

KARINA CARLA DE PAULA MEDEIROS

**EFEITO IMUNOMODULADOR DO KANFEROL GLICOSILADO
EM MODELO DE ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA “PROF.
DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**João Pessoa - PB
2009**

KARINA CARLA DE PAULA MEDEIROS

**EFEITO IMUNOMODULADOR DO KANFEROL GLICOSILADO
EM MODELO DE ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL**

**Tese apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos do Laboratório de Tecnologia
Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros
da Universidade Federal da Paraíba, para
obtenção do título de DOUTORA EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de
Concentração: FARMACOLOGIA.**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam (UFPB)

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Momtchilo Russo (USP)

**João Pessoa - PB
2009**

M488e

Medeiros, Karina Carla de Paula.

Efeito imunomodulador do Kanferol glicolisado em modelo de asma alérgica experimental/ Karina Carla de Paula Medeiros. - João Pessoa: UFPB, 2009.

125f. : il.

Orientadora: Márcia Regina Piuvezam.

Co-orientador: Momtchilo Russo.

Tese (Doutorado) – UFPB /CCS.

1.Flavonóide 2.Kanferol glicosilado. 3.Asma alérgica. 4. Ovalbumina. 5. Hiperreatividade brônquica.

UFPB/BC

CDU : 547.9(043)

KARINA CARLA DE PAULA MEDEIROS

**EFEITO IMUNOMODULADOR DO KANFEROL GLICOSILADO
EM MODELO DE ASMA ALÉRGICA EXPERIMENTAL**

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam
Departamento de Fisiologia e Patologia – CCS/UEPB
(Orientadora)

Prof. Dr. Cláudio Roberto Bezerra Santos
Departamento de Fisiologia e Patologia – CCS/UEPB
(Examinador Interno)

Profa. Dra. Liana Clébia Soares Lima de Moraes
Departamento de Fisiologia e Patologia – CCS/UEPB
(Examinador Interno)

Profa. Dra. Camila Alexandrina Viana Figueiredo
Departamento de Biorregulação – ICS/UFBA
(Examinador Externo)

Profa. Dra. Carlúcia Ithamar Franco
Departamento de Fisioterapia – ICB/UEPB
(Examinador Externo)

“Não creio ser um homem que saiba, tenho sido sempre um homem que busca”

Hermann Hesse

Dedicatória

“Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Jurandir Medeiros e Neli de Paula Medeiros meus verdadeiros mestres, pelo incentivo constante, exemplo de vida e por hoje eu estar aqui.

Ao meu esposo, Alex Ronyer de Queiroz Leite Medeiros, pelo amor compartilhado, e por sempre me apoiar de coração em todas as decisões tomadas.”

Agradecimientos



AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, por me dar sabedoria e inteligência para trilhar o meu caminho, conseguir enfrentar as dificuldades e ser capaz de conquistar meus objetivos.

Aos meus irmãos Vinícius e Úrsula, meus cunhados Raissa e Arturo e meus sogros Yeda e Ronaldo pela força e incentivo durante todo o meu doutorado.

A Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam por todos os ensinamentos de vida dados no decorrer dessa jornada, pela orientação, amizade, paciência, e pelo exemplo de competência, honestidade e ética.

Ao Prof. Dr. Momtchilo Russo por me acolher em seu laboratório durante quase três anos na elaboração de quase todos os experimentos desta tese, pela orientação e as brilhantes discussões em imunologia durante os seminários dos laboratórios e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

A professora Tânia Sarmiento e aos alunos Roberto Jeferson e Kristerson Freire pela preparação e fornecimento dos flavonóides utilizados neste trabalho.

Aos alunos do laboratório de Imunologia da USP: Juciane, Carina, Alexandra, Juliana, Ana Paula, Érica, Renato, Rafael, Ester e Lucas pelo excelente acolhimento, apoio técnico, amizade e ambiente descontraído encontrado diariamente.

Ao doutorando Lucas Faustino pelo apoio constante e paciência na realização dos experimentos com citometria de fluxo.

Aos alunos do laboratório de Imunologia da UFPB: Nilson, Rogério, Giciane, Daniele, Herman, Juliana, Gabriele, Saionara, Jaime e Fagner pela amizade e apoio encontrado, especialmente durante a escrita da tese.

Aos professores de pós-graduação da USP e da UFPB pelos valiosos ensinamentos em imunologia e farmacologia.

A todos os funcionários e técnicos do ICS/USP e LTF/UFPB, em especial Eliane Nascimento e Paulo Albe por todos os serviços prestados e por proporcionar um ambiente favorável à realização dos experimentos.

Aos colegas de doutorado: Henrique, Alessandra, Nadábia, Fernando, Rosimeire, Marcos, Raline, Roberto e Érica, pela companhia agradável e motivante durante as disciplinas do doutorado cursadas tanto na USP quanto na UFPB.

Aos amigos Islânia Araújo, Marianna Vieira, Fernando Oliveira e em especial a Lucas Faustino e Juciane Oliveira pelas palavras de conforto, carinho e agradável companhia nos momentos alegres e incentivo constante nos momentos difíceis no decorrer desta jornada.

Ao CNPq e a FAPESP pelo Apoio Financeiro.

A todos que de alguma maneira direta ou indireta contribuíram na elaboração deste trabalho, o meu muito obrigado.

Resumo



RESUMO

A asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada por migração celular para os pulmões e hiperreatividade brônquica (HRB). Uma estratégia para o tratamento de doenças alérgicas é o desenvolvimento de novos medicamentos com boa eficácia e poucos efeitos colaterais. Flavonóides são compostos derivados de plantas conhecidos por suas atividades antioxidante, antialérgica e antiinflamatória. Partindo desta premissa, o trabalho teve como objetivo selecionar flavonóides a partir de análises imunofarmacológicas e avaliar os tratamentos profiláticos ou terapêuticos no modelo de asma alérgica experimental. Para tal, os flavonóides testados foram: myricetina, isoramnetina e kanferol glicosilado conhecido por 3-O- $[\beta$ -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -L-ramnopiranosil]-7-O- α -L-ramnopiranosil-kanferol (GRRK). O modelo experimental foi realizado em camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA) e os tratamentos foram antes (profilático) ou após (terapêutico) estabelecer o modelo de asma alérgica experimental. Os três flavonóides inibiram a morte dos animais durante o choque anafilático induzido por OVA e a migração de células da inflamação para os pulmões, entretanto, apenas o GRRK foi usado nos demais experimentos, devido ao seu melhor rendimento no processo de purificação. Os tratamentos profilático e terapêutico com GRRK (30 mg/kg) diminuíram, de forma significativa, o número total de células inflamatórias ($P < 0,05$), de eosinófilos ($P < 0,05$) a produção de IL-5 ($P < 0,05$) e IL-13 ($P < 0,05$) no lavado broncoalveolar (LBA), o título de IgE-OVA-específica ($P < 0,01$) no soro, a hiperreatividade brônquica (HRB) ($P < 0,05$) induzida com metacolina e a produção de muco ($P < 0,001$) pelas células caliciformes de pulmão quando comparados com os animais não tratados com GRRK e sensibilizado com OVA. Os resultados obtidos nos diferentes tratamentos com GRRK foram comparáveis estatisticamente aos efeitos observados no grupo de animais tratados com a droga padrão dexametasona. Além disso, o tratamento com GRRK foi capaz de diminuir: o número de linfócitos T CD4⁺ ($P < 0,001$) e de linfócitos B ($P < 0,001$), a expressão de moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC II) e da molécula CD40 em células apresentadoras de antígeno (CD11b⁺CD11c⁺) do LBA. Embora o tratamento com GRRK tenha induzido um efeito supressor na resposta imune de perfil Th2, não foi capaz de exacerbar a resposta imune Th1 com a produção de IFN- γ . A produção desta citocina se manteve inalterada quando comparada ao grupo de animais não tratados. O tratamento também não foi capaz de alterar a resposta imune reguladora, pois não houve mudança significativa na produção de TGF- β e no número de células TCD4⁺Foxp3⁺, marcador de LT regulador (LT_{Reg}). Esses resultados demonstram que o tratamento com GRRK antes (profilático) ou depois (terapêutico) de estabelecer a asma alérgica experimental, restabeleceu as alterações morfofuncionais das vias aéreas, por um mecanismo modulador das células Th2, embora independente de Th1 e de T_{reg}.

Palavras-chave: flavonóide, kanferol glicosilado, asma alérgica, ovalbumina, hiperreatividade brônquica

Abstract



ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammatory disease characterized by cell migration and bronchial hyperreactivity (HRB). One strategy to treat allergic diseases is the development of new drugs with good efficacy and few side effects. Flavonoids are plant compounds known for its antioxidant, antiallergic and anti-inflammatory activities. Based on this premise, the study aimed to select flavonoids by the immunopharmacological screening and to evaluate prophylactic and therapeutic treatments in the experimental asthma model. For this purpose the flavonoids tested were myricetin, isoramnetin and glycosylated kampherol known as 3-O-[[β -D-glycopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -L-rhamnopyranosyl]-7-O- α -L-rhamnopyranosyl]-kamferol (GRRK). The experimental model was BALB/c mice sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) and the treatments were before (prophylactic) or after (therapeutic) to establishment of the experimental asthma model. The three flavonoids inhibited the animal death during the anaphylactic chock reaction induced by OVA and the inflammatory cell migration to the lung; however only the GRRK was used in the following experiments because of its best yield in the purification process. Both prophylactic and therapeutic treatments with GRRK (30 mg/kg) decreased significantly the total number of inflammatory cells ($P < 0.05$), eosinophils cells ($P < 0.05$), IL-5 ($P < 0.05$) and IL-13 ($P < 0.05$) production from bronchoalveolar lavage (BAL), IgE OVA-specific title ($P < 0.01$) in the sera, the bronchial hyperreactivity (HRB) ($P < 0.05$) induced by methacholine and mucus production ($P < 0.001$) by the globbet cells from the lung as compared with non-treated GRRK animals. The results obtained in the different treatments with GRRK were statistically comparable with that observed in the OVA-sensitized group treated with dexametasone. Moreover, treatment with GRRK was able to reduce the number of CD4⁺ T cells ($p < 0.001$), B cells ($p < 0.001$), expression of major complex of compatibility II class (MHC II class) and CD40 molecules in the antigen presenting cells (CD11b⁺ CD11c⁺) from BAL. Although the GRRK induced a suppressive effect in the Th2 immune response it was not able to exacerbate the Th1 immune response by IFN- γ production. The production of this cytokine was not modified when compared with non treated animals. The GRRK treatment also was not able to modify the regulatory immune response because there was no significant change in the production of TGF- β and the number of TCD4⁺Foxp3⁺, a marker of LT regulatory (T_{Reg}). These results demonstrated that GRRK treatment before (prophylactic) or after (therapeutic) the establishment of allergic asthma, restored the morpho-functional changes in the airways by Th2-dependent immunossuppression, although independent of Th1 and T_{Reg}.

Key-words: flavonoid, glycoside kampherol, allergic asthma, ovalbumin, bronchial hyperreactivity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química dos flavonóides estudados. (A) kanferol glicosilado-3-O-[β -D-glycopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -L-ramnopiranosil]-7-O- α -L-ramnopiranosil-kanferol (GRRK), (B) isoramnetina-3-metil, 4',3,5,7-tetrahidroxiflavona e (C) myricetina-3,3',4',5,5',7-hexahidroxiflavona).....5
- Figura 2.** Estrutura química do núcleo básico de flavonóides.....8
- Figura 3.** Características do mecanismo imunológico da asma alérgica.....13
- Figura 4.** Foto do aparelho para medida de hiperreatividade brônquica (HRB)-pletismógrafo de corpo inteiro (BUXCO Eletronics, EUA).....38
- Figura 5.** Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre o infiltrado inflamatório em cortes histológicos pulmonares.....55
- Figura 6.** Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre a produção de muco em cortes histológicos pulmonares.....58
- Figura 7.** Efeito do tratamento terapêutico com GRRK sobre o infiltrado inflamatório em cortes histológicos pulmonares.....66
- Figura 8.** Efeito do tratamento terapêutico com GRRK sobre a produção de muco em cortes histológicos pulmonares.....69
- Figura 9.** Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre o percentual de linfócitos T CD4⁺ e LB do LBA em modelo de asma alérgica experimental.....75
- Figura 10.** Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre a expressão de moléculas MHC de classe II, CD40 e CD80 de células apresentadoras de antígenos (APCs) do LBA em modelo de asma alérgica experimental.....78

Figura 11. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre o percentual de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺ do LBA em modelo de asma alérgica experimental.....82

Figura 12. Possível local (X) de ação do GRRK na asma alérgica experimental.....104

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** Obtenção dos flavonóides isoramnetina e myricetina isolados do extrato fenólico de pólen.....28
- Esquema 2.** Obtenção do kanferol glicosilado (GRRK) isolados de *Solanum asperum* Richard.....30
- Esquema 3.** Modelo de asma alérgica experimental.....33
- Esquema 4.** Esquema do protocolo de tratamento profilático com GRRK.....37
- Esquema 5.** Esquema do protocolo de tratamento terapêutico com GRRK.....37

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Efeito dos flavonóides isoramnetina (ISO), myricetina (MYR) e GRRK no número de células totais (A) e de eosinófilos do LBA (A) em modelo de asma alérgica experimental.....48
- Gráfico 2.** Efeito do GRRK (s.c.) na quantificação de TNF- α em camundongos BALB/c elicitados com LPS i.v.50
- Gráfico 3.** Efeito do GRRK em diferentes vias de administração sobre o número de células totais do LBA em modelo de asma alérgica experimental.....52
- Gráfico 4.** Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre o número de células totais (A) e de eosinófilos do LBA (B) em modelo de asma alérgica experimental..... 54
- Gráfico 5.** Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre o índice de muco de cortes histológicos pulmonares em modelo de asma alérgica experimental.....57
- Gráfico 6.** Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre a hiperreatividade brônquica em modelo de asma alérgica experimental.....60
- Gráfico 7.** Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre a produção de citocinas de LBA em modelo de asma alérgica experimental.....62
- Gráfico 8.** Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre o título de IgE OVA-específica de soro em modelo de asma alérgica experimental.....63
- Gráfico 9.** Efeito do tratamento terapêutico com GRRK sobre o número de células totais (A); de eosinófilos do LBA (B); em modelo de asma alérgica experimental.....65

Gráfico 10. Efeito do tratamento terapêutico com GRRK sobre o índice de muco de pulmão em modelo de asma alérgica experimental.....	68
Gráfico 11. Efeito do tratamento terapêutico com GRRK sobre a hiperreatividade brônquica em modelo de asma alérgica experimental.....	70
Gráfico 12. Efeito do tratamento terapêutico com GRRK sobre a produção de citocinas do LBA em modelo de asma alérgica experimental.....	72
Gráfico 13. Efeito do tratamento terapêutico com GRRK sobre a produção de IgE anti-OVA de soro em modelo de asma alérgica experimental.....	73
Gráfico 14. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre o número de linfócitos T CD4 ⁺ e LB do número total de células do LBA em modelo de asma alérgica experimental.....	76
Gráfico 15. Efeito do tratamento profilático com GRRK na produção de IFN- γ de linfonodo mediastinal (mLN) em modelo de asma alérgica experimental.....	80
Gráfico 16. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre o número de linfócitos CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ do número total de células do LBA em modelo de asma alérgica experimental.....	83
Gráfico 17. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre a produção de TGF- β do LBA em modelo de asma alérgica experimental.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação dos flavonóides isoramnetina (ISO), myricetina (MYR) e GRRK na citotoxicidade em células L929 de camundongos BALB/c.....	46
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
APC	célula apresentadora de antígeno
Al(OH) ₃	hidróxido de alumínio
B220	marcador número 220 de linfócito B
CD ₄	grupamento de diferenciação de linfócito T auxiliar
CD40	grupo de diferenciação 40
CD80	grupo de diferenciação 80 (B71)
CEPA	comitê ético de pesquisas animais
COX	ciclooxigenase
DMSO	dimetilsulfóxido
EAE	encefalomielite autoimune experimental
ECP	proteína catiônica eosinofílica
ELISA	ensaio imunoenzimático
EPO	peroxidase eosinofílica
FACS	Analisador de citometria de fluxo
Foxp3	Fator de transcrição
GM-CSF	fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago
GRRK	3-O-[β-D-glycopiranosil-(1→6)-α-L-ramnopiranosil]-7-O-α-L-ramnopiranosil-kanferol
HE	Hematoxilina e eosina
HRB	Hiperreatividade Brônquica
IgE	imunoglobulina E
INF-γ	interferon gama
IL-1	interleucina 1
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12

