitos totais presentes na cavidade pleural foi reduzida pelo tratamento com ambos monoterpenos.
- A quantidade de leucócitos totais, bem como de eosinófilos foi reduzida pelos enantiômeros da carvona no BAL.
- O tratamento com (*R*)-(-)-carvona, mas não com (*S*)-(+)-carvona, foi capaz de reduzir o infiltrado de células inflamatórias no pulmão.

-
- O tratamento com (*R*)-(-)-carvona promoveu a inibição da produção de muco por células caliciformes do pulmão, enquanto que o tratamento com (*S*)-(+)-carvona promoveu a formação de muco.
 - Apenas o tratamento com (*R*)-(-)-carvona foi capaz de promover diminuição do título de IgE no soro.
 - O tratamento com (*R*)-(-)-carvona promoveu aumento de IL-10, enquanto que com o tratamento com (*S*)-(+)-carvona resultou no aumento de IFN- γ no BAL.
 - O tratamento com os enantiômeros antes das sensibilizações promoveu redução de leucócitos no BAL, porém não foi capaz de inibir o recrutamento de eosinófilos, nem reduzir a produção de IgE ou modificar o nível de IFN- γ no BAL.

Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKINS, B.; BU, Y.; VINCEK, V.; GUEVARA, P. The Primary Responses of Murine Neonatal Lymph Node CD4⁺ Cells are Th2-skewed and are Sufficient for the Development of Th2-biased Memory. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 10, p. 43-51, 2003.

AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. **Clinical Cancer Research**, v. 15, p. 425–430; 2009.

AGRANAT, I.; CANER, H.; CALDWELL, J. Putting chirality to work: The strategy of chiral switches. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 753–768, 2002.

AGUIAR-FILHO, A. S.; LOPES-NETO, E. P. A.; SARINHO, E. S, C.; VASCONCELOS, M. M.; LIMA, D. S. T.; WIRTSBIKI, P. M. Prevalência de asma em funcionários de hospital universitário avaliada por meio de questionário de saúde respiratória da Comunidade Européia. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, p. 390-397, 2005.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTE, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4 ed. New York: Garland Science; 2002.

ALI, I.; GUPTA, V. K.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; SINGH, P.; SHARMA, B. Role of racemization in optically active drugs development. **Chirality**, v. 19, p. 453–463, 2007.

ALLEN, D. B. Effects of inhaled steroids on growth, bone metabolism, and adrenal function. **Advances in Pediatrics**, v. 53, p.101-110, 2006.

ALLER, M.A.; ARIAS, J.L.; ARIAS, J.I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. Then inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, p. 225 – 234, 2006.

ALMEIDA, R. N.; SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; CLAUDINO, F. S.; ARAÚJO.; D. A. M.; LEITEC, J. R.; MARTTEI, R. Anticonvulsant effect of a natural compound - epoxy-carvone and its action on the nerve excitability, **Neuroscience Letters**, v. 443, p. 51-55, 2008.

AL-RAMLI, W.; PRÉFONTAINE, D. F.; MARTIN, J. G.; OLIVENSTEIN, R.; LEMIÈRE, C.; HAMID, Q. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, p. 1185–1187, 2009.

ARMAKA, M.; PAPANIKOLAOU, E.; SIVROPOULOU, A.; ARSENAKIS, M. Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of herpes simplex virus type 1. **Antiviral Research**, v. 43, p.79–92, 1999.

AJUEBOR, M. N.; FLOWER, R. J.; HANNON, R.; CHRISTIE, M.; BOWERS, K.; VERITY, A.; PERRETTI. M. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1

recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 63, p 108-116, 1998.

BAKER, G. B.; PRIOR, T. I. Stereochemistry and drug efficacy and development: Relevance of chirality to antidepressant and antipsychotic drugs. **Annals of Internal Medicine**, v. 34, 537–543, 2002.

BARNES, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 183-192, 2008.

BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. Substâncias enantiomericamente puras (SEP): A Questão dos Fármacos Quirais. **Química Nova**, v. 20, p. 647-656, 1997.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. Rio de Janeiro: Artmed, 2001.

BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 413–420, 2008.

BASTOS, V. P. D.; GOMES, A. S.; LIMA, F. J. B.; BRITO, T. S.; SOARES, P. M. G.; PINHO, J. P. M.; SILVA, C. S.; SANTOS, A. A.; SOUZA, M. H. L. P.; MAGALHÃES, P. J. C. Inhaled 1,8-Cineole Reduces Inflammatory Parameters in Airways of Ovalbumin-Challenged Guinea Pigs. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 108, p. 34–39, 1998.

BERTOLINI, A.; OTTANI, A.; SANDRINI, M. Dual acting anti-inflammatory drugs: A reappraisal. **Pharmacological Research**, v. 44, p. 437 – 450, 2001.

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.

BIELORY, L.; LEONOV, A. Stereoconfiguration of antiallergic and immunologic drugs. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 100, p. 1-9, 2008.

BIGHETTI, E. J. B.; HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; BRITO, A. R. M. S. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 1447-1453, 1999.

BISCHOFF, J.; BRASEL, C. Regulation of P-selectin by tumor necrosis factor-alpha. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 210, p. 174-180, 1995.

BLYTH, D. I.; PEDRICK, M.S.; SAVAGE, T. J.; HESSEL, E. M; FATTAH D. Lung inflammation and epithelial changes in a murine model of atopic asthma. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 4, p. 425-38, 1996.

BOLE-VUNDUK, B.; VERHNJAK, K.; ZMITEK, J. Anti-inflammatory, analgesic and ulcerogenic properties of S-(+)-ibuproxam, racemic ibuproxam-beta-cyclodextrin and S-(+)-ibuproxam-beta-cyclodextrin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, p. 1153-1157, 1996.

BORISH, L. IL-10: evolving concepts. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 101, p. 293–297, 1998.

BUCKINGHAM, J. **Dictionary of natural products**, vol. 4. London: Chapman & Hall, p. 3824, 1994.

BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107, p. 139 – 154, 2005.

BYRUM, R. S., GOULET, J. L., SNOUWAERT, J. N., GRIFFITHS, R. J., KOLLER, B. H. Determination of the contribution of cysteinyl leukotrienes and leukotriene B4 in acute inflammatory responses using 5-lipoxygenase- and leukotriene A4 hydrolase-deficient mice. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 6810–6819, 1999.