IL-13	interleucina 13
IL-17	interleucina 17
IL-23	interleucina 23
IL-35	interleucina 35
IV	infravermelho
i.d.	via intradérmica
i.n.	via intranasal
i.p.	via intraperitonreal
i.v.	via intravenosa
JAK-3	janus cinase tipo 3
LBA	lavado bronco alveolar
LPS	lipopolissacarídeo
LB	linfócito B
mLN	linfonodo mediastinal
LT	linfócito T
LT _{reg}	linfócito T regulador
LTC	leucotrienos
MHC -II	complexo principal de histocompatibilidade de classe II
NF κ B	fator de transcrição nuclear kappa B
iNOS	Sintase se óxido nítrico induzida
OVA	ovalbumina
PAS	Ácido Periódico-Schiff
PBS	solução fosfato tamponada bisódica
PI3K	fosfatidilisitol 3-cinase
PLC	fosfolipase C
PG	prostaglandinas
PCA	anafilaxia cutânea passiva
SDF-1	fator derivado de células estromais do tipo 1
s.c.	via subcutânea
STAT-1	transdutor de sinal e ativador de transcrição tipo 1
STAT- 3	transdutor de sinal e ativador de transcrição tipo 3
STAT- 4	transdutor de sinal e ativador de transcrição tipo 4
STAT- 6	transdutor de sinal e ativador de transcrição tipo 6

TGF- β	fator beta de transformação de crescimento
Th1	linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	linfócito T auxiliar do tipo 2
Th17	linfócito T auxiliar do tipo 17
TNF- α	fator alfa de crescimento tumoral
v.o.	via oral

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE ESQUEMAS	V
LISTA DE GRÁFICOS	VI
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 A utilização dos produtos naturais.....	2
1.2 Flavonóides como ferramenta potencialmente terapêutica.....	7
1.3 Aspectos gerais da asma alérgica.....	11
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
<u>Material</u>	26
3.1 Animais.....	26
3.2 Obtenção e caracterização de flavonóides.....	26
3.2.1 Obtenção e caracterização de isoramnetina e myricetina isolados do extrato fenólico do pólen.....	26
3.2.2 Obtenção e caracterização do kanferol glicosilado (GRRK) isolado de <i>Solanum asperum</i> Richard.....	28
<u>Métodos</u>	31

3.3 Teste de toxicidade de isoramnetina, myricetina e GRRK em modelo de <i>Artemia salina</i>	31
3.4 Ensaio de citotoxicidade de isoramnetina, myricetina e GRRK sobre as células L929.....	31
3.5 Modelo de asma alérgica experimental induzida por ovalbumina (OVA).....	32
3.6 Tratamento <i>in vivo</i> com isoramnetina, myricetina ou GRRK.....	33
3.7 Reação de anafilaxia sistêmica em modelo de asma alérgica experimental.....	34
3.8 Dosagem de TNF- α no modelo de inflamação aguda induzida por LPS.....	34
3.9 Obtenção do soro e do lavado broncoalveolar (LBA).....	35
3.10 Protocolo de caracterização do número de células totais e diferenciais do LBA.....	36
3.11. Protocolo de tratamento profilático ou terapêutico com o GRRK.....	36
3.12 Teste de hiperreatividade brônquica (HRB)	37
3.13 Teste de anafilaxia cutânea passiva (PCA).....	38
3.14 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de IL-5, IL-13 e TGF- β do LBA.....	39
3.15 Obtenção do sobrenadante de cultura de células de linfonodo mediastinal (mLN) para dosagem de IFN- β	40
3.16 Técnica histológica dos pulmões.....	41
3.17 Análise de citometria de fluxo (FACS) na caracterização fenotípica de células do LBA.....	42
3.18 Análise estatística.....	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Avaliação da toxicidade de isoramnetina, myricetina e GRRK em modelo de <i>Artemia salina</i> e no ensaio de citotoxicidade com células L929.....	45

4.2 Análise de isoramnetina, myricetina e GRRK na atividade antiinflamatória e na reação de anafilaxia sistêmica em modelo de asma alérgica experimental.....	47
4.3 Avaliação do efeito do GRRK na dosagem de TNF- α em modelo de inflamação aguda induzida por LPS.....	49
4.4 Investigação do efeito do tratamento profilático com GRRK durante a asma alérgica experimental induzida por OVA.....	51
4.4.1 Efeito profilático do GRRK por diferentes vias de administração sobre o número de células totais do LBA.....	51
4.4.2 Efeito profilático do GRRK sobre o número de células totais e eosinófilos no LBA.....	53
4.4.3 Efeito profilático de GRRK sobre a produção de muco em pulmões de camundongos BALB/c.....	56
4.4.4 Efeito profilático de GRRK na HRB.....	59
4.4.5 Efeito profilático de GRRK na produção de citocinas (IL-5, IL-13) do LBA.....	61
4.4.6 Efeito profilático de GRRK na produção de IgE OVA-específica.....	63
4.5 Investigação do efeito do tratamento terapêutico com GRRK durante a asma alérgica experimental induzida por OVA.....	64
4.5.1 Efeito terapêutico do GRRK na migração de células inflamatórias para as vias aéreas.....	64
4.5.2 Efeito terapêutico do GRRK na produção de muco em pulmões de camundongos BALB/c.	67
4.5.3 Efeito terapêutico do GRRK na HRB.....	70
4.5.4 Efeito terapêutico do GRRK na produção de citocinas (IL-5, IL-13 e TGF- β) do LBA.....	71
4.5.5 Efeito terapêutico do GRRK na produção de IgE OVA-específica.....	73
4.6 Avaliação do efeito profilático do GRRK sobre a caracterização fenotípica de células do LBA em modelo de asma alérgica experimental.....	74
4.6.1 Efeito profilático do GRRK sobre os linfócitos T CD4 ⁺ e LB.....	74

4.6.2 Efeito profilático do GRRK sobre a expressão de MHC de classe II, CD40 e CD80 em células apresentadoras de antígenos (APCs)	77
4.7 Investigação do efeito profilático do GRRK sobre a resposta imune reguladora.....	79
4.7.1 Efeito profilático do GRRK sobre a produção de IFN- γ de mLN- Influência na resposta Th1.....	79
4.7.2 Efeito profilático do GRRK na expressão de LT CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ do LBA- Influência na resposta T _{reg}	81
4.7.3 Efeito profilático do GRRK na produção de TGF- β do LBA- Influência na resposta T _{reg}	84
5 DISCUSSÃO.....	86
6 CONCLUSÃO.....	105
REFERÊNCIAS.....	108
APÊNDICE.....	126

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 A utilização dos produtos naturais

O emprego de plantas na medicina popular é uma prática realizada e fundamentada na recuperação de enfermidades e manutenção da saúde. Apesar do surgimento dos medicamentos sintéticos, os estudos de plantas medicinais continuam sendo extensivamente explorados, tendo em vista a grande biodiversidade em todo nosso planeta, em especial os países tropicais (GILANI; RAHMAN, 2005).

Os produtos naturais apresentam-se hoje como uma das principais fontes de recurso terapêutico nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Devido a essa riqueza expressa por estes produtos, apresentam-se como fontes ricas para pesquisa e desenvolvimento, direcionando melhorar a qualidade de vida do ser humano (DILLARD; GERMAN, 2000).

Estima-se que aproximadamente 500.000 espécies ocupam todo o planeta, sendo que, 50 % são angiospermas, e dentre estas 125.000 ocorrem em países tropicais (JACHAK; SAKLANI, 2007). O Brasil é considerado o país que possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético, bastante escasso nos países desenvolvidos, tem atualmente um valor econômico inestimável em diversas áreas (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; CALIXTO, 2005).

Na metade do século XIX cerca de 80% dos remédios eram originados de plantas. Mesmo depois da revolução industrial e do grande domínio dos

medicamentos sintéticos, pelo menos 25% dos medicamentos encontrados no Oriente são de origem vegetal. As plantas são utilizadas em quase todo o mundo como matéria-prima, na forma de extratos, óleos essenciais e substâncias químicas puras ou semi-sintéticas (GILANI; RAHMAN, 2005).

Diversos trabalhos e revisões descrevem a importância de substâncias de fontes naturais para tratar doenças, bem como o papel altamente significativo que os produtos naturais possuem no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN et al., 2003), apesar de que, nos dias atuais, as grandes indústrias farmacêuticas tenham reduzido significativamente a busca por novos agentes terapêuticos a partir de fontes naturais (GULLO; HUGHES, 2005).

Um dos bons exemplos que pode representar tamanha grandeza da flora brasileira é a família Solanaceae (JUSSIEU, 1789), uma das maiores e mais complexas das angiospermas que contém cerca de 2.300 espécies e 96 gêneros (D'ARCY, 1991) e concentra, de forma representativa, espécies extremamente importantes para os seres humanos, incluindo espécies usadas na alimentação e as que produzem drogas potencialmente ativas. Dentre as espécies largamente cultivadas como alimento destacam-se a batatinha (*Solanum tuberosum* L.), o tomate (*Solanum lycopersicon* L.), a berinjela (*Solanum melongena* L.) e a pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.) (AGRA, 1991).

Solanum é o maior gênero da família Solanaceae com cerca de 1.250 espécies (NEE, 1999), habitam sistemas ecológicos estabelecidos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e tem a América do Sul como centro de diversidade e distribuição (AGRA, 1999a). Contudo, possui grande diversidade que não é comum nas angiospermas, tornando-as extremamente interessante

tanto do ponto de vista evolutivo quanto de sua utilidade para o ser humano (KNAPP et al., 2004). Apesar das riquezas e propriedades que as espécies do gênero *Solanum* apresentam, poucas espécies são estudadas quimicamente /ou biologicamente. No nordeste brasileiro são utilizadas na medicina popular e conhecidas principalmente como “jurubeba”, palavra original do Tupi-Guarani, *yu'beba*, devido a presença de espinhos em algumas espécies (AGRA et al., 1999b). O gênero *Solanum* apresenta o centro de biodiversidade no Brasil, com espécies endêmicas, sendo 80 espécies encontradas no nordeste (AGRA, 1999a).

A espécie *Solanum asperum* é encontrada no Brasil nos estados do Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Maranhão, Pará, Paraíba, Pernambuco e Rio de Janeiro (AGRA, 1991), popularmente conhecida como Coça-Coça, Jussara, Jurubeba-Branca e Velame-Bravo (AGRA, 1991), possui características botânicas de arbusto ereto, 2,0-3,0 m de altura com caule cilíndrico, coberto por um indumento denso pulverulento de cor acastanhada, constituído por tricomas estrelados. Folhas opostas lanceoladas, inteiras, sésseis, com 5,0-13 cm de comprimento e 2,0-3,5 cm de largura, com ápice acuminado. Os frutos são bagas globosas, 0,8-1,0 cm de diâmetro, verde escuro com exocarpo pubescente (AGRA, 1991). Suas atividades farmacológicas ainda não foram extensivamente exploradas, apenas dois artigos científicos encontram-se disponíveis na literatura (BARBOSA-FILHO et al., 1991 e SILVA et al., 2005a). Por se tratar de uma espécie do gênero *Solanum* dois metabólitos secundários foram isolados de tal espécie: o tilirosídeo e um flavonóide glicosilado derivado do kanferol, o 3-O-[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -L-ramnopiranosil]-7-O- α -L-

ramnopiranosilkanferol (Figura 1A), sendo este último utilizado como objeto de estudo neste trabalho.

Além do kanferol glicosilado, dois outros flavonóides (isoramnetina e myricetina) (Figura 1B e 1C) foram estudados neste trabalho, sendo isolados de extrato de pólen apícola. Muitas das atividades farmacológicas encontradas no pólen são explicadas devido à presença dos flavonóides. (MEDEIROS et al., 2008)

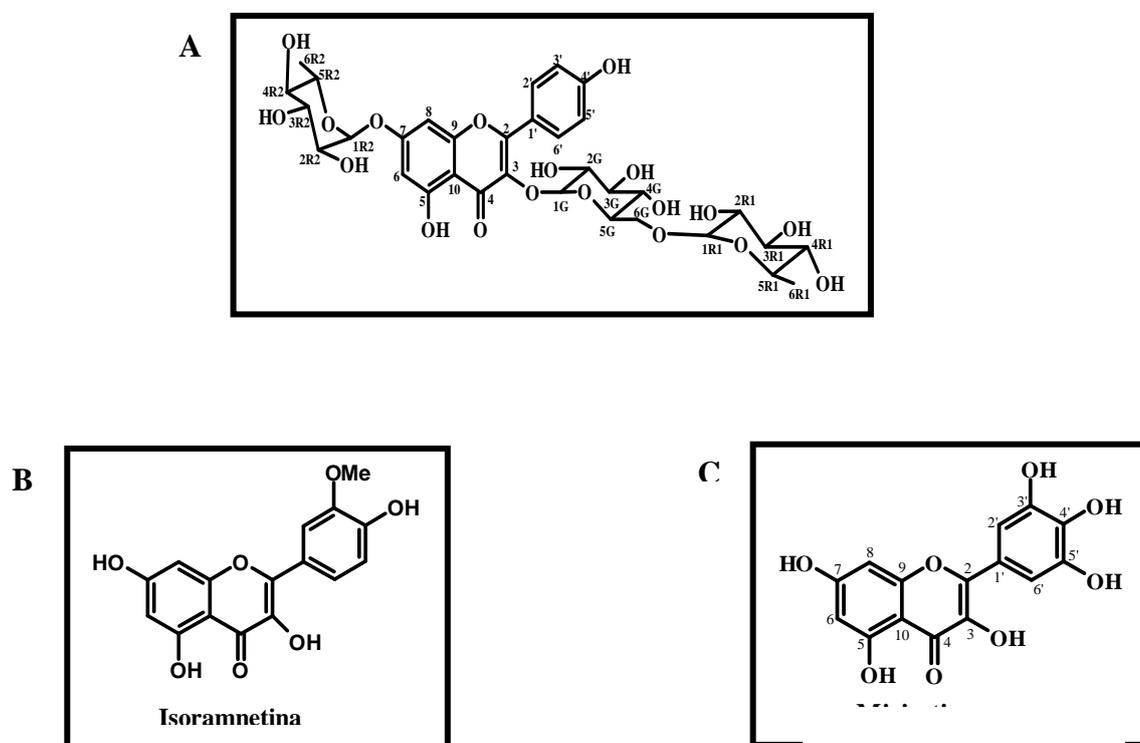


Figura 1. Estrutura química dos flavonóides estudados. (A) kanferol glicosilado- 3-O-[β-D-glycopyranosil-(1→6)-α-L-ramnopiranosil]-7-O-α-L-ramnopiranosil-kanferol (GRRK), (B) isoramnetina- 3- metil, 4',3,5,7-tetrahidroxiflavona e (C) myricetina- 3,3',4',5,5',7-hexahidroxiflavona.

Pólen é definido como o órgão reprodutor masculino da flor, produzido no saco polínico da antera, situado no final extremo do estame (GONZALÉZ, et al., 2005). A função do polinizador é transferir os grãos de pólen das anteras para o estigma que é o órgão reprodutor feminino das flores (GONZALÉZ, et al., 2005).

Nas angiospermas, o pólen pode ser transportado pelo vento, água ou animais, dentre estes, se destacam as abelhas (PAIVA; FIGUEIREDO, 1987). Segundo Peris (1984) “pólen apícola” é o resultado da aglutinação do pólen das flores com néctar e substâncias salivares das abelhas, que se acumulam em “cargas polínicas” (semelhantes a pequenas bolas) e que o homem utiliza após a sua colheita nos caça-polens, depois da secagem, limpeza e empacotamento.

As espécies das plantas cujos polens se originaram são identificadas de acordo com características morfológicas do pólen. O extrato de pólen apícola utilizado neste estudo foi originado das famílias Arecaceae, Mimosoideae, Asteraceae, Cecropiaceae, Solonaceae e Scrophulariaceae (MEDEIROS et al., 2006).

Há séculos o pólen é usado na medicina popular para aliviar ou curar constipações, gripes, úlceras, anemias, alergias, entre outras patologias (LYNGHEIM; SCAGNETTI, 1979; HANSSEN, 1979). Trabalhos científicos confirmam as potencialidades e o interesse terapêutico do pólen usado no tratamento de rinites alérgicas (STAFF et al., 1990), com atividade imunomoduladora em coelhos (DUDOV et al., 1994), atividade hepatoprotetora em camundongos (JUZWIAK, 1993), antiaterogênico (ZHAO et al., 1990), antioxidante (CAMPOS et al., 2003) redução da intensidade da placa aterosclerótica (WOJCICKI et al., 1986) e contribuição para uma menor

agregação plaquetária tanto *in vitro* (WOJCICKI; SAMOCHOWIEC, 1986) como *in vivo* (KOSMIDER et al., 1983).

O pólen é um local de acúmulo de diversos flavonóides. Alguns autores verificaram que os metabólitos secundários existentes nas flores servem de “guias” atraindo os insetos polinizadores até as fontes de néctar e/ou de pólen. Os pigmentos amarelos mais comuns são os carotenóides nas angiospermas, e os flavonóides, que são muito importantes, como matéria corante em significativo número de plantas com flores amarelas (HARBORNE; GRAYER, 1993).

1.4 Flavonóides como ferramenta potencialmente terapêutica

Os vegetais são importantes fontes de produtos biologicamente ativos, conceituados por Gottlieb e colaboradores (1996) como metabólitos especiais ou secundários. A complexidade dos metabólitos secundários biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído como mecanismo de defesa destes vegetais às condições ambientais ricas em microorganismos, insetos, animais e também às condições de adaptações e regulação (REINBOTHE et al., 1990).

Segundo o *Phytochemical Dictionary* (HARBORNE, 1993) existem mais de 50.000 metabólitos secundários isolados de angiospermas, muitos destes ainda sem qualquer avaliação com relação ao seu potencial farmacológico, apenas 2.793 compostos com atividade biológica são bem caracterizados.

Flavonóides são considerados uma das classes de metabólitos secundários que mais impressiona pela notável variedade, pelo número de membros e pela complexidade das estruturas dos constituintes, que podem

apresentar radicais hidroxilas, metilas, glicoses acetiladas, entre outros radicais (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

Esses metabólitos secundários são considerados pigmentos responsáveis pela coloração das pétalas e pela diferenciação das diversas tonalidades das cores amarela, laranja e vermelha das flores (TIMBERLAKE; HENRY, 1986).

Nenhum outro grupo de metabólitos secundários foi creditado por sua grande e variada diversidade de funções de crescimento e desenvolvimento de plantas. Muitos destes papéis são importantes para a sobrevivência, tais como: a atração de vetores para a polinização e dispersão de sementes, estimulação da bactéria *Rhizobium* para fixação de nitrogênio, promoção do crescimento do tubo polínico, reabsorção de nutrientes minerais, e proteção contra radiação UV e agentes oxidantes ou radicais livres (GOULD; LISTER, 2006).

Quimicamente são compostos polifenólicos de baixa massa molar que apresentam um núcleo flavonoídico $C_3-C_6-C_3$, que consiste de três anéis fenólicos referidos como os anéis A, B e C (Figura 2) (KÜHNAU, 1976). O anel A benzeno é condensado com um anel pirano (C), que na posição 2 liga-se a um grupo fenila (B). O anel C pode ser um pirano heterocíclico, formando flavonóis (catequinas), flavonas e flavanonas (AHERNE; O'BRIEN, 2002). Essas substâncias são freqüentemente hidroxiladas nas posições 3,5,7,3',4'. Alguns destes grupos hidroxilas são freqüentemente metilados, acetilados ou sulfatados. Quando glicosilados, as ligações glicosídicas são localizadas normalmente nos oxigênios dos carbonos 3 e 7 e os carboidratos mais comuns são *L*-ramnose, *D*-glicose, glicoramnose, galactose e arabinose podendo-se encontrar também *C*-glicosídeos (HARBONE, 1986).

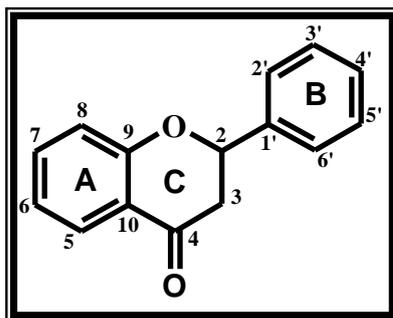


Figura 2. **Estrutura química do núcleo básico de flavonóides.**

Em plantas, os flavonóides são relativamente resistentes ao calor, oxigênio, umidade baixa e moderado grau de acidez, mas podem ser modificados pela luz (KÜHNAU, 1976). A fotoestabilidade dos flavonóides na natureza depende do grupo hidroxila ligado ao C-3 do anel C. A ausência ou glicosilação do grupo hidroxila resulta em maior fotoestabilidade da molécula (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

Os flavonóides além de serem considerados ótimos marcadores quimiotaxonômicos, também são tidos como protetores potenciais contra os efeitos nocivos a saúde, sendo de um modo geral, capazes de modular a atividade de enzimas e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares e desta forma, é considerado alvo de muitos estudos em diferentes linhas de pesquisa (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

São muitas as atividades farmacológicas atribuídas aos flavonóides, dentre elas podemos destacar: atividade anti-hepatotóxica (SOIKE; LENG-PESCHLOW, 1987), anti-hipertensiva (CONSENTINO; VOLPE, 2002), antioxidante (BLASA et al., 2006), hipoglicemiante (PEREZ et al., 2000), antiosteoporótica (EATON-EVANS, 1994), antitumoral (WANG et al., 2005), espasmolítica (LIMA et al., 2005), antiinflamatória (THEORARIDES et al., 2001;

LI et al., 2005), antialérgica (KIMATA et al., 2000, DUAN et al., 2003, WU et al., 2006, FUNAGUCHI et al., 2007)

Dentre as atividades imunofarmacológicas tem sido observado que flavonóides como: astragalina, fisetina, kanferol, myricetina, quercetina, e rutina reduzem a liberação de histamina e triptase de mastócitos, (MIDDELTON; KANDASNAMI; THEOHARIDES, 2000, THEOHARIDES et al., 2001), bem como a produção de leucotrienos, prostaglandina D₂ e fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) de maneira dependente de concentração (CHANG et al., 2000; KIMATA et al., 2000).

Flavonóides demonstram: inibir a produção de interleucina (IL) 6 e IL-8 de mastócitos e de macrófagos (SHICHIJO et al., 2003 e PARK et al., 2008), bem como a produção de IL-4 e IL-13 de basófilos humanos (OGASAWARA et al., 1986, HIRANO et al., 2004); estimular a síntese de interferon-gama (IFN- γ) (SEM; LENGYEL, 1992) inibindo, portanto, o desenvolvimento da asma; ativar linfócitos T citotóxicos e auxiliares (HUGHES, 1999), responsáveis pela resposta imune contra células infectadas por vírus, bactérias ou tumores e inibir a atividade de IL-5, citocina presente nos processos inflamatórios (PARK et al., 1999).

Foi verificado que os flavonóides genisteína, kanferol e quercetina apresentaram efeito antiinflamatório por inibir a expressão da enzima sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) por um mecanismo dependente da inibição de fatores de transcrição STAT-1 e NFkappa-B relacionados com iNOS (HÄMÄLÄINEN et al., 2007).

Alguns flavonóides isolados e estudados na terapia de pacientes portadores de doenças crônicas têm demonstrado bons resultados. O consumo

de flavonóides, como a quercetina, na alimentação desses pacientes, demonstrou diminuir muito dos sintomas de doenças crônicas, como a asma. (KNEKT et al., 2002).

Uma triagem *in vitro* de componentes fenólicos como os flavonóides presentes nas plantas, mostraram efeitos inibitórios da ciclooxigenase e 5-lipoxigenase (WAGNER, 1989). Os flavonóides tirisol e hidrotirizol, importantes componentes fenólicos do azeite de oliva, mostraram-se capazes de modular a perda óssea em modelo de inflamação de ratas ovariectomizadas (PUEL et al., 2008). Chang e colaboradores (2007) demonstraram que baicalina foi capaz de proteger a disfunção cerebrovascular em modelo de inflamação cerebral. Adicionalmente, o flavonóide catequina associado ao antimicrobiano citoprofloxacina causou um efeito sinérgico na reversão de parâmetros inflamatórios em modelo de prostatite (LEE et al., 2005). O tratamento oral com luteolina em modelos de encefalomielite autoimune experimental (EAE) em ratos resultou na diminuição da inflamação axonal por modular a atividade do Rho GTPase (HENDRIKS et al., 2004).

1.5 Aspectos Gerais da Asma Alérgica

A prevalência e a severidade de doenças alérgicas, como a asma, tem aumentado nas duas últimas décadas (PEARCE et al., 2007). Esta patologia é considerada um problema de saúde pública em países com renda alta, bem como em países em desenvolvimento (revisado por Kawai 2007).

A asma é uma doença inflamatória pulmonar crônica que pode ser caracterizada por uma broncoconstrição intermitente, reversível ou não, com

hipersecreção de muco, reatividade brônquica exacerbada a diferentes estímulos, inflamação peribroncovascular e alta produção de imunoglobulina E (IgE) (UMETSU et al., 2002).

Sabe-se que a etiologia da asma é multifatorial. A predisposição genética e os fatores de riscos ambientais como poluição atmosférica, mudanças na dieta alimentar, fumo e grande exposição à poeira, são possíveis fatores associados a asma, (KAISER, 2004). Entretanto, acredita-se que dentre esses fatores citados, os ambientais contribuem de forma ainda mais significativa para o estabelecimento da doença (revisado por Kawai et. al., 2007).

A fisiopatologia da asma caracteriza-se por uma resposta imediata e amplificada, frente a uma re-exposição a alérgenos tais como : pólen e ácaro. A resposta imune exacerbada provocada na asma é essencialmente dependente de linfócitos T CD4⁺ também chamados de células T “helper” (auxiliares), que secretam preferencialmente citocinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 sendo estas, as principais responsáveis pelas alterações fisiopatológicas da asma (ROBINSON et al., 1992; YSSEL et al; 2000; FIREMAN et al., 2002). Como resultado deste processo inflamatório crônico, o tecido pulmonar pode sofrer profunda mudança estrutural e funcional denominada “remodelamento” pulmonar (BLUMENTHAL et al., 1995).

A resposta imune inicia-se quando o alérgeno entra em contato pela primeira vez no organismo, caracterizando a fase de sensibilização. Nesta fase, quando o alérgeno penetra na mucosa respiratória, as células apresentadoras de antígeno (APCs) presentes na área irão reconhecer, processar e apresentar via complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) aos LTh0 que irão se diferenciar em LTh2 produzindo citocinas clássicas do perfil Th2 (IL-5, IL-

13, IL-4 e IL-9), ativando os linfócitos B, responsáveis pela produção de IgE, estes irão se ligar de forma cruzada às porções Fab de duas IgE-alérgeno específicas, que por sua vez estão ligadas na superfície dos basófilos e/ou mastócitos via receptores $Fc\epsilon RI$. Este mecanismo de recepção nas referidas células desencadeia a transdução de sinal via proteína Gq, ativando cascatas de reações bioquímicas e abertura dos canais de cálcio presentes no interior dessas células (JUTEL et al., 2002). O resultado é a liberação dos grânulos de histamina (pré-estocados nas vesículas lisossomais) que promove a abertura dos complexos juncionais do epitélio respiratório e a síntese de mediadores neoformados como eicosanóides classificados em leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos (BARNES; RODGE; THOMPSON; 1997; MADDOX; SCHWARTZ; 2002) (Figura 3).

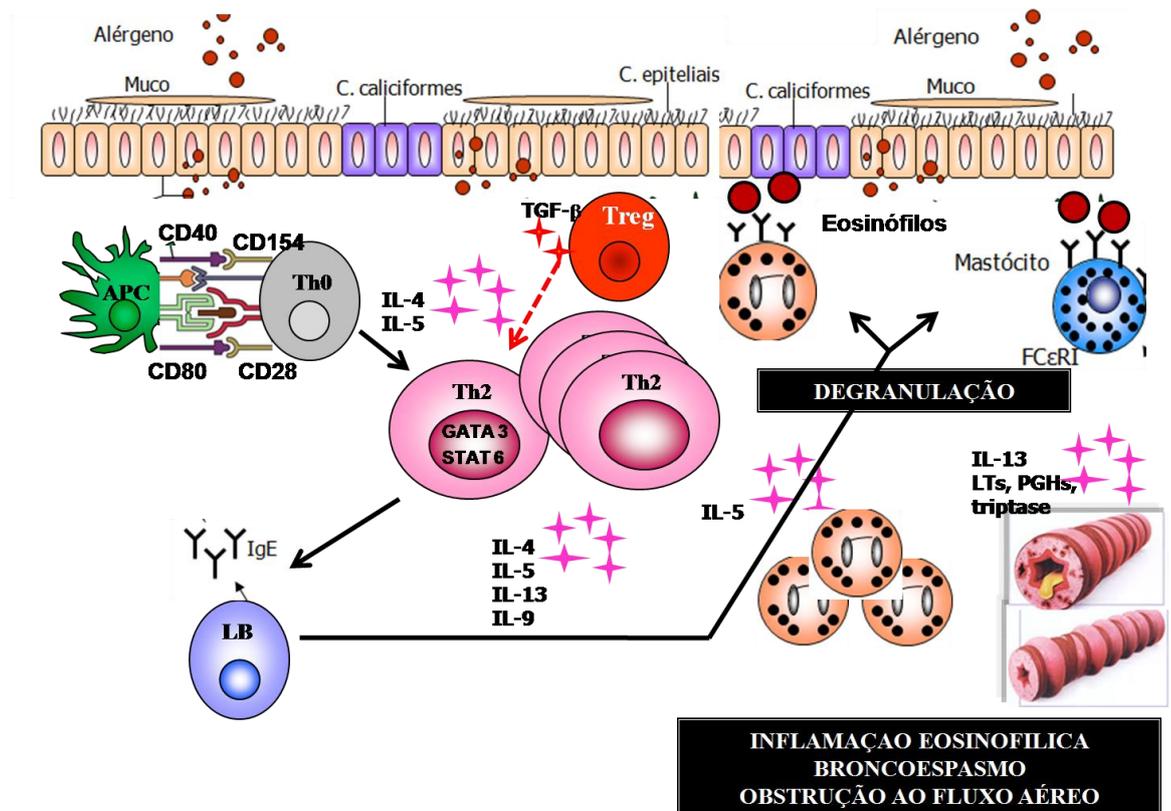


Figura 3. Características do mecanismo imunológico da asma alérgica

Os macrófagos, consideradas importantes APCs, são células que participam ativamente na fisiopatologia da asma. Os peptídeos apresentados pelas APCs, como os macrófagos, via moléculas do MHC-II (produto de genes altamente polimórficos) são de origem exógena, e entram nas APCs pela rota da endocitose (HEATH, CARBONE, 2001). Assim o MHC-II assume uma importância central em propiciar a montagem da resposta imune contra os alérgenos. Lara-Marquez e colaboradores (2001) demonstraram que pacientes asmáticos expressam maiores níveis de MHC-II em células do sangue periférico, o que pode contribuir para o estabelecimento e severidade da asma atópica.

Macrófagos alveolares são caracterizados fenotipicamente por CD11b+ CD11c+, porém existe uma diferença na expressão desses marcadores de acordo com o estado de ativação dos macrófagos. O CD11b são expressos em maior concentração em macrófagos ativados em relação aos macrófagos alveolares residentes, que expressam mais CD11c. Além da diferença fenotípica existe diferença funcional entre esses macrófagos. Estudos demonstram que macrófagos alveolares (CD11b+ CD11c+) expressam alta concentração do receptor de eotaxina CCR3, responsável por orquestrar a eosinofilia das vias aéreas de camundongos BALB/c em modelo experimental de asma (Moon et al., 2007), comprovando a importância desta célula no estabelecimento da asma.

A ativação e a diferenciação das células T exercem um papel crítico na patogênese de doenças inflamatórias como a asma. O encontro com o alérgeno torna os LT *naive* em LT ativados, um evento regulado não apenas pelo primeiro sinal, representado pelo reconhecimento do peptídeo via TCR apresentado por molécula de MHC de classe II em APCs, mas também por um número significativo de moléculas coestimuladoras, tais como CD40, CD80 (B7.1), CD86

(B7.2) presente nas APCs, durante a apresentação antigênica. A ausência dessas moléculas coestimuladoras compromete profundamente a ativação dos LT (revisado por Coyle; Gutierrez-Ramos, 2004). Estudos utilizando anticorpos anti CD40 e anti CD80 demonstraram inibir a inflamação das vias aéreas e a hiperreatividade, clássico na asma alérgica experimental (Coyle et al., 2000, Gonzalo et al., 2001).

CD40 é uma molécula co-estimuladora expressa não apenas em linfócitos B, mas também em células epiteliais, macrófagos alveolares, eosinófilos, miofibroblastos pulmonares e células do músculo liso das vias aéreas. Essas células que expressam o CD40 quando associadas ao seu ligante -CD40 L (CD154) presentes nos leucócitos (LT, eosinófilos, mastócitos e basófilos) modulam a inflamação das vias aéreas, via produção de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios (revisado por Kroczeck; Hamelmann, 2005). Lei e colaboradores (1998) demonstraram pela primeira vez que camundongos deficientes de CD40 L (CD154) foram incapazes de desenvolver eosinofilia após sensibilização e desafio quando comparados a camundongos que possuíam tal molécula em modelo de asma alérgica experimental. Estudos clínicos demonstram o aumento da expressão de CD40 em células epiteliais brônquicas, eosinófilos, músculo liso das vias aéreas e macrófagos em pacientes com asma crônica (Tang et al., 2001).