CALDWELL, J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drugs metabolism. **Journal of Chromatography**, v. 694, p. 39-48, 1995.

CANER, H.; GRONER, E.; LEVY, L.; AGRANAT, I. Trends in the development of chiral drugs. **Drug Discovery Today**, v. 9, p. 105–110, 2004.

CARVALHO, C. C.; FONSECA, M. M. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemistry**, v. 95, p. 413–422, 2006.

CASTARDO, J. C.; PRUDENTE, A. S.; FERREIRA, J.; GUIMARÃES, A. L.; MONACHED, F. D.; FILHO, V. C.; OTUKIA, M. F.; CABRINIA, D. A. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 405-411, 2008.

CHAKIR, J.; SHANNON, J.; MOLET, S.; FUKAKUSA, M.; ELIAS, J.; LAVIOLETTE, M.; BOULET, L-P.; HAMID, Q. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF- β , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 1293–1298, 2003.

CHAUSSABEL, D.; PASCUAL, V.; BANCHEREAU, J. Assessing the human immune system through blood transcriptomics. **BMC Biology**, v. 8:84, p. 1-14, 2010.

CHEN, J.; JEPPESEN, P. B.; ABUDULA, R.; DYRSKOG, S. E.; COLOMBO, M.; HERMANSEN, K. Stevioside does not cause increased basal insulin secretion or beta-cell desensitization as does the sulphonylurea, glibenclamide: studies *in vitro*. **Life Sciences**, v. 78, p.1748–1753, 2006.

CHEN, T. H.; CHEN, S. C.; CHAN, P.; CHU, Y. L.; YANG, H. Y.; CHENG, J. T. Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana*. **Planta Medica**, v. 71, p. 108–113, 2005.

CHERNYAK, L.; TAUBER, A.I. The birth of immunology: Metchnikoff, the embryologist. **Immunology and Cell Biology**, v. 117, p. 218-233, 1988.

COHN, L.; TEPPER, J.S.; BOTTOMLY, K. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. **The Journal of Immunology**, v.61, p. 3813-3816, 1998.

COHN, L. Mucus in chronic airway diseases: sorting out the sticky details. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 306-308, 2006.

COLONNA, M. Can we apply the T_H1-T_H2 paradigm to all lymphocytes? **Nature Immunology**, v. 2, p. 899 - 900, 2001.

COPP, B. R. Antimycobacterial natural products. **Natural Product Reports Articles**, v. 20, p. 535–557, 2003.

COREA G.; FATTORUSSO E.; LANZOTTI V.; DI MEGLIO P.; MAFFIA P.; GRASSIA G.; IALENTI A.; IANARO A. Discovery and biological evaluation of the novel naturally occurring diterpene pepluanone as antiinflammatory agent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 7055–7062, 2005.

CORRY, D. B.; RISHI, K.; KANELIS, J.; KISS, A.; SONG, L-Z, XU, J.; FENG, L.; WERB, Z.; KHERADMAND, F. Decreased allergic lung inflammatory cell egression and increased susceptibility to asphyxiation in MMP2-deficiency. **Nature Immunology**, v. 3, p. 347-353, 2003.

CROWELL, P. L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 775–778, 1999.

CUNHA, T. M.; VERRI JR, W. A.; SILVA, J. S; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 102, p. 1755–1760, 2005.

DAI, J-P.;CHEN, J.; BEI, Y.F.; HAN, B-X.; WANG, S. Influence of borneol on primary mice oral fibroblasts: a penetration enhancer may be used in oral submucous fibrosis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 38, p. 276–281, 2009.

DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food Technology**, v. 43, p. 148–155, 1989.

DAVIS, K. L.; MARTIN, E.; TURKO, I. V.; MURAD, F. Novel effects of nitric oxide. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 203–236; 2001.

DE-BOER, T.; RUIGT, G. S. F; BERENDSEN, H. H. G. The IS-selective adrenoceptor antagonist Org 3770 (mirtazapine Remeron) enhances noradrenergic

and serotonergic transmission. **Human Psychopharmacology Clinical and Experimental**, v. 10, p. 107-118, 1995.

DELAQUIS, P. J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 101–109, 2002.

DICKMAN, K. G.; YOUSSEF, J. G.; MATHEW, S. M.; SAID, S. I. Ionotropic Glutamate Receptors in Lungs and Airways Molecular Basis for Glutamate Toxicity. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 30, p. 139-144, 2004.

DOHERTY, N. S.; POUBELK, P.; BORGEAT, P.; BEAVER, T. H.; WESTRICH, G. L.; SCHRADER, N. L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E. **Prostaglandins**, v. 30, p. 769- 776, 1985.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308– 316, 2000.

DRAPIER JC, HIBBS JB. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulphur enzymes in the macrophage effector cells. **The Journal of Immunology**, v. 140, p. 2829-2838, 1988.

DRAPIER JC, HIBBS JB. Murine cytotoxic activated macrophages inhibit aconitase in tumor cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 78, p. 790-797, 1986.

DUDHGAONKAR, S.P., KUMAR, D., NAIK, A., DEVI, A.R., BAWANKULE, D.U., TANDAN, S.K. Interaction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 inhibitors in formalin-induced nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, p. 117– 122, 2004.

DYKE, T. E. V.; SERHAN, C. N. Resolution of Inflammation: A New Paradigm for the Pathogenesis of Periodontal Diseases. **Journal of Dental Research**, v. 82(2), p. 82 – 90, 2003.

EDWARDS, M. R.; BARTLETT, N.W.; CLARKE, D.; BIRRELL, M.; BELVISI, M.; JOHNSTON, S. L. Targeting the NF-kappaB pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 121, p. 1-13, 2009.

EGE, M. J.; FREI, R.; BIELI, C.; SCHRAM-BIIKERK, D.; WASER, M.; BENS, M.R.; WEISS, G.; NYBERG, F.; VAN-HAGE, M. V.; PERSHAGEN, G.; BRUNEKREEF, B.; RIEDLER, J.; LAUENER, R.; BRAUN-FAHRLÄNDER, C.; VON-MUTIUS. Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, p. 1140–1147, 2007.

ELIEL, E. L.; WILEN, S. H. **Stereochemistry of organic compounds**. 1.ed. New York: Wiley Interscience, 1994.