CD80 é outra molécula co-estimuladora bastante estudada na fisiopatologia da asma. A expressão do CD80 é induzida por ativação celular. Esta molécula é freqüentemente expressa em baixos níveis nas APCs, tais como: células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, regulando a ativação dos LT (BALBO et al., 2001). Um estudo realizado por Ji e colaboradores (2008)

demonstrou que o tratamento com anticorpos anti- CD80 induziu o aumento da expressão de IFN- γ (citocina Th1) e diminuiu a expressão de IL-4 (citocina Th2) em modelo experimental de asma, sugerindo o CD80 como alvo terapêutico na asma alérgica experimental. Esses estudos comprovam a importante participação das moléculas co-estimuladoras na fisiopatologia da asma.

Na última década, diversos modelos experimentais contribuíram para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos operacionais envolvidos na imunopatologia da asma (revisado por PAULUHN E MOHR, 2005).

A modulação da asma deve-se a presença dos linfócitos T CD4+, que são subdivididos nas subpopulações: Th1, Th2. Em nosso organismo há um equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2, predominando em determinadas situações a resposta mais eficaz no combate ao agente agressor. No entanto, um desequilíbrio no balanço Th1/Th2 pode levar ao aparecimento de patologias relacionadas a proliferação e a atividade das células Th1 ou Th2 (SZABO et al., 2003). Essas subpopulações são definidas pelo perfil de produção de citocinas e ativações resultantes das respostas imunes desencadeadas (MOSSMANN; COFFMAN, 1989). As citocinas são requeridas para todas as atividades imunoregulatórias e representam importante alvo para imunomodulação (CONNOR et al., 2000). Células Th1 são tipicamente produtoras de IFN- γ e IL-2 a partir da ativação do fator de transcrição T-bet. Essa resposta é essencial para o estabelecimento de respostas imunes mediadas por células, enquanto células Th2 produzem citocinas como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, a partir do fator de transcrição GATA-3 e está associado à resposta imune humoral, implicada na patogênese da asma. (FOSTER et al., 2002; RIFFO-VASQUEZ ; SPINA, 2002, LARCHÉ ; ROBINSON ; KAY, 2003). As citocinas secretadas pelas células Th1

e Th2 são reguladas entre si, de modo que o perfil de citocina produzidas por Th1 (IFN- γ) antagoniza as citocinas produzidas da subpopulação Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13), resultando no desvio em um dos tipos de resposta imune, Th1 ou Th2, frente a entrada de algum antígeno.

Estudos clínicos demonstraram que a expressão do fator de transcrição T-bet encontrava-se reduzida e o de GATA-3 aumentado nas células T de pulmões de pacientes asmáticos quando comparadas a indivíduos saudáveis (CARAMORI et al., 2001 e FINOTO et al., 2002), demonstrando importância crucial desses fatores de transcrição no estabelecimento da asma.

Além das células Th1 e Th2, existem mais dois subtipos de LT CD4⁺, os LT reguladores (LT_{Reg}) e o mais recente subtipo Th17. Essas duas subpopulações também são definidas pelo perfil de produção de citocinas, que são amplificados a partir da ativação de seus respectivos fatores de transcrições (FoxP3 para LT_{Reg} e ROR γ e ROR- γ para Th17) e durante a sinalização celular (revisado por FINOTO 2008).

O linfócito T regulador (T_{Reg}) tem como principal função controlar respostas imunes exacerbadas para manter o estado de homeostasia (LEWKOWICH et al., 2005).

Dentre os marcadores de superfície dos LTreg estão: a baixa expressão da molécula CD45RB (CD45RB^{low}), indicando células ativadas, o CD62L (ligante da L-selectina), o GITR (receptor de TNF induzido por glicocorticóides) e o CD38. Entretanto, a expressão estável da cadeia α do receptor da IL-2 (CD25), e principalmente, a expressão do fator de transcrição FoxP3 têm sido apontados como específicos na prevenção de doenças auto-imunes (KUNIYASU et al., 2000; SINGH et al., 2001).

Os linfócitos T reguladores são descritos como sendo capazes de inibir resposta Th2 (doenças alérgicas) ou resposta Th1 (doenças auto-imunes) (YAZDANBAKHSI et al., 2002). Os mecanismos propostos para sua função inibitória é a secreção de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β (MILLER et al., 1992) e mais recentemente a citocina IL-35 que também tem sido descrita como um dos principais mecanismos necessários para supressão pelas Tregs (COLLISON et al., 2007).

Lewkowich e colaboradores (2005) demonstraram que a depleção de linfócitos Treg naturais antes da fase indutora da resposta imune contribui para o aumento das respostas alérgicas induzidas pela imunização com extrato de ácaros em animais resistentes.

A citocina TGF- β , produzida por LT_{Reg} , é considerada uma citocina imunoreguladora (revisado por AKDIS, 2006), implicada na diferenciação e expansão de células $CD4^+CD25^+$ pela indução de FoxP3 com aumento da capacidade imunossupressora (CHEN et al., 2003 e RUBER et al., 2004). A atividade imunossupressora dessas células produtoras de TGF- β tem uma relação direta na patogênese da asma, particularmente no remodelamento e injúria do tecido pulmonar, considerando que o TGF- β é uma das principais citocinas no processo de fibrose (VIGNOLA et al., 1997). Adicionalmente outro estudo demonstrou que tal citocina exerce um papel essencial na produção de IL-17 por Linfócitos T, responsável por inflamação neutrofílica (BETTELLI et al., 2006).

Harrington e colaboradores (2006) propuseram que o perfil Th17 é diferente dos três anteriormente existentes Th2, Th1 e Treg. Esse perfil está em íntima relação com o desenvolvimento de doenças autoimunes e outros

processos inflamatórios (revisado por Finotto 2007). Células Th17 mantêm contínua liberação de IL-17. Um recente estudo publicado por Wakashin e colaboradores (2008) demonstrou que a citocina IL-23 e células Th17 não apenas induzem a inflamação neutrofílica das vias aéreas como também a inflamação eosinofílica mediada pelo perfil Th2. Estudos clínicos demonstraram um aumento do número de neutrófilos associado ao aumento da expressão de RNAm de IL-17A e IL-8 no líquido pulmonar de pacientes com asma moderada e severa (BULLENS et al., 2006).

Alguns dados têm demonstrado que Th2 e Th17 encontram-se aumentados em processos inflamatórios das vias aéreas, enquanto LT_{Reg} possui um importante papel anti-inflamatório (revisado por AKDIS, 2006). O controle da sinalização das citocinas é fundamental para o desenvolvimento e ativação de algum subtipo de linfócito T descrito acima. Existem muitas controvérsias do papel real dos LT_{Reg} e $LTh17$ na asma alérgica compondo ainda um vasto campo de estudos (revisado por Finoto 2008).

Recentes estudos demonstram a participação de outro subtipo de célula T $CD4^+$ em doenças inflamatórias crônicas, as células T *natural killer* NKT. Essas células são consideradas LT que expressão CD1 (molécula de MHC de classe I não polimórfica) e uma cadeia alfa do TCR invariante, além de receptores da célula NK (revisado por MEYER 2007). Apesar da incerteza do real papel dessas células na patogênese da asma, tem sido descrito que as NKT produtoras de IL-4 e IL-13 foram encontradas em biopsias brônquicas de pacientes asmáticos (AKBARI et al., 2006). Adicionalmente outros estudos demonstraram que essas células NKT respondem a antígenos glicolipídeos, bem como antígenos peptídeos reconhecidos por LT_{CD4^+} e isso leva a ativação da resposta imune,

responsável por liberação de citocinas, tais como a IL-13 comuns em processos inflamatórios como a asma, podendo estar relacionado à indução da hiperreatividade brônquica (MEYER et al., 2006) e remodelamento das vias aéreas (JOYCE; KAER, 2008).

A eosinofilia pulmonar presente na asma alérgica está associada à produção de IL-5. Esta citocina foi descrita por Campbell e colaboradores na década de 80 (1986) e, desde então, vários estudos indicam que a atividade biológica desta citocina é voltada principalmente para a diferenciação, recrutamento, ativação e sobrevivência de eosinófilos (YAZDANBAKHSI et al., 2002). Durante uma resposta inflamatória alérgica, os produtos liberados pelos eosinófilos contribuem diretamente para o dano tecidual e desenvolvimento da hiperreatividade brônquica (HRB) e também no remodelamento pulmonar (HUMBLES et al., 2004). A IL-13, por sua vez, também está associada à secreção de muco, produção de IgE e a diversas outras atividades inerentes à IL-4, visto que compartilha com esta a cadeia α do seu receptor (IZUHARA et al., 2002).

O desenvolvimento da HRB em camundongos tem sido associado a vários mecanismos de ação como, dependente de anticorpos anafiláticos (IgE e IgG₁), mastócitos, eosinófilos e citocinas. O padrão genético dos animais pode determinar a resistência ou susceptibilidade ao desenvolvimento de asma incluindo a HRB (EUM, et al., 1995). Na linhagem C57BL/6, a HRB parece ser dependente do influxo de eosinófilos e da produção de IL-5, uma vez que animais deficientes para IL-5 não apresentaram hiperreatividade (FOSTER et al., 1996). Por outro lado, em animais da linhagem BALB/c, a HRB parece ser dependente da presença de IL-4, mas não de eosinófilos (CORRY et al., 1996).

Características clássicas presentes nas manifestações de asma e na sua imunomodulação foram escolhidas para servirem de objeto de estudo, tais como: perfil celular nas vias aéreas, hiperreatividade brônquica, secreção de muco, citocinas do perfil Th2, Th1 e T_{Reg}, produção de IgE, marcadores intra (foxP3) e extracelulares (CD4, B220, CD40, CD80, MHC de classe II) de linfócitos e APCs.

O interesse em investigar substâncias derivadas de plantas medicinais, como os flavonóides com atividade antialérgica é de grande valia, tendo em vista uma possível interferência no processo fisiopatológico da asma além de apresentar um novo modelo de substância natural para integrar no arsenal de fármacos utilizados para o tratamento da asma alérgica. Assim, o modelo de asma alérgica experimental em camundongos isogênicos BALB/c, induzido por ovalbumina (OVA) tenta reproduzir a asma alérgica humana e desta forma tem sido possível avaliar o efeito do tratamento com flavonóides para elucidar possíveis mecanismos de ação destas substâncias.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Investigar o efeito imunomodulador de três flavonóides: myricetina, isoramnetina e kanferol glicosilado (GRRK) caracterizando aquele com o melhor perfil imunomodulador em modelo de asma alérgica experimental induzida por ovalbumina (OVA).

2.2 Específicos:

- Realizar triagem imunofarmacológica com os três flavonóides: myricetina, isoramnetina e GRRK sobre a reação de choque anafilático e células inflamatórias de lavado broncoalveolar (LBA) em modelo de asma alérgica experimental induzida por OVA
- Avaliar o efeito do tratamento profilático e/ou terapêutico com GRRK sobre o infiltrado celular inflamatório de LBA, hiperreatividade brônquica (HRB), produção de citocinas (IL-5 e IL-13) de sobrenadantes de LBA, título de anticorpos-anafiláticos IgE OVA-específica, infiltrado celular, produção e quantificação do índice de muco em cortes histológicos corados com HE e PAS;
- Caracterizar fenotipicamente a expressão de marcadores de membrana de células efetoras, como: CD4⁺ em linfócito T e B220⁺ em linfócitos B no LBA;

bem como a expressão de marcadores de membrana em células apresentadoras de antígenos como: MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras: CD40 e CD80.

- Analisar a participação da resposta imune do tipo Th1, através da produção de INF- γ nas culturas de células de linfonodo mediastinal (mLN);
- Identificar a participação dos linfócitos T reguladores (LTr_{eg}) através da produção de TGF- β nas células de LBA e da expressão do marcador intracelular Foxp3⁺.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

Material

3.1 Animais

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com idade de aproximadamente 4 semanas, pesando cerca de 20 a 25 g e ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) com 5 semanas pesando cerca de 200 g foram utilizados e fornecidos pelo Biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) e pelo Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

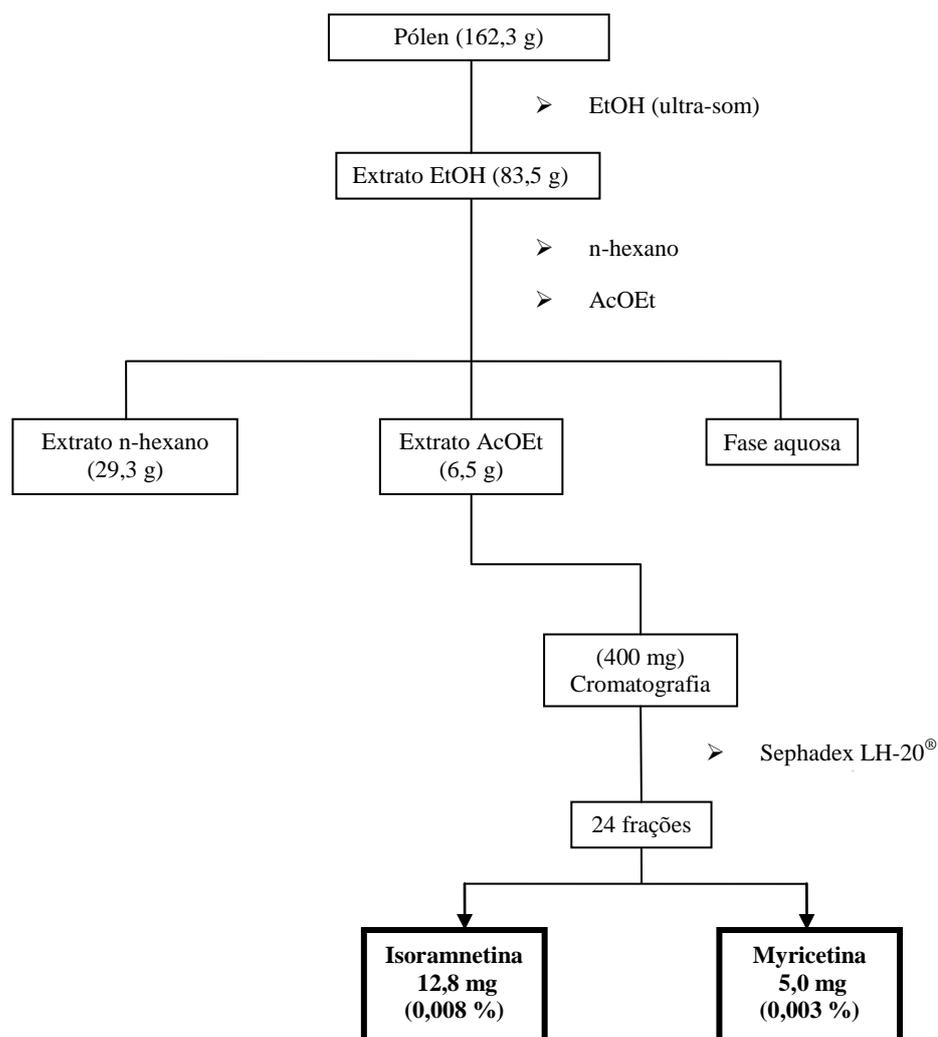
Os animais foram submetidos a ciclo de claro e escuro de 12 horas, mantidos a uma temperatura de 25 ± 2 °C com livre acesso à água, com uma alimentação balanceada a base de ração tipo *pellets* (Purina).

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 0612/05) e acatado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da USP.

3.2 Obtenção e caracterização de flavonóides

3.2.1 Obtenção e caracterização de isoramnetina e myricetina isolados do extrato fenólico do pólen

Amostras de pólen (162,0 g) coletadas no município de Canavieiras, BA foram identificadas (PUEF 528, 529, 530 e 531- *Eucalyptus*, *Cecropia*, *Eupatorium* e *Mimosa*) no laboratório de micromorfologia de plantas da Universidade Estadual de Feira de Santana- UEFS) foram desidratadas e submetidas a extrações sucessivas com etanol sob agitação em aparelho de ultra-som. O extrato EtOH (83,5 g) foi suspenso em solventes com metanol:água (1:1) e particionado três vezes com n-hexano e depois com acetato de etila. As soluções extrativas obtidas foram concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, resultando em um extrato fenólico do pólen. o extrato AcOEt foi escolhido para ser submetido a permeação em sephadex LH-20[®] usando como eluente MeOH, obtendo-se 24 frações. Em seguida foi utilizado o espectro de Infravermelho (IV) e a Ressonância Magnética Nuclear 2D (RMN-2D) e a estrutura dos flavonóides isoramnetina e myricetina foram identificadas. Este procedimento foi realizado pela equipe da Dr^a.Tania Maria Sarmiento da Silva no LTF/UFPB (Esquema 1).