EMONARD, H.; GRIMAUD J-A. Matrix metalloproteinases: a review. **Cellular and Molecular Biology**, v. 36, p. 131-153, 1990.

ERDÖ, S. L. Excitatory amino acid receptors in the mammalian periphery. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 2, p. 426–429, 1991.

ESCANDELL, J. M.; RECIO, M. C.; MÁNEZ, S.; GINER, R. M.; CERDÁ-NICOLÁS, M.; RIOS, J. L. Cucurbitacin *R* reduces the inflammation and bone damage associated with adjuvant arthritis in Lewis rats by suppression of tumor necrosis factor- α in T lymphocytes and macrophages. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 320, p. 581–590, 2007.

FACINCONE, S.; PEREIRA DE SIQUEIRA, A. L.; JANCAR, S.; RUSSO, J. M.; BARBUTO, J. A. M AND MARIANO, M. A novel murine model of late-phase reaction of immediate hypersensitivity. **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 127-133, 1997.

FAHY, J.V. Goblet cell and mucin gene abnormalities in asthma. **Chest**, v. 122, p. 320S- 326S, 2002.

FASSIHI, A. R. Racemates and enantiomers in drug development. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 92, p. 1-14, 1993.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M; DE ABREU CASTRO, M. S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 16, p. 31–37, 1978.

FERREIRA, H. H. A.; LODO, M. L. S.; MARTINS, A. R.; KANDRATAVICIUS, L.; SALAROLI, A. F.; CONRAN, N.; ANTUNES, E.; DE NUCCE, G. Expression of nitric oxide synthases and in vitro migration of eosinophils from allergic rhinitis subjects. **European Journal of Pharmacology**, v. 442, p. 155-162, 2002.

FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokines production by Th1 clones. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 170, p. 2081–2095, 1989.

FISCHER, E. Über die Configuration des Traubenzuckers und seiner Isomeren On the configuration of grape sugar and its isomers]. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v.24, p. 1836–1845, 1891.

FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation a fat chance? **The Journal of Experimental Medicine (JME)**, v. 201, p. 671-674, 2005.

FOREMAN, K. E.; VAPORCIYAN, A. A.; BONISH, B. K.; JONES M. L.; JOHNSON, K. J.; GLOVSKY, M. M.; EDDY, S. M.; WARD, P.A. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 94, p. 1147-1155, 1994.

FRANCOTTE, E. R. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers. **Journal of Chromatography**, v. 906, p. 379–397, 2001.

FRANZIOS, G.; MIROTSOU, M.; HATZIAPOSTOLOU, E.; KRAL, J.; SCOURAS, Z.G.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2690–2694, 1997.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1545–1560, 2002.

FU, C-L.; YE, Y-L.; LEE, Y-L.; BOR-LUEN CHIANG, B-L. Effects of overexpression of IL-10, IL-12, TGF- β and IL-4 on allergen induced change in bronchial responsiveness. **Respiratory Research** v. 7, p. 72, 2006.

GARDNER, E. J.; SIMMONS, M. J.; SNUSTAD, D. P. **Principles of Genetics**. New York: John Wiley and Sons, 649p, 1991.

GONÇALVES, J. C. R.; OLIVEIRA, F. S.; BENEDITO, R. B.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N, ARAÚJO, D. A. M. Antinociceptive Activity of (-)-Carvone: Evidence of Association with Decreased Peripheral Nerve Excitability. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 1017-1020, 2008.

GOULD, M. N.; HOWARD, S.P.; RAJESH, D. Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes as Cancer Therapy - **Patent US 7,056,491 B2**. United States patent, 2006.

GRANGER, R. E.; CAMPBELL, E. L.; JOHNSTON, G. A. R. (+)- and (-)-borneol: Efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2\text{L}$ GABA_A receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 1101–1111, 2005.

GREEN, L.C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSK, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S, TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, p. 883–899, 2010.

GUPTA, A.; MYRDAL, P. B. Development of a perillyl alcohol topical cream formulation. **International Journal Pharmacology**, v. 269, p. 373–383, 2004.

HABTEMARIAM, S. Natural inhibitors of tumour necrosis factor- α production, secretion and function. **Planta Medica**, v. 66, p. 303–313, 2000.

HACHEM, P.; LISBONNE, M.; MICHEL, M. L.; DIEM, S. ROONGAPINUN, S.; LEFORT, J.; MARCHAL, G.; HERBELIN, A.; ASKENASE, P. W.; DY, M.; LEITE-DE-MORAES, M. C. Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress

experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma. **European Journal of Immunology**, v. 35, p. 2793–2802, 2005.

HAILE, S.; LEFORT, J.; JOSEPH, D.; GOUNON, P.; HUERRE, M.; VARGAFTIG, B. B. Mucous cell metaplasia and inflammatory-cell recruitment are dissociated in allergic mice after antibody- and drug-dependent cell depletion in a murine model of asthma. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 20, p. 891-902, 1999.

HAMANN, K. J.; DORSCHIED, R.; KO, F. D.; CONFORTI, A.E.; SPERLING, A. I.; RABE, K.T, White, S. R. Expression of Fas (CD95) and FasL (CD95L) in human airway epithelium, **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 19, p. 537–542, 1998.

HARADA, S. The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. **Biochemical Journal**, v. 392, p. 191–199, 2005.

HART, P. H.; BRAND, C.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V.; PRAGER, R. H.; FINLAY-JONES, J. J. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, v. 49, p. 619–626, 2000.

HARTMANS, K. J.; DIEPENHORST, P. The use of carvone as a sprout inhibitor for potatoes. **Potato Research**, v. 37, p. 445–446, 1994.

HAY, R. J. C.; CHEN, T. R.; MARCY, M.; MCCLINTOCK, P.; YVONNE, R. ATCC cell lines and hybridomas. 8 ed. **Rockville**, 1994.

HENDERSON, W. R. Jr; BANERJEE, E. R.; CHI, E. Y. Differential effects of (S)- and (R)-enantiomers of albuterol in a mouse asthma model, p. 332-340, 2005. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.116, p. 332-340, 2005.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 211-222, 2008.

HIBBS JB, TANITOR RR, VAVRIN Z. Iron depletion: possible cause of tumor cell cytotoxicity induced by activated macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, p. 716-723, 1984.

HIGGS, G. A.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Eicosanoids in inflammation. **Annals of Clinical Research**, v. 16, p. 287–299, 1984.