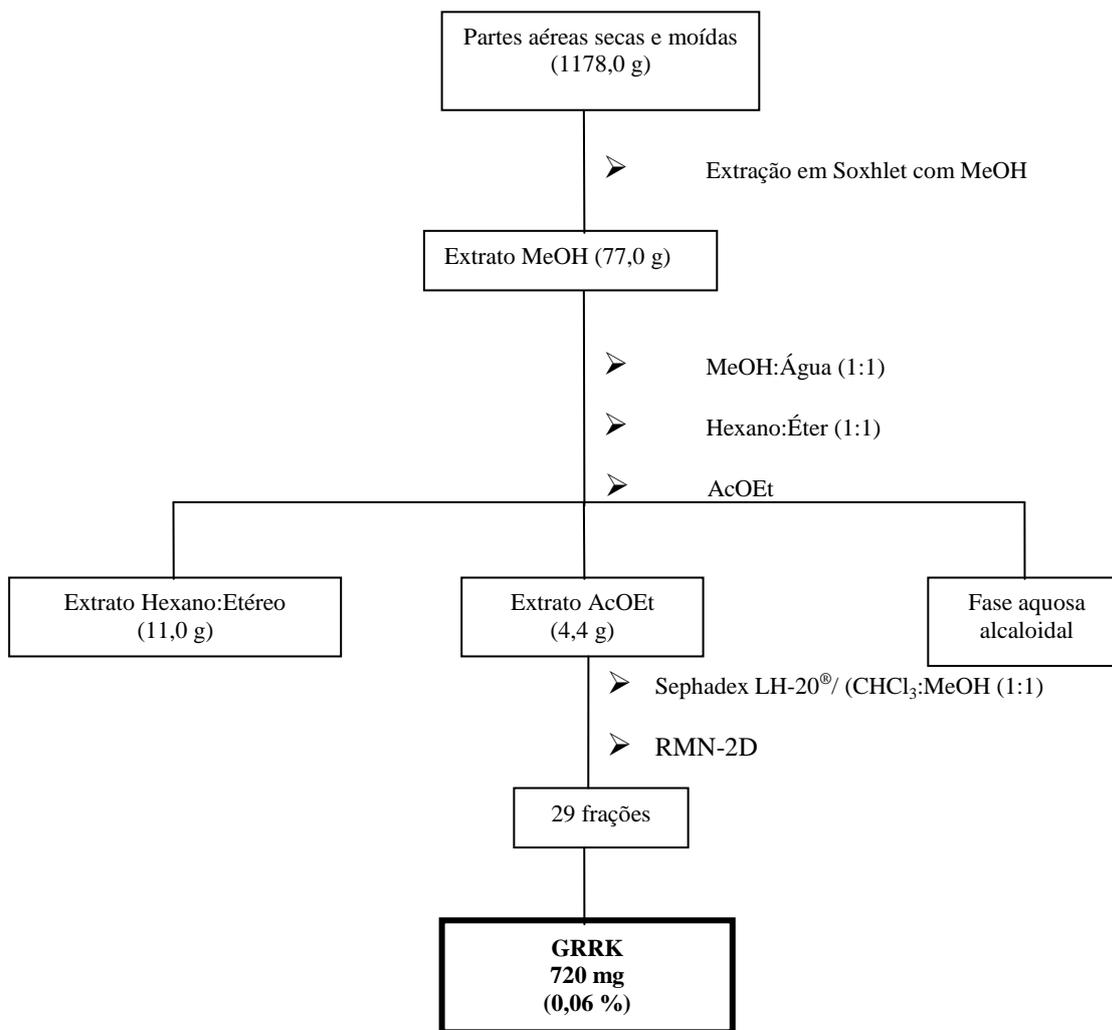


Esquema 1. **Obtenção dos flavonóides isoramnetina e myricetina isolados do extrato fenólico de pólen**

3.2.2 Obtenção e caracterização do kanferol glicosilado (GRRK) isolado de *Solanum asperum* Richard

A espécie *Solanum asperum* foi coletada no Campus I da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) em João Pessoa, PB e submetidas à secagem em estufa a 40 °C por uma semana. Após a secagem a planta foi identificada pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra (LTF-UFPB). O Voucher da espécie (Agra 1243) foi depositado no Herbarium Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da referida

Instituição. As partes aéreas secas e pulverizadas de *S. asperum* (1.178 g) foram extraídas exaustivamente em Soxhlet com 6 L de MeOH. A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotatório, fornecendo o extrato MeOH (74,0 g). O extrato MeOH foi suspenso em água e em seguida particionado com solução de Hexano:Éter (1:1) e depois com AcOEt obtendo-se os extratos Hexano:Etéreo (11,0 g) e AcOEt (4,4 g). Devido a presença de uma maior concentração de flavonóides evidenciados com reagente nitroprussiato (NP) (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil), o extrato AcOEt foi escolhido para ser submetido a permeação em sephadex LH-20[®] usando como eluente CHCl₃:MeOH (1:1), obtendo-se 29 frações. Em seguida foi utilizado o espectro de Infravermelho (IV) e a ressonância magnética nuclear 2D (RMN-2D) e a estrutura do flavonóide 3-O-[β-D-glycopiranosil-(1→6)-α-L-ramnopiranosil]-7-O-α-L-ramnopiranosil-kaempferol, abreviado como GRRK foi identificada. Este procedimento foi realizado pela equipe da Dr^a.Tania Maria Sarmiento da Silva no LTF/UFPB (Esquema 2).



Esquema 2. Obtenção do kanferol glicosilado (GRRK) isolados de *Solanum asperum* Richard.

Métodos

3.3 Teste de toxicidade de isoramnetina, myricetina e GRRK em modelo de *Artemia salina*

O crescimento do crustáceo *Artemia salina* foi realizado em um pequeno recipiente dividido em dois compartimentos contendo água do mar. Os ovos de *Artemia salina* foram adicionados ao compartimento fechado. Uma lâmpada colocada acima do lado aberto do tanque atraía os crustáceos através das perfurações da membrana colocada para separar os dois compartimentos do recipiente (MEYER et al., 1982). Após 48 horas, as *Artemias* maduras foram utilizadas para o experimento. Os flavonóides isoramnetina, myricetina ou GRRK foram dissolvidos em DMSO (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) a 1 % e completado com PBS (Merck, Rio de Janeiro, Barsil) até 5 mL de volume final. Concentrações de 1000, 100, 10 e 1 µg/mL dos flavonóides em quadruplicatas foram utilizadas em tubos de ensaio contendo 15 *Artemias*. Nas mesmas condições foi utilizado como solução controle PBS a 1% de DMSO. Após 24 horas de incubação sob a luz foi quantificado o número de mortalidade e sobrevivência em cada tubo de ensaio. O valor da concentração capaz de matar 50% dos animais em experimentação (CL₅₀) foi calculado e obtido a percentagem de letalidade.

3.4 Ensaio de citotoxicidade com isoramnetina, myricetina e GRRK sobre as células L929

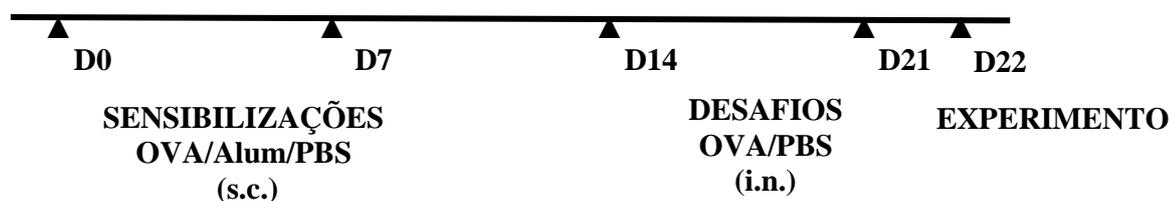
A avaliação da toxicidade dos flavonóides foi realizada pelo ensaio de citotoxicidade *in vitro* sobre fibroblastos de camundongos, linhagem de células L929, descrita por Flick e Gifford (1984). Para realização do ensaio, foram adicionados 100 µl/poço de meio RPMI 1640 com 5 % de soro bovino fetal (SBF) (Sigma St. Louis, EUA) contendo $3,5 \times 10^4$ células L929 em placa plástica de 96 poços de fundo chato (Nunk St. Louis, EUA). A placa foi incubada por 20 horas à 37 °C em estufa contendo 5 % de CO₂ em atmosfera úmida, até a formação de monocamada celular homogênea. Após esse período, diluições seriadas das amostras dos flavonóides nas concentrações de 160, 80, 40 e 20 µg/mL foram adicionadas à placa em um volume de 100 µl, em meio de cultura contendo ou não actinomicina D (Sigma St. Louis, EUA) a 2 µg/mL. Após 24 h foi adicionado 10 µl/poço de uma solução de ácido acético à 30 % e cristal violeta à 0,5 % e 15 min após as placas foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. O cristal violeta remanescente nas células não lisadas foi solubilizado com 100 µL de metanol e a quantificação da absorbância foi realizada no leitor de ELISA (BioRad, EUA), utilizando o comprimento de onda 620 nm. A percentagem de lise celular foi determinada pela intensidade de absorbância do cristal violeta e calculada pela fórmula:

$$\% \text{ de lise} = [1 - (\text{Absorbância amostra} / \text{Absorbância controle})] \times 100.$$

3.5 Modelo de asma alérgica experimental induzida por ovalbumina (OVA)

Os camundongos BALB/c foram sensibilizados por via subcutânea (s.c.) nos dias 0 e 7 com uma solução de 4 µg de ovalbumina (OVA) (Grau II – Sigma, St Louis, EUA) diluída em PBS e adsorvida em 1,6 mg de hidróxido de alumínio (Sigma, St. Louis, EUA).

Nos dias 14 e 21, os camundongos BALB/c foram desafiados com OVA. Para tal, os camundongos foram anestesiados com uma solução de quetamina (Agener União, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xylazina (Bayer, São Paulo, Brasil) em PBS 200 μ L/animal pela via intra-muscular e com o auxílio de uma micropipeta (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, França) introduziu-se 50 μ L da solução de OVA (10 ug OVA/50 μ L de PBS estéril) nas narinas até sua aspiração completa. Os camundongos foram sacrificados no dia 22 (24 horas após o segundo desafio antigênico) para a realização dos estudos. O protocolo abaixo sumariza o esquema de imunização e desafio com OVA.



Esquema 3. Modelo de asma alérgica experimental. D: dia, OVA: ovalbumina, PBS: Tampão fosfato, Alum: hidróxido de alumínio

3.6 Tratamento *in vivo* com isoramnetina, myricetina ou GRRK

Os camundongos BALB/c foram pesados e, a partir da média dos pesos (g), soluções de isoramnetina, myricetina e GRRK foram preparadas. Essas substâncias foram dissolvidas em DMSO a 1% e completado com uma solução tampão PBS. Os camundongos BALB/c tratados com isoramnetina ou myricetina receberam 30 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p.) ou subcutânea (s.c.), e os tratados com GRRK receberam 3, 30 ou 100 mg/Kg nas mesmas vias de

administração. Os camundongos tratados com a substância padrão dexametasona receberam 1 mg/kg por via s.c. Os grupos experimentais foram: PBS/PBS (tratado apenas com PBS na ausência de sensibilização e desafio com OVA- controle), PBS/OVA (tratado com PBS, sensibilizado e desafiado com OVA- alérgico), ISO/OVA (tratado com isoramnetina, sensibilizado e desafiado com OVA), MYR/OVA (tratado com myricetina, sensibilizado e desafiado com OVA), GRRK 3, 30 ou 100 mg/kg/OVA (tratados com GRRK nas doses de 3, 30 ou 100 mg/kg, sensibilizados e desafiados com OVA) e DEXA/OVA (tratado com dexametasona na dose 1 mg/Kg, sensibilizado e desafiado com OVA- padrão).

3.7 Reação de anafilaxia sistêmica em modelo de asma alérgica experimental

Camundongos BALB/c tratados ou não com isoramnetina, myricetina ou GRRK (n=10), na dose de 30 mg/kg foram submetidos ao protocolo experimental de asma descrito no item 3.5 e 72 h após o segundo desafio foi realizado a reação de choque anafilático com injeção na veia da cauda de uma suspensão contendo 500 µg de OVA dissolvida em 0,5 mL solução de azul de evans 0,5% (GRUNEWALD et al, 1998). O percentual de mortalidade foi calculado após uma hora do desafio com OVA considerando o grupo controle PBS/OVA com mortalidade de 100 %.

3.8 Dosagem de TNF- α no modelo de inflamação aguda induzida por LPS

A detecção da atividade de TNF- α no soro dos camundongos desafiados com LPS utilizado como agente inflamatório, foi realizada pelo ensaio de citotoxicidade sobre células L929 descrito no item 3.4 (FLICK e GIFFORD,

1984). No período de 90 minutos após a injeção intravenosa (i.v) de 20 μ g de LPS de *E. coli* (Biomim São Paulo, Brasil) os camundongos foram anestesiados e em seguida exsanguinados pelo plexo ocular para obtenção do sangue e conseqüente separação do soro. O título de TNF- α em U/mL foi definido como a recíproca da diluição onde se observa 50 % de lise celular. Os grupos experimentais foram: PBS/PBS (tratados com PBS na ausência de LPS), PBS/LPS (tratados com PBS e elicitados com LPS), GRRK/LPS (tratados com GRRK e elicitados com LPS), DEXA/LPS (tratados com dexametasona e elicitados com LPS).

3.9 Obtenção do soro e do lavado broncoalveolar (LBA)

Para a obtenção do soro os camundongos BALB/c foram exsanguinados por punção cardíaca, obtendo-se um volume final de sangue aproximado de 1 mL/animal. As amostras foram mantidas sob baixas temperaturas no gelo por 1h e em seguida centrifugadas a 4000 rpm para separação do soro. Em seguida essas amostras foram aliqüotadas e congeladas a -20 °C para posterior dosagem de TNF- α e IgE-anti OVA.

Para a obtenção de amostras do LBA, os camundongos BALB/c receberam injeção i.p. de hidrato de cloral (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) a 10 % (0,4 mL). Em seguida as traquéias foram expostas, canuladas e, com o uso de uma seringa foi injetado 0,5 mL de PBS gelado no espaço broncoalveolar. Após aspiração do LBA, 1 mL de PBS foi injetado e aspirado por no mínimo três vezes. Em seguida o LBA foi centrifugado para obtenção das células para contagem total, diferencial e a realização da citometria de fluxo e, o

sobrenadante foi aliquotado e congelado a -20°C , para posterior determinação de citocinas.

3.10 Protocolo de caracterização do número de células totais e diferenciais do LBA

Para determinar o número total de células no LBA de camundongos BALB/c, 90 μL da suspensão celular foi fixada e corada com 10 μL de uma solução de cristal violeta (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) a 0,5% em ácido acético (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) a 30% para contagem em hemocítmetro (câmara de newbauer). Para a contagem diferencial, 200 μL do LBA contendo 4×10^5 células foram colocados em câmaras com lâminas apropriadas e citocentrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5415 C, EUA) à 600 rpm por 4 min. Para a coloração diferencial das células, as lâminas foram coradas com hematoxilina/eosina ("Kit" Instant Prov Newprov, PR, Brasil). Foi feita então a contagem de 200 células por lâmina, com o auxílio de microscópio ótico com objetiva de 40x.

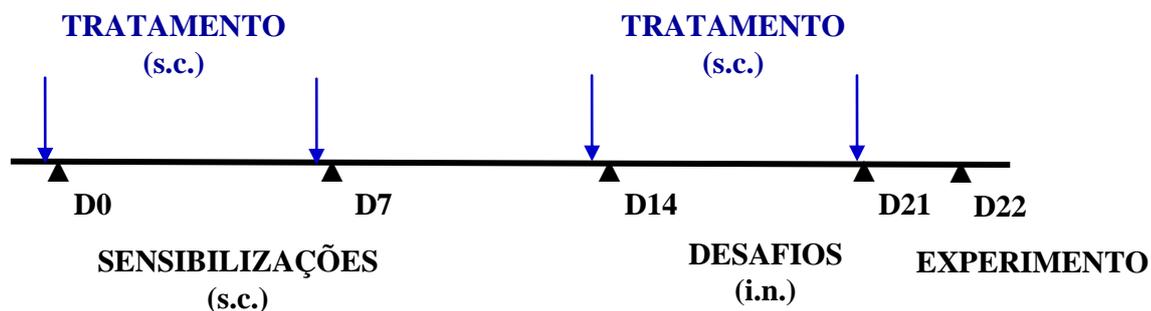
3.11. Protocolo de tratamento profilático ou terapêutico com o GRRK

Para estudar o protocolo profilático, os camundongos BALB/c receberam GRRK nas doses de 3, 30 ou 100 mg/kg ou dexametasona (DEXA) na dose 1 mg/Kg por via s.c. uma hora antes de cada sensibilização com OVA/Alum/PBS (dia 0 e 7) e uma hora antes de cada desafio (dia 14 e 21) com OVA/PBS, concomitante a realização do modelo de asma alérgica experimental induzido

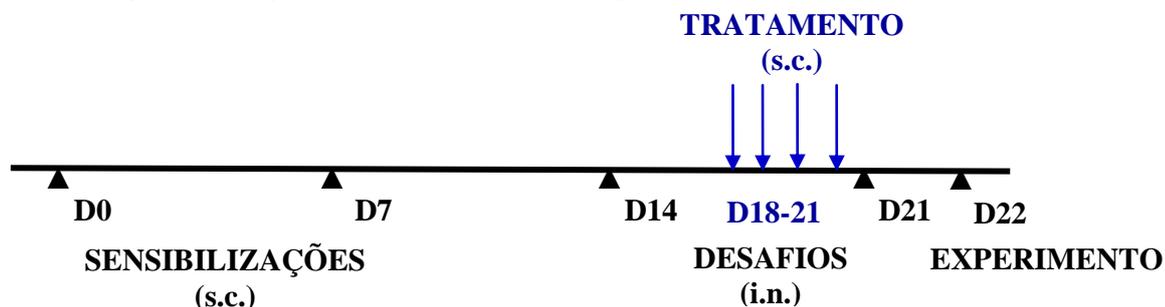
por OVA (item 3.5). No dia 22 os camundongos BALB/c foram sacrificados para posterior análise.

Para estudar o protocolo terapêutico GRRK ou DEXA foram administrados em uma fase mais tardia, apenas após o primeiro desafio com OVA no protocolo de asma alérgica experimental como descrito no item 3.5. Para tal, os camundongos BALB/c foram imunizados nos dias 0 e 7, desafiados no dia 14, tratados com GRRK pela via s.c. nos dias 18, 19, 20 e 21, desafiados no dia 21 e, 24 horas após, foram sacrificados para posterior análise.

Os esquemas abaixo resumizam os protocolos de tratamento profilático (esquema 4) e terapêutico (esquema 5) com o GRRK.



Esquema 4. Esquema do protocolo de tratamento profilático com GRRK.



Esquema 5. Esquema do protocolo de tratamento terapêutico com GRRK.

3.12 Teste de hiperreatividade brônquica (HRB)

Após os tratamentos profilático ou terapêutico, os camundongos BALB/c foram colocados em câmaras plestismográficas (BUXCO Eletronics, EUA) para a avaliação da função pulmonar. Os camundongos foram submetidos a nebulização com metacolina (Sigma, St Louis, EUA) (agonista colinérgico, broncoconstrictor) em concentrações crescentes (3, 6, 12 ou 25 mg/mL) durante 2,5 minutos para a obtenção do parâmetro respiratório, definido como o aumento da pausa respiratória (*Penh*). O *Penh* foi calculado da seguinte forma:

$$\text{Penh} = (\text{Te}/\text{Tr}-1) \times \text{Pef}/\text{Pif}$$

Onde, Te: tempo expiratório (segundos); Tr: tempo de relaxamento (segundos); Pef: pico de fluxo expiratório e Pif: pico de fluxo inspiratório



Figura 4. Foto do aparelho para medida de hiperreatividade brônquica (HRB)-pletismógrafo de corpo inteiro (BUXCO Eletronics, EUA).

3.13 Teste de anafilaxia cutânea passiva (PCA)

Para a determinação do título de IgE OVA-específica, as amostras de soro de camundongos BALB/c obtidas como descrito nos itens 3.8 foram descongeladas e submetidas a 8 diluições seriadas (em salina) na razão de 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 e 1:512, 1:1024. Um volume de 50 μ L dessas amostras diluídas em salina foi injetado por via intradérmica (i.d.) em diferentes sítios do dorso de ratos Wistar previamente depilados.

Após 48 h, os ratos foram anestesiados (i.p.) com tiopental (45 mg/kg) e as caudas lavadas com água e sabão para realização do desafio antigênico. O desafio foi realizado administrando 0,5 mL de uma solução contendo o corante azul de Evans (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) a 1 % e 2,0 mg de OVA na veia caudal. Após 30 min., os camundongos BALB/c foram sacrificados por deslocamento cervical e os diâmetros das manchas formadas no dorso foram mensurados com o auxílio de uma régua. O título de IgE OVA-específica foi determinado pela maior diluição do soro capaz de promover mancha mensurável ≥ 5 mm (HOLT et al., 1981).

3.14 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de IL-5, IL-13 e TGF- β do LBA

A presença de citocinas IL-5, IL-13 e TGF- β foram quantificadas de amostras de sobrenadante de LBA (item 3.8) pelo método de ELISA sanduíche seguindo as especificações do fabricante (Pharmingen, San Diego, CA, EUA). Para tanto, 2 μ g/mL de anticorpos monoclonais de captura (anti-IL-5 - 11B11,

anti-IL-13 - 38213.11 ou anti TGF- β - R4-6A2) foram adicionados em placas MaxiSorb (Nunc) 50 μ L/poço e estas incubadas por 12 h à 4^oC. Após a incubação das placas, estas foram lavadas com PBS (Sigma, St. Louis, EUA) Tween 20 (0,05%) e as reações inespecíficas foram bloqueadas pela adição de PBS a 10% de Soro Bovino Fetal (SFB) (Sigma, St. Louis, EUA) (100uL/poço) por 30 min. As amostras de LBA foram adicionadas aos poços das placas em volumes de 200uL/poço, incubadas por 12 h à 4^oC. Após este período foram adicionados às placas 100uL/poço uma concentração de 1ug/mL dos anticorpos de detecção para cada citocina analisada, e incubadas por 45 min à temperatura ambiente. Após lavagem das placas, foi adicionada avidina conjugada com peroxidase (1:600 para IL-5, IL-13 e TGF- β) e as placas foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente.

A reação colorimétrica foi obtida pela adição de 100ul/poço de uma solução de substrato contendo 0,5 mg/mL de o-orthophenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma Co, St Louis, MO, EUA), 0,0015% de H₂O₂ em 0,1 M tampão ácido cítrico/citrato de sódio(MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) pH 5.0. O bloqueio da reação foi feito pela adição de 50uL/poço de uma solução a 4N de H₂SO₄ e, a absorbância óptica determinada a 492 nm em leitor de ELISA. Os valores das densidades ópticas (DO) foram convertidos em pg/mL baseando-se em curvas obtidas com concentrações pré-definidas de citocinas recombinantes.

3.15 Obtenção do sobrenadante de cultura de células de linfonodo mediastinal (mLN) para dosagem de IFN- γ

Após a remoção do sangue dos camundongos experimentais, as costelas destes foram removidas e o coração afastado para facilitar a visualização dos

linfonodos mediastinais, que foram extraídos com o auxílio de uma lupa, pinça de ponta fina e tesoura estéril. Esses linfonodos foram macerados para a remoção das cápsulas de tecido conjuntivo que envolve os linfonodos, com o auxílio de um *Poter* (LABORGLAS, São Paulo, Brasil) com capacidade de 5 mL em meio de cultura RPMI 1640 completo (10% de soro bovino fetal, 2mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina G, 100µ/mL de sulfato de estreptomicina, 0,05 mM β-mercaptoetanol) (Sigma, St. Louis, EUA). Em seguida, as suspensões celulares foram transferidas para tubos de 15 ml (Falcon, Labor, Brasil) e centrifugadas a 1500 rpm a uma temperatura de 8° C por 10 min e contadas em microscopia óptica. As células (5×10^5) ressuspensas em meio RPMI completo foram transferidas para cada poço de uma placa de poliestireno de 96 cavidades (Fundo chato – NunK, EUA). Triplicadas de cultura celulares da placa contendo 5×10^5 células/poço foram estimuladas ou não de Concanavalina-A (Con-A- Sigma- St. Louis, EUA) a 2,5 µg / mL. As culturas celulares foram incubadas por 48 horas à 37° C em 5 % CO₂ e em seguida os sobrenadantes foram retirados, aliquotados e congelados a - 20 °C para posterior dosagem de IFN-γ.

A dosagem de IFN-γ segue o mesmo protocolo descrito no item 3.13 pela técnica ELISA sanduíche seguindo as especificações do fabricante (Pharmingen, San Diego, CA, EUA), sendo as amostras para dosagem da referida citocina obtidas do sobrenadante de cultura de linfonodo mediastinal.

3.16 Técnica histológica dos pulmões

Após a coleta do LBA, os pulmões foram perfundidos via ventrículo direito com 10 mL de PBS para a remoção de sangue residual, e fixados por imersão em solução de formalina tamponada (10%). Decorridas 24 h, os órgãos foram

transferidos para uma solução de álcool a 70% até sua inclusão em parafina. Os tecidos foram cortados na espessura de 5µm e corados com hematoxilina/eosina (H/E), ácido periódico Shiff (PAS) e em seguida submetidos a exames histopatológicos.

3.17 Análise de citometria de fluxo (FACS) na caracterização fenotípica de células do LBA

Para determinar as subpopulações de linfócitos (CD4⁺- LT e B220-LB) e a presença de moléculas (MHC-II , CD40 e CD80) em células apresentadoras de antígenos (CD11b⁺, CD11c⁺), presentes em amostras do LBA, utilizou-se a técnica de análise em citometria de fluxo (FACScan – BD, San Diego, EUA). Para tanto, as suspensões celulares do LBA foram centrifugadas e as células lavadas duas vezes com PBS/ 2 % SFB/ 0,001 % azida sódica. Essas suspensões foram ajustadas para 1x10⁷ células/mL e alíquotas de 100 µL (1x10⁶ células) foram distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços, com fundo em U (Corning, St. Louis, EUA). Após centrifugação (5 minutos, 4°C, 1200 rpm), o sobrenadante foi desprezado para a adição dos anticorpos monoclonais anti-CD4⁺ *Cy-chrome* (BD Pharmigen, EUA), anti-B220 *PE* (BD Biosciences, EUA) anti-CD40 *Cy-chrome* (BD Biosciences, EUA), anti-CD80 *Cy-chrome* (BD Biosciences, EUA), anti I-A^d (MHC-II) *Cy-chrome* (BD Pharmigen, EUA), anti-CD11b⁺ *FITC* (BD Biosciences, EUA) e CD11c⁺ *PE* (BD Biosciences, EUA) e incubados por 20 min à 4°C (1 µg Ac/1 x 10⁶ células), em local de pouca luminosidade. As placas foram novamente centrifugadas e lavadas com PBS/ 2%SFB/ 0,001% azida sódica. As suspensões celulares marcadas com os anticorpos foram transferidas para tubos cônicos de prolipileno (BD

Biosciences, EUA) e analisadas no aparelho FACScan de acordo com a intensidade de fluorescência (FL1, FL2 e FL3) e a dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) do feixe luminoso. Para cada combinação de anticorpos, foram analisadas 5×10^4 células.

O cálculo do número total de células de cada população é baseado na equação: **% de linfócitos positivos x número total de linfócitos isolados.**

A análise da leitura proveniente do citômetro de fluxo e aquisição dos gráficos de *dot-plots* foi realizada com a ajuda do *software Flow Jowl* (BDBiosciences, Mountain View, EUA).

Para a análise do fator de transcrição FoxP3⁺ foi realizada o protocolo de marcação intracelular. As células do LBA previamente processadas como descrito acima foram incubadas com uma solução de StopGolgi (BD Pharmigen, San Diego, CA, EUA). Em seguida as células foram fixadas com CytoFix (BD Pharmigen, San Diego, CA, EUA) e permeabilizadas com CytoPerm (BD Pharmigen, EUA). Após a permeabilização, as células foram marcadas com anti-*Foxp3 FITC* (BD Pharmigen, San Diego, CA). As leituras foram realizadas no aparelho FACScan (BD, Pharmingen, San Diego, CA) e analisadas no *software Flow Jowl*.

3.18 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média ($x \pm e.p.m$) e analisados estatisticamente empregando-se o teste não paramétrico de análise de variância (ANOVA “one-way”) seguido de Bonferroni. O limite de significância utilizado foi $P < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Grap-Pad Prism© versão 4.03 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA).

Resultados

4. RESULTADOS

4.2 Avaliação da toxicidade de isoramnetina, myricetina e GRRK em modelo de *Artemia salina* e no ensaio de citotoxicidade com células L929

Os flavonóides isoramnetina, myricetina e GRRK isolados e caracterizados a partir de diferentes extratos foram submetidos a dois diferentes testes de avaliação de toxicidade, modelo de *Artemia salina* (*in vivo*) e ensaio de citotoxicidade com células L929 (*in vitro*).

Não houve mortalidade de *Artemia salina* nas diferentes concentrações analisadas dos flavonóides testados, indicando ausência de toxicidade para estes microcrustáceos.

Quando se avaliou a citotoxicidade em células L929 frente às concentrações crescentes de 20, 40, 80 e 160 $\mu\text{g/mL}$ de cada um dos flavonóides, observou-se que isoramnetina, myricetina e GRRK apresentaram 39%, 35% e 12 %, respectivamente, de mortalidade das células L929 para 160 $\mu\text{g/mL}$; 37%, 9% e 7 % para 80 $\mu\text{g/mL}$; 12%, 2% e 7% para 40 $\mu\text{g/mL}$ e, na menor concentração avaliada (20 $\mu\text{g/mL}$) apenas o GRRK apresentou 5% de mortalidade, enquanto que os demais flavonóides não se mostraram citotóxicos (Tabela 1). Esses resultados demonstram que, os flavonóides testados não apresentam percentual de mortalidade acima de 50%, indicativo de baixa toxicidade para a linhagem celular de fibroblastos de camundongos L929.

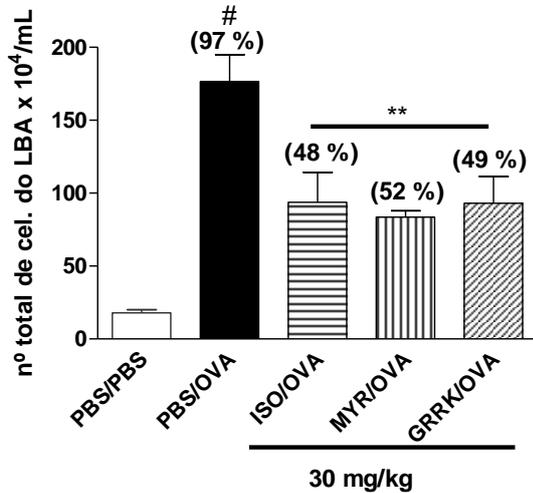
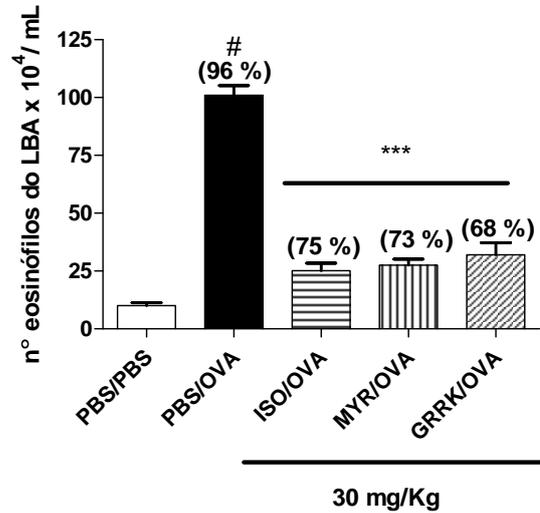
Tabela 1. Avaliação dos flavonóides isoramnetina (ISO), myricetina (MYR) e GRRK na citotoxicidade em células L929 de camundongos BALB/c.

SUBSTÂNCIAS	% citotoxicidade em diferentes doses ($\mu\text{g/mL}$)			
	20	40	80	160
ISO	0 %	12 %	37 %	39 %
MYR	0 %	2 %	9 %	35 %
GRRK	5 %	7 %	7 %	12 %

4.2 Análise de isoramnetina, myricetina e GRRK na atividade antiinflamatória e na reação de anafilaxia sistêmica em modelo de asma alérgica experimental.

No protocolo de asma alérgica experimental induzida por OVA, os animais tratados na dose de 30 mg/kg com os flavonóides isoramnetina ($81,3 \pm 22,2$; $P < 0,01$), myricetina ($71,1 \pm 9,8$; $P < 0,01$) e GRRK ($79,8 \pm 27,6$; $P < 0,01$) apresentaram redução de forma significativa do número de células totais em 48, 52 e 49 %, respectivamente, quando comparados ao grupo PBS/OVA ($182,8 \pm 25,6$) (Gráfico 1A). Quando foi avaliado o número de eosinófilos o flavonóide isoramnetina ($25,3 \pm 3,2$; $P < 0,001$), myricetina ($27,6 \pm 3,8$; $P < 0,001$) ou GRRK ($32 \pm 5,2$; $P < 0,001$) também reduziram de forma significativa em 75, 73 e 68 %, respectivamente, quando comparados ao grupo PBS/OVA ($101,1 \pm 6,6$) (Gráfico 1B).