HILL, S. J.; GANELLIN, C. R.; TIMMERMAN, H.; SCHWARTZ, J. C.; SHANKLEY, N. P.; YOUNG, J. M.; SCHUNACK, W.; LEVI, R.; HAAS, H. L. Classification of histamine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 49, p. 253–278, 1997.

HOGAN, S.P.; MATTHAEI, K.L. I.; YOUNG, J. M. ; KOSKINEN, A.; YOUNG, I. G.; FOSTER, P., S. A novel T cell-regulated mechanism modulating allergen-induced airways hyperreactivity in BALB/c mice independently of IL-4 and IL-5. **The Journal of Immunology**, v.161, p. 1501-1509, 1998.

HOLGATE, A. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8 p. 218-230, 2008.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 116-124, 2008.

HOLT, P. G.; ROSE, A. H.; BATTY, J. E.; TURNER, K. J. Introduction of adjuvant-independent IgE responses in inbred mice: primary, secondary and persistent IgE responses to ovalbumin and ovomucoid. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 65, p 42-50, 1981.

HONG, J-HO.; YU, E. U.; HAN, A. R.; NAM, J. W.; SEO, E-K.; HWANG, E. S. Isoeleutherin and eleutherinol, naturally occurring selective modulators of Th cell-mediated immune responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 371 p. 278-282, 2008.

HORNOK, L. **Cultivation and processing of medicinal plants**. Chichester: John Wiley and Sons, 1992.

HOTHERSALL, J. S.; CUNHA, F. Q.; NEILD, G. H.; NOROHNA-DUTRA, A. A. Induction of nitric oxide synthesis in J774 cells lowers intracellular glutathione: effect of modulated glutathione redox status on nitric oxide synthase induction. **Biochemical Journal**, v. 322, p. 477-481, 1997.

HOTTA, M.; NAKATA, R.; KATSUKAWA, M.; HORI, K.; TAKAHASHI, S.; INOUE, H. Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. **Journal of Lipid Research**, v. 51, p. 132-139, 2010.

HUANG, F-P.; NIEDBALA, W.; WEI, X-Q.; FEMG, G-J.; ROBINSON. J. H. LAM, C.; LIEW, F. Y. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 28, p. 4062–4070, 1998.

HUME, D. A. The mononuclear phagocyte system. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, p. 49–53, 2006.

HUTT, A. J.; O'GRADY, J. Drug chirality: A consideration of the significance of the stereochemistry of antimicrobial agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 37, p. 7–32, 1996.

HWANG, E. S.; SZABO, S. J.; SCHWARTZBERG, P. L.; GLIMCHER, L. H. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. **Science**, v. 307, p. 430-433, 2005.

HYNECK, M.; DENT, J.; HOOK, J. B. Chirality: pharmacological action and drug development. In: BROWN, C. (Ed.) **Chirality in drug design and synthesis**. London: Academic Press, 1990.

IKEDA, T.; YOKOMIZO, K.; OKAWA, M.; TSUCHIHASHI, R.; KINJO, J.; NOHARA, T.; UYEDA, M. Anti-herpes virus type 1 activity of oleanane-type triterpenoids. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 1779–1781, 2005.

ISSEKUTZ, A. C., ISSEKUTZ, T. B. Quantitation and kinetics of blood monocyte migration to acute inflammatory reactions, and IL-1 β , tumor necrosis factor- α , and IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v. 151, p. 2105–2115, 1993.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**. 2. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, JR. P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Immunobiology**. The Immune System in Health and Disease. 5. ed. New York: Garland Science, 2001.

JEPPESEN, P. B.; GREGERSEN, S.; ALSTRUP, K. K.; HERMANSEN, K. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects *in vivo*: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. **Phytomedicine**, v. 9, p. 9–14, 2002.

JEPPESEN, P. B.; GREGERSEN, S.; ROLFSEN, S. E.; JEPSEN, M.; COLOMBO, M.; AGGER, A.; XIAO, J.; KRUHOFFER, M.; ORNTOLT, T.; HERMANSEN, K. Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. **Metabolism**, v. 52, p. 372–378, 2003.

JIANG, D., LIANG, J. & NOBLE, P. W. Hyaluronan in tissue injury and repair. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 23, p. 435–461, 2007.

JIN, N.; NARASARAJU, T.; KOLLIPUTTI, N.; CHEN, J.; LIU, L. Differential expression of GABA_A receptor α subunit in cultured rat alveolar epithelial cells. **Cell and Tissue Research**, v. 321, p. 173–183, 2005.

JONES, D. A.; ABBASSI, O.; MCINTIRE, L. V.; MCEVER, R. P.; SMITH, C.W. P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. **Biophysics Journal**, v. 65, p. 1560–1569, 1993.

JUERGENS, U. R.; STÖBER, M.; VETTER, H. The anti-inflammatory activity of L-menthol compared to mint oil in human monocytes *in vitro*: a novel perspective for its therapeutic use in inflammatory diseases. **European Journal of Medical Research**, v. 3, p. 539–45, 1998.

JUERGENS, U. R.; DETHLEFSEN, U.; STEINKAMP, G.; GILLISSEN, A.; REPGES, R.; VETTER, H. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respiratory Medicine**, v. 97, p. 250–256, 2003.

JUERGENS, U. R.; STÖBER, M.; VETTER, H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes *in vitro*. **European Journal of Medical Research**, v. 17, p. 508–510, 1998.

JUERGENSA, U. R.; ENGELENA, T.; RACKE´B, K.; STO´BER, M.; GILLISSENC, A.; VETTER, H. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 17, p. 281–287, 2004.

KANAOKA, Y.; BOYCE, J.A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. **Journal Immunology**, v. 173, p. 1503-1510, 2004.

KAY, A. B. The role of T lymphocytes in asthma. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 91, p. 59–75, 2006.

KEAN, W. F.; LOCK, C. J.; HOWARD-LOCK, H. E. Chirality in antirheumatic drugs. **Lancet**, v. 338, p.1565–1568, 1991.

KEYNAN, Y.; CARD, C. M.; MCLAREN, P. J.; DAWOOD, M. R.; KASPER, K.; FOWKE, K. R. The role of regulatory T cells in chronic and acute viral infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 1046-1052, 2008.

KHAN M, T.; ATHER, A.; THOMPSON, K. D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v. 67, p. 107–119, 2005.

KHAN, S.; WETERINGS, J. J.; BRITTEN C. M.; JONG, A. R.; GRAAFLAND, D.; MELIEF, C. J. M.; VAN DER BURG, S. H.; VAN DER MAREL, G.; OVERKLEEF, H.; FILIPPOV, D. V.; OSSENDORP, F. Chirality of TLR-2 ligand Pam₃CysSK₄ in fully synthetic peptide conjugates critically influences the induction of specific CD8⁺ T-cells. **Molecular Immunology**, v. 46, p- 1084-1091, 2009.

KHARMATE, G.; LIU, G.; PATTERSON, E.; KHAN, M. M. Histamine affects STAT6 phosphorylation via its effects on IL-4 secretion: role of H1 receptors in the regulation of IL-4 production. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 277–286, 2007.

KHASAR, S. G.; MCCARTER, G.; LEVINE, J. D. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and *in vitro* sensitization of rat nociceptors. **Journal of Neurophysiology**, v. 81, p.1104–1112, 1999.

KIM, O. K.; MURAKAMI, A.; NAKAMURA, Y.; OHIGASHI, H. Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW 264.7 cells. **Cancer Letters**, v. 125, p. 199–207, 1998.

KLASING, K. C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. **Poultry Science**, v.77, p. 1119-1125, 1998.

KNOBLOCK. K.; WEIGAND, H.; WEIS, N.; SCHWARM, M.; VIGENSCHOW, H. **Action of terpenoids on energy metabolism**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMSNN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia – da Planta ao Medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS/ UFSC, p. 473-474, 2003.

KOLACZKOWSKA, E.; SELJELID, R.; PLYTYCZ, B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, p. 33-42, 2001.

KOLACZKOWSKA, E., SHAHZIDI, S., SELJELID, R., VAN ROOIJEN, N., PLYTYCZ, B. Early vascular permeability in murine experimental peritonitis is co-mediated by resident peritoneal macrophages and mast cells: crucial involvement of macrophage-derived cysteinyl-leukotrienes. **Inflammation**, v. 26, p. 61–71, 2002.

KOLACZKOWSKA, E.; KOZIOL, A.; PLYTYCZ, B.; ARNOLD, B. Inflammatory macrophages, and not only neutrophils, die by apoptosis during acute peritonitis **Immunobiology**, v. 215, p. 492–504, 2010.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL A.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal of Medicine**, v. 113, p. 71–88, 2002.

KRIZBAI, I. A.; DELI, M.A.; PESTENACZ, A.; SIKLOS, L.; SZABO, C. A.; ANDRAS, I.; JOO, F. Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 54, p. 814–819, 1998.

KUMAR, R.K; HERBERT, C.; FOSTER, P. S. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. **Current Drug Targets**, v. 9, p. 485-494, 2008.

KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ROBBINS S. L. Robbins basic pathology, ed. 7, Philadelphia, **Saunders**, 2003.

LAGENTE, V.; MOODLEY, I.; PERRIN, S.; MOTTIN, G.; JUNIEN, J. L. 1994. Effects of isoenzyme-selective phosphodiesterase inhibitors on eosinophil infiltration in the guinea-pig lung. **European Journal of Pharmacology**, v. 255, p. 253-256, 1994.

LAJOIE, S.; LEWKOWICH, I. P.; SUZUKI, Y, CLARK, J. R.; SPROLES, A. A.; DIENGER, K.; BUDELSKY, A. L.; WILLS-KARP, M. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. **Nature Immunology**, 2010.

LANGIER, S.; SADE, K.; KIVITY, S. Regulatory T cells: The suppressor arm of the immune system. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, p112-115, 2010.

LAMPINEN, M.; CARLSON, M.; HAKANSSON, L. D.; VENGE, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. **Allergy**, v. 59, p. 793–805, 2004.

LEE, H. J.; JEONG, H. S.; KIM, D. J.; NOH, Y. H.; YUK, D. Y.; HONG, J. T. Inhibitory Effect of Citral on NO Production by Suppression of iNOS Expression and NF-κB Activation in RAW264.7 Cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, p. 342-349, 2008.

LEE, P. Y.; KUMAGAI, Y.; XU, Y.; LI, Y.; BARKER, T.; LIU, C.; SOBEL, E. S.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; SATOH, M.; REEVES, W. H. IL-1 α modulates neutrophil recruitment in chronic inflammation induced by hydrocarbon Oil. **The Journal of Immunology**, v. 186, p. 1747-54, 2011.

LEITE B. L.; BONFIM, R. R.; ANTONIOLLI, A. R.; THOMAZZI, S. M.; ARAÚJO, A. A.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S.; CAMBUI, E. V.; BONJARDIM, L.R.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Assessment of antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p.1164-1169, 2010.

LIMA, V. R. E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, p. 657-663, 1997.

LIPPE, I.T.; STABENTHEINER, A. Role of nitric oxide in the vasodilator but not exudative component of mustard oil-induced inflammation in rat skin. **Agents Actions**, v. 38, p. C22-4, 1993.

LIU, Y.C.; KHAWAJA, A. M.; ROGERS, D. F. Effects of the cysteinyl leukotriene receptor antagonists pranlukast and zafirlukast on tracheal mucus secretion in ovalbumin-sensitized guinea pigs in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v.124, p. 563-571, 1998.

LLOYD, C. M.; GONZALO, J. A.; NGUYEN, T.; DELANEY, T.; TIAN, J.; OETTGEN, H. Resolution of bronchial hyperresponsiveness and pulmonary inflammation is associated with IL-3 and tissue leukocyte apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 2033–2040, 2001.

LOWENSTEIN, C. J.; PADALKO, E. iNOS (NOS2) at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 2865–2867, 2004.

MACIAN, F.; GARCIA-RODRIGUEZ, C.; RAO, A. Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. **The EMBO Journal**, v. 19, p. 4783-4785, 2000.

MACIEL, M. A. M.; PINTO A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, p. 429-438, 2004.

MAJNO, G. The Healing Hand: Man and Wound in the Ancient World. **Harvard University Press**. Cambridge, MA., USA, 571 pp, 1975.

MAJNO, G.; JORIS, I. Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology. New York: **Oxford University Press**, 2 ed, 2004.