Os três flavonóides testados, isoramnetina, myricetina e GRRK reduziram o percentual de mortalidade no teste de anafilaxia sistêmica quando comparados ao grupo de animais PBS/OVA (dados não mostrados). Portanto, esses resultados demonstram que os três flavonóides testados, apresentaram efeito anti-anafilático e anti-asmático considerando promissores candidatos para as demais investigações. No entanto, apenas o GRRK foi escolhido para dar continuidade à pesquisa no modelo de asma alérgica experimental, devido ao maior rendimento de extração, condição necessária para a realização dos demais experimentos *in vivo*.

A**B**

GRRK no número de células totais e
modelo de asma alérgica experimental. Amostras do LBA de camundongos (n = 5) foram coletadas 24 h após o último desafio com OVA para contagem de células totais na câmara de newbauer e eosinófilos em lâminas, na proporção de 100 cel./lâmina após coloração H/E. Os resultados estatísticos representam a diferença da migração de células do LBA dos grupos tratados com ISO, MYR ou GRRK com o grupo PBS/OVA (***) $P < 0,001$) ou PBS/OVA com o grupo PBS/PBS (#) $P < 0,001$) foram considerados significantes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ANOVA "one-way" seguido do teste de Bonferroni. O gráfico é representativo de dois experimentos, realizados de maneira independente.

4.3 Avaliação do efeito do GRRK na dosagem de TNF- α em modelo de inflamação aguda induzida por LPS

Os animais do grupo PBS/LPS ($805,8 \pm 189$; $P < 0,001$) apresentaram um aumento significativo com percentual de 99 % na produção de TNF- α , quando comparados ao grupo PBS/PBS caracterizando presença do processo inflamatório agudo (Gráfico 2). Os animais tratados com GRRK na dose de 30 mg/Kg, via s.c. (220 ± 108 ; $P < 0,05$) ou DEXA (1 mg/kg) ($33,4 \pm 10,6$; $P < 0,001$) apresentaram reduções significativas na produção de TNF- α , com percentual de inibição de 72% ou 93%, respectivamente quando comparados ao grupo de animais PBS/LPS ($805,8 \pm 189$) (Gráfico 2). Esse resultado indica que o tratamento com o GRRK é eficaz em inibir a produção o TNF- α , uma das principais citocinas do processo inflamatório agudo.

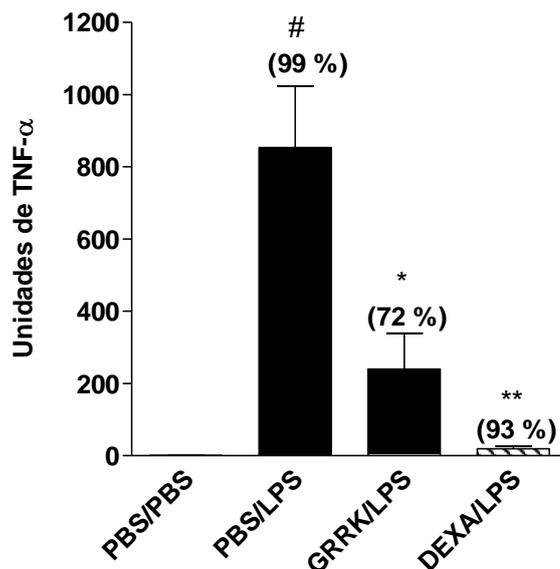


Gráfico 2. Efeito do GRRK (s.c.) na quantificação de TNF- α em camundongos BALB/c elicitados com LPS i.v. Camundongos BALB/c ($n = 5$) receberam uma injeção i.v. de LPS ou PBS 24h após o tratamento s.c. com GRRK (30 mg/kg), DEXA (1 mg/kg) ou PBS. O TNF- α foi quantificado utilizando a técnica de ensaio biológico com a linhagem de células L929. Os resultados estatísticos representam a diferença dos grupos tratados com GRRK (30 mg/kg) ou DEXA (1 mg/kg) com o grupo PBS/OVA ($*P < 0,005$) e ($**P < 0,01$) e PBS/OVA com o grupo PBS/PBS ($\#P < 0,001$) considerados significantes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. O gráfico é representativo de dois experimentos, realizados de maneira independente.

4.4 Investigação do efeito do tratamento profilático com GRRK durante a asma alérgica experimental induzida por OVA

4.4.1 Efeito profilático do GRRK por diferentes vias de administração sobre o número de células totais do LBA

Os animais do grupo que receberam PBS e foram submetidos ao modelo de asma alérgica experimental (item 3.5), denominado grupo PBS/OVA (alérgico) ($176 \pm 20,6$; $P < 0,001$) apresentaram aumento significativo no número total de células no LBA (92 %) quando comparados ao grupo PBS/PBS (controle) ($13,3 \pm 2,2$), demonstrando que o modelo utilizado foi bem reprodutivo em relação ao parâmetro avaliado (Gráfico 3).

Os animais tratados com GRRK na dose de 30mg/kg via s.c. ($53,1 \pm 9,3$; $P < 0,001$) ou i.p ($51,3 \pm 12,4$; $P < 0,001$) apresentaram reduções significativas no número de células totais do LBA com percentual de inibição de 64% em relação ao grupo PBS/OVA ($176 \pm 20,6$) (Gráfico 3), diferente do grupo tratado com GRRK (30 mg/kg) via oral (v.o.) ($128 \pm 17,5$) que não apresentou redução significativa no número de células totais do LBA. Portanto, esses resultados demonstram que o GRRK administrado pelas vias s.c. ou i.p. foram eficazes em reduzir o influxo de células para o LBA. Portanto a via s.c. foi escolhida para as demais avaliações do GRRK, tendo em vista a observação de influxo celular inflamatório por via i.p.

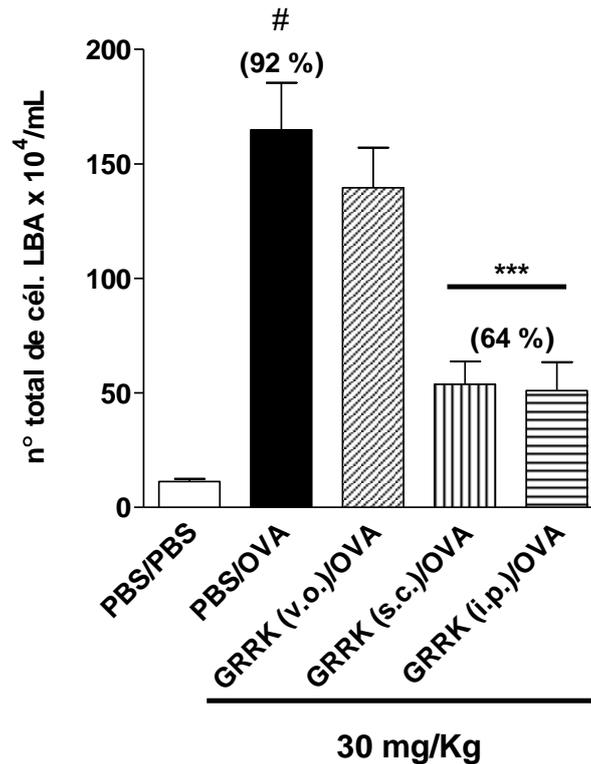


Gráfico 3. Efeito do GRRK em diferentes vias de administração sobre o número de células totais do LBA em modelo de asma alérgica experimental. Amostras do LBA de camundongos ($n = 5$) foram coletadas para contagem de células totais na câmara de Neubauer. Os resultados estatísticos representam a diferença da migração de células do LBA dos grupos tratados com GRRK nas diferentes vias de administração (v.o., s.c. ou i.p.) com o grupo PBS/OVA (***) $P < 0,001$ ou PBS/OVA com o grupo PBS/PBS ($\#P < 0,001$) foram considerados significantes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. O gráfico é representativo de dois experimentos, realizados de maneira independente.

4.4.2 Efeito profilático do GRRK sobre o número de células totais e eosinófilos no LBA

Os grupos de animais tratados com GRRK nas doses de 30 ($87 \pm 9,3$; $P < 0,05$) ou 100 mg/kg ($68,3 \pm 10,1$; $P < 0,001$) via s.c. apresentaram reduções significativas no número de células totais com percentuais de 43 ou 54 %, respectivamente quando comparados ao grupo PBS/OVA ($171,1 \pm 26,3$) (Gráfico 4 A). Quando o número de eosinófilos foi avaliado, o grupo GRRK 30/OVA ($49,3 \pm 10,5$; $P < 0,05$) apresentou redução de 51 % e o grupo GRRK 100 ($37,3 \pm 5,3$; $P < 0,05$) redução de 65 %, quando comparados ao grupo PBS/OVA ($123,8 \pm 38$) (Gráfico 4 B). O grupo tratado com GRRK na dose de 3 mg/kg não apresentou redução significativa na contagem de células totais ($133,2 \pm 23,2$) ou de eosinófilos ($92,1 \pm 25,2$) (Gráfico 4 A e B). O grupo de animais, tratado com DEXA na dose de 1 mg/kg ($72,5 \pm 4,9$; $P < 0,01$) apresentou redução significativa no número de células totais com percentual de 52 % e no número de eosinófilos ($20,4 \pm 5,6$; $P < 0,001$) com percentual de 75 %, quando comparados ao grupo PBS/OVA ($123,8 \pm 38$) (Gráfico 4 A e B).

Nos cortes histológicos de pulmões (Figura 5) foi possível observar a presença ou não do infiltrado inflamatório pela técnica de coloração H/E. No grupo de animais PBS/OVA (Figura 5 B) observa-se um intenso infiltrado de células na região peribroncovascular, caracterizando a instalação do processo inflamatório pulmonar, quando comparado ao grupo de animais PBS/PBS (Figura 5 A). No grupo de animais tratados com GRRK (30 mg/kg) (Figura 5 C) foi observado uma diminuição representativa no recrutamento celular para a região peribroncovascular, semelhante ao aspecto observado na mesma região do grupo DEXA/OVA (Figura 5 D). Esses resultados demonstram que o

tratamento profilático com GRRK foi capaz de diminuir o influxo de células inflamatórias para as vias aéreas de animais com asma alérgica experimental induzida por OVA.

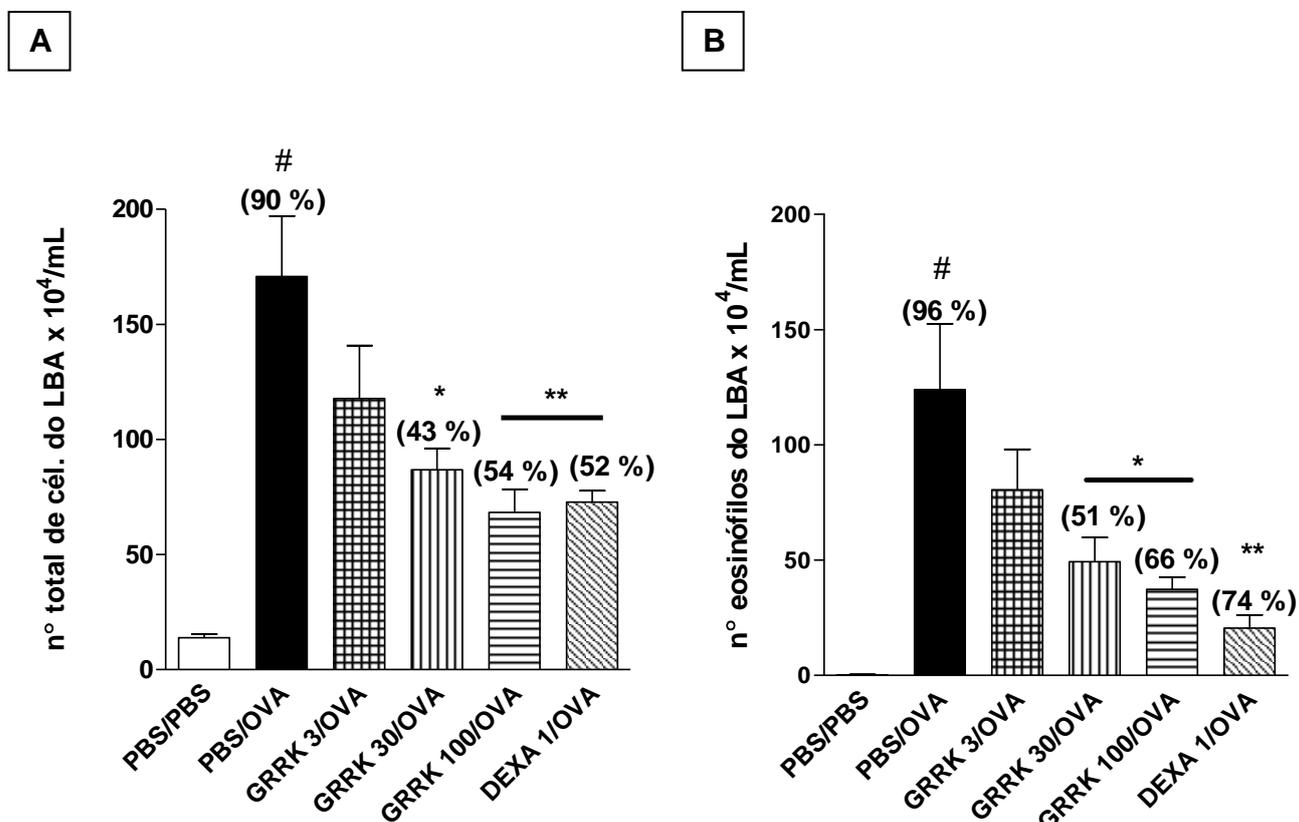


Gráfico 4. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre o número de células totais (A) e de eosinófilos do LBA (B) em modelo de asma alérgica experimental. Amostras do LBA de camundongos (n = 5) foram coletadas 24 h após o último desafio com OVA para contagem de células totais na câmara de newbauer e eosinófilos em lâminas, na proporção de 100 cel./lâmina após coloração H/E. Os resultados estatísticos representam a diferença da migração de células do LBA dos grupos tratados com GRRK ou DEXA com o grupo PBS/OVA (* $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$) ou PBS/OVA com o grupo PBS/PBS ($\#P < 0,001$) foram considerados significantes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ANOVA "one-way" seguido do teste de Bonferroni. O gráfico é representativo de dois experimentos, realizados de maneira independente.

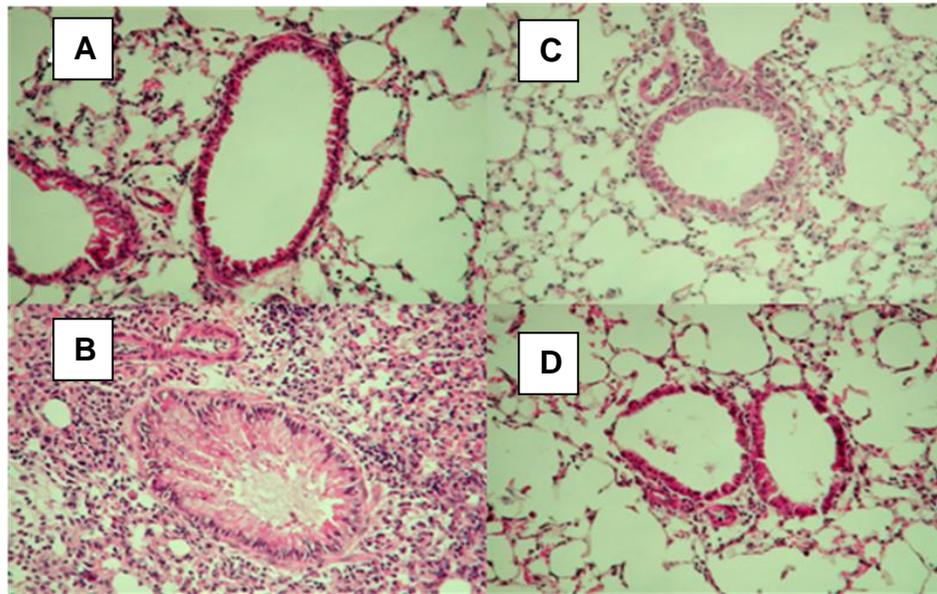


Figura 5. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre o infiltrado inflamatório em cortes histológicos pulmonares. Fotomicrografia representativa dos pulmões corados com H/E visualizados em microscopia óptica no aumento de 40X. Grupos: PBS/PBS (A), PBS/OVA (B), GRRK 30/OVA(C) e DEXA1/OVA (D).