MÄKELÄ, J.M.; KANEHIRO, A.; BORISH, L.; DAKHAMA, A.; LOADER, J.; JOETHAM, A.; XING, Z.; JORDANA, M.; LARSEN, G. L.; GELFAND, E. W. IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 97, p. 6007–6012, 2000.

MALLAVADHANI, U. V.; MAHAPATRA, A.; JAMIL, K.; REDDY, P. S. Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 1576–1579, 2004.

MARCINKIEWICZ, J., GRABOWSKA, A., CHAIN, B. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. **European Journal of Pharmacology**, v. 25, p. 947–951, 1995.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiacea and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 187–195, 2001.

MASCHER, H.; KIKUTA, C.; SCHIEL, H. Pharmacokinetics of menthol and carvone after administration of an enteric coated formulation containing peppermint oil and caraway oil. **Drug Research**, v. 51, p. 465–469, 2001.

MCGEADY, P.; WANSLEY, D. L.; LOGAN, D. A. Carvone and perillaldehyde interfere with the serum-induced formation of filamentous structures in *Candida albicans* at substantially low concentrations than those causing significant inhibition of growth. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 953–955, 2002.

MCKAY, A.; LEUNG, B. P.; MCINNES, I. B.; THOMSON, N. C.; LIEW, F. Y. A Novel Anti-Inflammatory Role of Simvastatin in a Murine Model of Allergic Asthma. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 2903–2908, 2004.

MEDEIROS, R., PASSOS, G. F., VITOR, C. E., KOEPP, J., MAZZUCO, T. L., PIANOWSKI, L. F., CAMPOS, M. M., CALIXTO, J. B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 618–627, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428–35, 2008.

MEHVAR, R.; BROCKS, D. R.; VAKILY, M. Impact of stereoselectivity on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of antiarrhythmic drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 41, p. 533–558, 2002.

MENDES, S. S.; BOMFIM, R. R.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 391–397, 2010.

MILLER, M. J. S.; GRISHAM, M. B. Nitric oxide as a mediator of inflammation? You had better believe it. **Mediators of Inflammation**, v. 4, p. 387–396, 1995.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine–nitric oxide pathway. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 2002–2012, 1993.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUTIUS, E. V.; VERCELLI, D. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p.861-868, 2010.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature – insight review articles**, v. 420, p. 846 – 852, 2002.

NATHAN, C.; XIE, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 13725–13728; 1994.

NEILL, D; MCKENZIE, A. N. J. TH9: the latest addition to the expanding repertoire of IL-25 targets. **Immunology and Cell Biology**, v. 88, p. 502–504, 2010.

NIALS, A. T.; UDDIN, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. **Disease models & mechanisms**, v. 1:p. 213-220, 2008.

NIEDERMEYER, T. H.; LINDEQUIST, U.; MENDEL, R.; GORDES, D.; SCHMIDT, E.; THUROW, K.; LALK, M. Antiviral terpenoid constituents of *Ganoderma pfeifferi*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1728–1731, 2005.

NOËL, F.; VOLPATO, N.; RIBEIRO, A.; EDILENE, B.; TATIANA, C. Estudo de bioequivalência para fármacos que apresentam estereoisomerismo. **Revista Infarma**, v. 16, p. 11-12, 2004.

NIELL, D.R.; McKENZIE, A. N. J. TH9: the latest addition to the expanding repertoire of IL-25 targets. **Immunology and Cell Biology**, v. 88, p. 502–504, 2010.

NÚÑEZ, M. C.; GARCÍA-RUBIÑO, M. E.; CONEJO-GARCÍA, A.; CRUZ-LÓPEZ, O.; KIMATRAI, M.; GALLO, M. A.; ESPINOSA, A.; CAMPOS, J. M. Homochiral drugs: a demanding tendency of the pharmaceutical industry. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 2064-2074, 2009.

O'CONNOR, C. M.; FITZGERALD, M. X. Matrix metalloproteases and lung disease. **Thorax**, v. 49, p. 602-609, 1994.

O'REILLY M, ALPERT R, JENKINSON S, GLADUE RP, FOO S, TRIM S, PETER B, TREVETHICK M, FIDOCK M. Identification of a histamine H4 receptor on human eosinophils--role in eosinophil chemotaxis. **Journal of Receptors and Signal Transduction Research**, v. 22, p. 431–48, 2002.

OLOFSSON, A. M.; ARFORS, K. E.; RAMEZANI, L.; WOLITZKY, B. A.; BUTCHER, E. C. E-selectin mediates leukocyte rolling in interleukin-1-treated rabbit mesentary venules. **Blood Journal**, v. 84, p. 2749- 2758, 1994.

ORIHARA, K.; ODEMUYIWA, S. O.; DIL, N.; ANAPARTI, V.; MOQBEL, R. Expression and roles of glutamate (NMDA) receptors on T cell subsets. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 6, p. 24, 2010.

ORLANDO, R. M.; CARDOSO-FILHO, N.; GIL, E. S.; STRINGHETTA, J. P. S. Importância Farmacêutica de Fármacos Quirais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, vol 5, p. 8-14, 2007.

PACHER, P. L.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315–424, 2007.

PADUCH. R.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 55, p. 315–327, 2007.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 323-333, 2007.

PASTEUR, L. Mémoire sur la relation qui peut exister entre la forme cristalline et la composition chimique, et sur la cause de la polarization rotatoire. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 26, p. 535-538, 1848.

PEANA, A. T.; D'AQUILA, P. S.; CHESSA, M. L.; MORETTI, M. D.; SERRA, G.; PIPPIA, P. (-)-linalool produces antinociception in two experimental models of pain. **European Journal of Pharmacology**, v.460, p. 37–41, 2003.

PEANA, A. T.; D'AQUILA, P. S.; PANIN, F.; SERRA, G.; PIPPIA, P.; MORETTI, M. D. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine**, v. 9, p. 721–726, 2002.

PEANA, A. T.; MARZOCCO, S.; POPOLO, A.; Pinto, A. (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life Sciences**, v. 78, p. 719-723, 2006.

PEARCE, N.; AÏT-KHALED, N.; BEASLEY, R.; MALLOL, J.; KEIL, U.; MITCHELL, E.; ROBERTSON, C. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Thorax**, v. 62 p. 758-766, 2007.

PHELAN, P. D.; ROBERTSON, C. F.; OLINSKY, A. The Melbourne Asthma Study: 1964-1999. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, p. 189-194, 2002.

PISTOLOZZI, M.; BERTUCCI, C. Species-dependent stereoselective drug binding to albumin: A circular dichroism study. **Chirality**, v. 20, p. 552–558, 2008.

POBER, J. S.; SESSA, W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 803-815, 2007.

PUFAHL, A. R.; NANJAPPAN, P. G.; WOODARD, R. W.; MARLETTA, M. A. "Mechanistic probes of N-hydroxylation of L-arginine by the inducible nitric oxide synthase from murine macrophages" **Biochemistry**, v. 31, p. 6822-6828, 1992.

RABE, K. F.; JÖRRES, R.; NOWAK D.; BEHR, N. MAGNUSSEN H. Comparison of the effects of salmeterol and formoterol on airway tone and responsiveness over 24 hours in bronchial asthma. **American Review of Respiratory Disease**, v. 147, p. 1436-1441, 1993.

RAMACHANDRA, U.; SINGLA, M. Surge in Chiral Technologies. **Business Briefing: PharmaGenerics**, p. 50-54, 2002.

RAMOS, R. G.; TALBOTT, E. O.; YOUK, A.; KAROL, M. H. Community urbanization and hospitalization of adults for asthma. **Journal of Environmental Health**, v. 68, p. 26-32, 2006.

RANADE, V. V.; SOMBERG, J. C. Chiral cardiovascular drugs: An overview. **American Journal of Therapeutics**, v. 12, p. 439–459, 2005.

RAO, T. S., CURRIE, J. L., SHAFFER, A. F., ISAKSON, P. C. In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 269, p. 917–925, 1994.

RAPHAEL, T. J.; KUTTAN, G. Immunomodulatory activity of naturally occurring monoterpenes carvone, limonene, and perillic acid. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 25, p. 285–294, 2003.

READDY, A. M.; LEE, J. Y.; SEO, J. H.; KIM, B. H.; CHUNG, E. Y.; RYU, S. Y.; KIM, Y. S.; LEE, C. K.; MIN, K. R.; KIM, Y. Artemisolide from *Artemisia asiatica*: nuclear factor- κ B (NF- κ B) inhibitor suppressing prostaglandin E2 and nitric oxide production in macrophages. **Archives of Pharmacal Research**, v. 29, p. 591–597, 2006.

REDDY, B. S.; WANG, C. X.; SAMAHA, H.; LUBET, R.; STEELE, V.E.; KELLOFF, G. J.; RAO, C. V. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. **Cancer Research**, v. 57, p. 420–425, 1997.

REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H.; WOSTER, P. M. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 803-810, 1998.

REISINGER, J.; TRIENDL, A.; KÜCHLER, E.; BOHLE, B.; KRAUTH, M. T.; RAUTER, I.; VALENT, P.; KOENIG, F.; VALENTA, R.; NIEDERBERGER, V. IFN γ -enhanced allergen penetration across respiratory epithelium augments allergic inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, 973–981, 2005.

REIST, M.; CARRUPT, P. A.; FRANCOTTE, E.; TESTA, B. Chiral inversion and hydrolysis of thalidomide: Mechanisms and catalysis by bases and serum albumin, and chiral stability of teratogenic metabolites. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, p. 1521–1528, 1998.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M.M. BHARAT B. Aggarwal Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1603–1616, 2010.

RIEDLER, J.; BRAUN-FAHRLÄNDER, C.; EDER, W.; SCHREUER, M.; WASER, M.; MAISCH S.; CARR, D.; SCHIERL, R.; NOWAK, D.; VON MUTIUS, E. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. **Lancet**, v. 358, p. 1129–1133, 2001.

ROCHA E SILVA, M.O. Brief history of inflammation. **Handbook of experimental pharmacology**. Eds. Vane, Jr.; Ferreira S.H., New York: Springer-Verlag, p. 6-25, 1978.

ROCK, K. L; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Review of Pathology**, v. 3, p. 99–126, 2008.

ROMERO, J. R. **Fundamentos de estereoquímica dos compostos orgânicos**. 1. Ed. Ribeirão Preto: Holos, p. 15 - 24, 1998.

RUSLAN, M. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 35, p. 454-428, 2008.

RYAN, G.B.; MAJNO, G. Acute inflammation. A review. **The american journal of pathology**, v.86, p. 183–276, 1977.

SAID, S. I.; BERISHA, H. I.; PAKBAZ, H. Excitotoxicity in the lung: N-methyl-D-aspartate-induced, nitric oxide-dependent, pulmonary edema is attenuated by vasoactive intestinal peptide and by inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 93, p. 4688–4692, 1996.

SAID, S. I.; PAKBAZ, H.; BERISHA, H. I.; RAZA, S.; FODA, H. D. NMDA receptor activation: critical role in oxidant tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1300–1302, 2000.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 829-838, 1996.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 240–244, 2000.

SAUTEBIN, L.; IALENTI, A.; IANARO, A.; DI ROSA, M. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 114, p. 323–328, 1995.

SCHETTER, A. J.; HEEGAARD, N. H.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 37–49, 2010.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 93–15, 2006.

SEDGWICK, A. D.; MOORE, A. R.; AL-DUALI, A.; WILLOUGHBY, D. A. Studies into the association between leucocyte accumulation and oedema formation. **Agents Actions**. V. 17, p. 209–213, 1985.

SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 101–137, 2007.

SHERWIN, C. M.; CHRISTIANSEN, I. J.; DUNCAN, H. W. E.; LAY, D. C.; MENCH, J. A.; O'CONNOR, C. E.; PETHERIC, J. C. Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 8, p. 291-305, 2003.

SHIGERU, A.; MARUYAMA, N.; HAYAMA, K.; ISHIBASHI, H.; INOUE, S.; OSHIMA, H.; YAMAGUCHI, H. Suppression of tumor necrosis factor- α -induced neutrophil adherence responses by essential oils. **Mediators of Inflammation**, v. 12, p. 323-328, 2003.

SHIMIZU, T.; HIRANO, H.; MAJIMA, Y.; SAKAKURA, Y. A mechanism of antigen-induced mucus production in nasal epithelium of sensitized rats; a comparison with lipopolysaccharide-induced mucus production. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, p. 1648-54, 2000.

SHIMIZU, T.; SHIMIZU, S.; HATTORI, R.; MAJIMA, Y. A mechanism of antigen-induced goblet cell degranulation in the nasal epithelium of sensitized rats. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, p. 119-125, 2003.

SHIMIZU, T.; TAKAHASHI, Y.; TAKEUCHI, K.; MAJIMA, Y.; SAKAKURA, Y. Role of neutrophil elastase in endotoxin-induced mucus hypersecretion in rat nasal epithelium. **Annals of Otology, Rhinology and Laryngology**, v.109, p. 1049-1054, 2000.

SHINDO, H.; CALDWELL, J. Development of chiral drugs in Japan: an update on regulatory and industrial opinion. **Chirality**, v. 7, p. 349-352, 1995.

SICHERER, S.H.; LEUNG, D.Y. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insect stings. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 114, p. 118-124, 2004.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 277–283, 2003.

SIMMONS, D.L. What makes a good anti-inflammatory drug target? **Drug Discovery Today**, v. 11, p. 210-219, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS / UFSC, p. 387-415, 1999.

SMITH, S. W. Chiral Toxicology: It's the Same Thing. Only Different. **Toxicological Sciences**, v. 110, p. 4–30, 2009.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Organic chemistry**. 7. ed. New York: Ed. John Wiley & Sons, p.184-210, 2000.

SOUSA, D. P.; NÓBREGA, F. F. F.; ALMEIDA, R. N. Influence of the Chirality of (R)-(-)- and (S)-(+)-carvone in the Central Nervous System: A Comparative Study. **Chirality**, v. 19, p. 264-268, 2007.

SUESA, N.; FERNANDEZ, M. F.; GUTIERREZ, M.; RUFAT, M. J.; ROTLLAN, E.; CALVO, L.; MAULEON, D.; CARGANICO, G. Stereoselective cyclooxygenase inhibition in cellular models by the enantiomers of ketoprofen. **Chirality**, v. 5, p. 589–595, 1993.

TATEMOTO, K.; NOZAKI, Y.; TSUDA, R.; KONNO, S.; TOMURA, K.; FURANO, M.; OGASAWARA, H.; EDAMURA, K.; TAKAGI, H.; IWAMURA, H.; NOGUCHI, M.; NAITO, T. Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 349, p. 1322–1328, 2006.

TAKESHITA, K.; SAKAI, K.; BACON, K. B.; GANTNER, F. Critical Role of Histamine H4 Receptor in Leukotriene B4 Production and Mast Cell-Dependent Neutrophil Recruitment Induced by Zymosan in Vivo. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 307, p. 1072–1078, 2003.

TARAYRE, J. P.; ALIAGA, M.; BARBARA, M.; VILLANOVA, G.; CAILLOL, V.; LAURESSERGUES, H. Pharmacological study of cantharidin-induced ear inflammation in mice. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 11, p. 271–277, 1984.

THALL, E. When Drug Molecules Look in the Mirror. **Journal of Chemical Education**, v. 73, p. 481-485, 1996.

TJOLSEN, A.; BERGE, O-G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5–17, 1992.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature– insight review articles**, v. 420, p. 852 – 859, 2002.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 2474–2478, 2005.

TSAI, P. J.; TSAI, T. H.; YU, C. H.; HO, S. C. Evaluation of NO-suppressing activity of several Mediterranean culinary spices. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45 p. 440–447, 2007.

UMETSU, D. T.; DEKRUYFF, R. H. The regulation of allergy and asthma. **Immunological Reviews**, v. 212, p. 238-255, 2006.

VAKILY, M., MEHVAR, R.; BROCKS, D. Stereoselective pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-asthma agents. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 36, p. 693–701, 2002.

VERRI JR, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 116–138, 2006.

WAINER, I. W.; GRANVIL, C. P. Stereoselective separations of chiral anticancer drugs and their application to pharmacodynamic and pharmacokinetic studies. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 15, p. 570–575, 1993.

WATTENBERG, L. W.; SPARNINS, V. L.; BARANY, G. Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. **Cancer Research**, v.49, p. 2689–2694, 1989.

WENZEL, S. E. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. **Lancet**, v. 368, p. 804-813, 2006.

WILLIAMS, K. M. Enantiomers in arthritic disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 46, p. 273–295, 1990.

WILLS-KARP, M. Murine models of asthma in understanding immune dysregulation in human asthma. **Immunopharmacology**, v.48, p. 263-268, 2000.

WILSON, A. P. "Cytotoxicity and viability". In Masters, John R. W. **Animal Cell Culture: A Practical Approach**. Oxford, vol. 1, 3 ed. 2000.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 93-106, 2006.

WILSON, H. **Egyptian food and drink**. Aylesbury, UK: Shire Publishers, 1988.

WONG, K. L.; LIN, J. W.; LIU, J. C. H.; YANG, H. Y.; KAO, P. F.; CHEN, C. H.; LOH, S. H.; CHIU, W. T.; CHENG, T. H.; LIN, J. G.; HONG, H. J. Antiproliferative effect of isosteviol on angiotensin-II-treated rat aortic smooth muscle cells. **Pharmacology**, v. 76, p. 163–169, 2006.

WSOL, V.; SKALOVA, L.; SZOTAKOVA, B. Chiral inversion of drugs: Coincidence or principle? **Current Drug Metabolism**. v. 5, p.517–533, 2004.

XIANG, Y-Y.; WANG, S.; LIU, M, HIROTA, J. A.; LI,J.; JU, W.; FAN, Y.; KELLY, M. M, YE, B.; ORSER, B.; O'BYRNE, P. M.; INMAN, M. D.; YANG, X.; WEI-YANG.; LU, W-Y. A GABAergic system in airway epithelium is essential for mucus overproduction in asthma. **Nature Medicine**, v. 13, p. 862-867, 2007.

XIE, Q. W.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 4705–4708, 1994.

YOUNIS, Y. M. H.; BESHIR, S. M. Carvone-rich essential oils from *Mentha iongifolia* (L.), *Huds. ssp. schimperi* Briq. and *Mentha spicata* L. grown in Sudan. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 539–541, 2004.

ZHANG, M. Q.; TERLAAK, A. M.; TIMMERMAN, H.; ZHANG, M. Q. Structure-activity relationships within a series of analogues of the histamine H₁-antagonist terfenadine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 165–173, 1993.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Anethofuran, carvone, and limonene – potential cancer chemopreventive agents from dill weed oil and caraway oil. **Planta Medica**, v. 58, p. 338–341, 1992.