4.4.3 Efeito profilático do GRRK sobre a produção de muco em pulmões de camundongos BALB/c.

A coloração P.A.S. (Ácido Periódico–Schiff) realizada em pulmões foi útil para a demonstração da presença de mucopolissacarídeo. No gráfico 5 observa-se que o grupo PBS/OVA apresentou um aumento significativo ($P < 0,001$) no índice de muco, quando comparado ao grupo de animais PBS/PBS. Neste grupo PBS/PBS (Figura 6 A) pode-se observar ausência de células produtoras de muco nos epitélios bronquiolares de revestimento. O grupo PBS/OVA (Figura 6 B) apresentou intensa produção de muco (glicogênio) pelas glândulas exócrinas unicelulares representadas pelas células caliciformes nos bronquíolo. Nos animais tratados com GRRK (30 mg/kg) ou DEXA observou-se um índice de muco 3,5 vezes menor com significância estatística de $P < 0,001$ em relação ao grupo PBS/OVA (Gráfico 6). Nesses dois grupos GRRK/OVA (Figura 6 C) e DEXA/OVA (Figura 6 D) observa-se nítida redução do número de células produtoras de muco, quando comparados ao grupo de animais PBS/OVA. Portanto, esses resultados demonstram que GRRK tratado de forma profilática diminui significativamente a produção de muco pelas células caliciformes pulmonares, semelhante ao tratamento com a dexametasona.

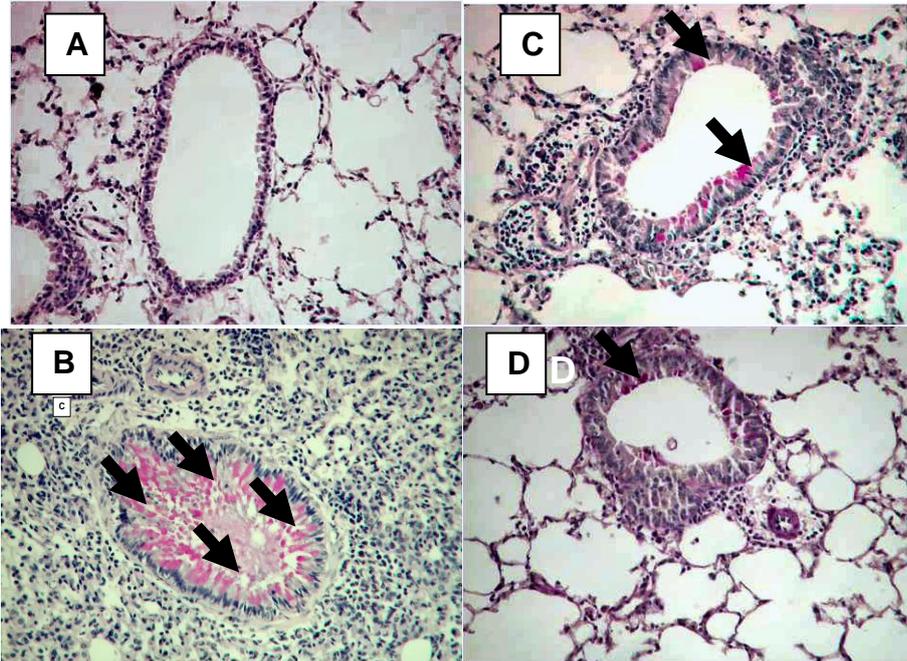


Figura 6. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre a produção de muco em cortes histológicos pulmonares. Fotomicrografia representativa dos pulmões corados com Ácido periódico- Schiff (PAS) visualizados em microscopia óptica no aumento de 40X. Grupos: PBS/PBS (A), PBS/OVA (B), GRRK 30/OVA(C) DEXA1/OVA(D).

4.4.4 Efeito profilático do GRRK na HRB

Como se pode observar no Gráfico 6, o grupo de animais PBS/OVA ($8,3 \pm 0,17$; $P < 0,001$) apresentou um aumento significativo do *Penh* com percentual de 78 % quando comparado com o grupo de animais PBS/PBS ($2,03 \pm 0,17$). Estes resultados confirmam a confiabilidade do modelo de asma alérgica experimental, que além de induzir inflamação das vias aéreas, causa prejuízo à função pulmonar, quando comparados aos animais do grupo PBS/PBS (controle).

Os grupos de animais tratados com GRRK 30 ($5,1 \pm 1,4$; $P < 0,05$) ou 100mg/kg ($4,2 \pm 0,6$; $P < 0,05$) ou DEXA ($2,8 \pm 0,9$; $P < 0,001$) apresentaram diminuição significativa no valor do *Penh*, em relação ao grupo PBS/OVA ($8,3 \pm 0,17$) demonstrando que o GRRK foi eficaz em melhorar a função pulmonar no modelo de asma alérgica experimental.

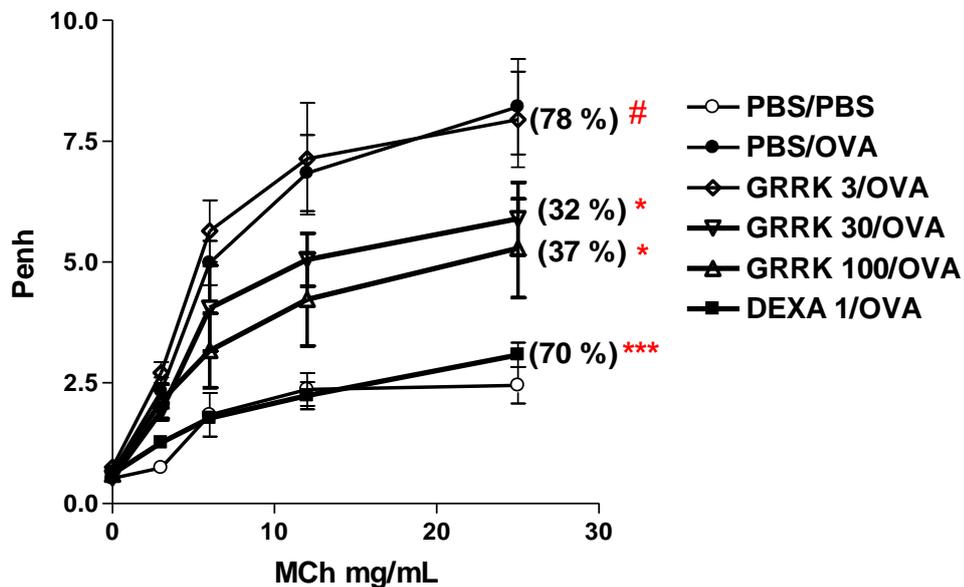


Gráfico 6. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre a hiperreatividade brônquica em modelo de asma alérgica experimental. Diferentes grupos de camundongos BALB/c (n=5) foram submetidos à inalação de doses crescentes de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL 24 h após o último desafio com OVA. Os resultados estatísticos representam a diferença da hiperreatividade dos grupos tratados com GRRK ou DEXA com o grupo PBS/OVA (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$) ou PBS/OVA com o grupo PBS/PBS ($^{\#}P < 0,001$) foram considerados significantes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ANOVA "one-way" seguido do teste de Bonferroni. O gráfico é representativo de dois experimentos, realizados de maneira independente.

4.4.5 Efeito profilático de GRRK na produção de citocinas (IL-5, IL-13) do LBA

Os animais tratados com GRRK 30 (3200 ± 387 ; $P < 0,05$) ou 100 mg/Kg (1888 ± 25 ; $P < 0,001$) ou DEXA (998 ± 80 ; $P < 0,001$) apresentaram reduções significativas de IL-5 com percentuais de 33, 61 e 79 %, respectivamente (Gráfico 7 A) quando comparados ao grupo PBS/OVA (4943 ± 173). Quando a IL-13 foi avaliada (Gráfico 7 B), observou-se que o grupo GRRK 30 (1550 ± 339 ; $P < 0,05$) ou 100 mg/Kg (1130 ± 120 ; $P < <0,001$) ou DEXA (790 ± 99 ; $P < 0,001$) também apresentaram reduções significativas de IL-13 com percentuais de 28, 49 e 67 %, respectivamente (Gráfico 7 B) quando comparados ao grupo PBS/OVA (2100 ± 320). Esses resultados demonstram que o tratamento com GRRK foi capaz de inibir duas importantes citocinas do perfil Th2, IL-5 e IL-13, responsável na produção e diferenciação de eosinófilo e IgE, respectivamente.

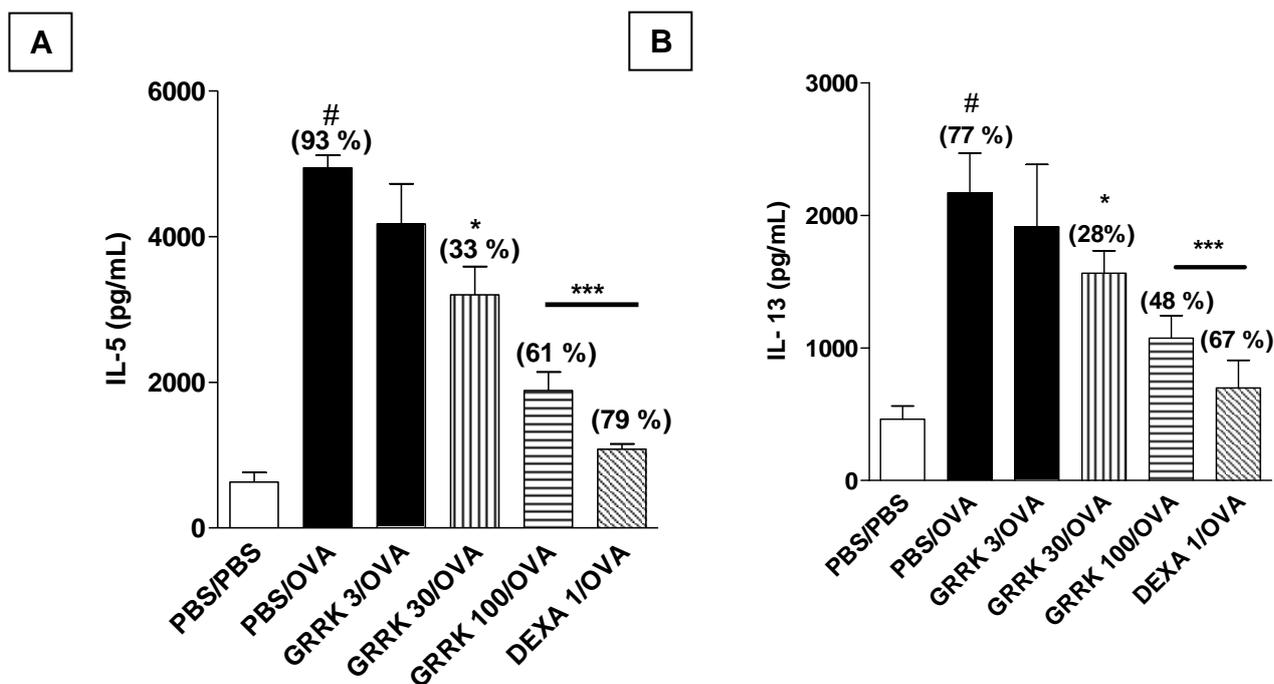


Gráfico 7. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre a produção de citocinas de LBA em modelo de asma alérgica experimental. Sobrenadantes de amostras do LBA de camundongos BALB/c ($n = 5$) coletadas 24 h após o último desafio com OVA foram utilizadas para dosagem da citocinas IL-5 (A) e IL-13 (B). Os resultados estatísticos representam a diferença da produção de citocinas dos grupos tratados com GRRK ou DEXA com o grupo PBS/OVA ($*P < 0,05$ e $*** P < 0,001$) e PBS/OVA com o grupo PBS/PBS ($\#P < 0,001$) foram considerados significantes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. O gráfico é representativo de dois experimentos, realizados de maneira independente.

4.4.6 Efeito profilático do GRRK na produção de IgE OVA-específica

Os títulos de IgE OVA-específica foram de $1:1000 \pm 100$ para o grupo PBS/OVA. Os grupos de animais tratado com GRRK (30 mg/kg) ou DEXA (1mg/kg) apresentaram reduções significativas ($P < 0,01$) de 5 vezes ($1:200 \pm 30$) quando comparados ao grupo PBS/OVA (Gáfico 8) . Não foi possível quantificar o título de IgE OVA-específica no grupo PBS/PBS (controle). Portanto, o tratamento com GRRK foi capaz de inibir IgE OVA-específica, responsável por mediar a asma alérgica.

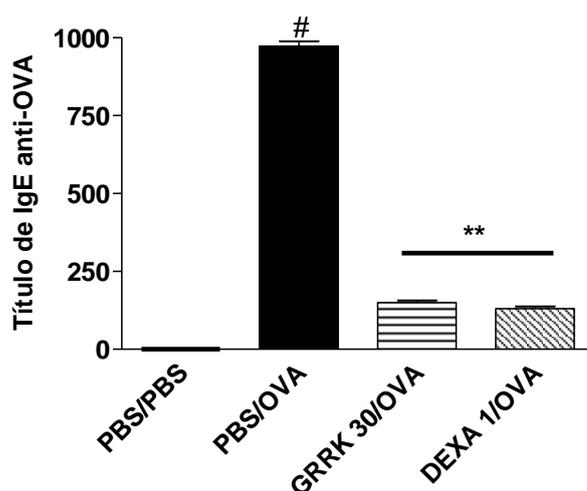


Gráfico 8. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre o título de IgE OVA-específica de soro em modelo de asma alérgica experimental. Amostras de soro de camundongos BALB/c ($n = 7$) foram coletadas para a avaliação do título de IgE OVA-específica através da técnica de anafilaxia cutânea passiva (PCA). Os resultados estatísticos representam a diferença da produção de IgE OVA-específica LBA dos grupos tratados com GRRK (30 mg/kg) ou DEXA (1 mg/kg) com o grupo PBS/OVA ($**P < 0,01$) ou PBS/OVA com o grupo PBS/PBS ($^{\#}P < 0,001$) foram considerados significantes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. O gráfico é representativo de dois experimentos, realizados de maneira independente.

4.5. Investigação do efeito do tratamento terapêutico com GRRK durante a asma alérgica experimental induzida por OVA

Após a observação do efeito protetor no tratamento preventivo com o GRRK em vários parâmetros moleculares e funcionais da asma alérgica experimental, investigou-se o tratamento com o GRRK após o estabelecimento da asma alérgica experimental (protocolo terapêutico).

4.5.1. Efeito terapêutico do GRRK na migração de células inflamatórias para as vias aéreas

Os grupos de animais tratados com GRRK 30 (117 ± 21 ; $P < 0,05$) ou 100 mg/kg ($78 \pm 10,5$; $P < 0,01$) ou DEXA ($55 \pm 6,2$; $P < 0,001$) apresentaram reduções significativas na migração de células inflamatórias com percentuais de 26, 55 ou 60 %, respectivamente (Gráfico 9 A) quando comparados ao grupo PBS/OVA (189 ± 26). Quando o número de eosinófilos foi avaliado, os grupos GRRK 30/OVA (71 ± 16) e GRRK 100/OVA ($33 \pm 9,2$) apresentaram reduções em 42 e 71 %, respectivamente, bem como o grupo DEXA/OVA ($22 \pm 6,8$) com redução de 82 % quando comparados ao grupo PBS/OVA (133 ± 20) (Gráfico 9 B), no entanto a dose de 3 mg/Kg de GRRK não demonstrou redução significativa no número total de células inflamatórias ou no número de eosinófilos do LBA quando comparados ao grupo PBS/OVA.

Quando os pulmões foram analisados, o grupo GRRK 30/OVA (Figura 7 C) ou DEXA /OVA (Figura 7 C) foram eficientes em reduzir o influxo inflamatório na região peribroncovascular, quando comparado ao grupo PBS/OVA (Figura 7 B), visualizados nos cortes histológicos corados com HE.

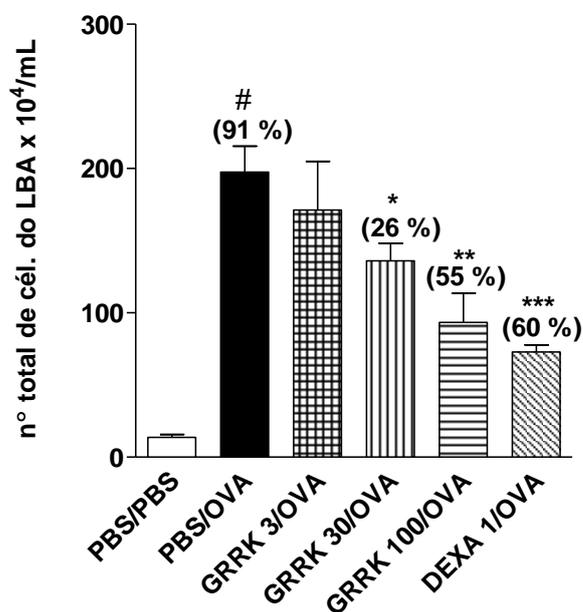
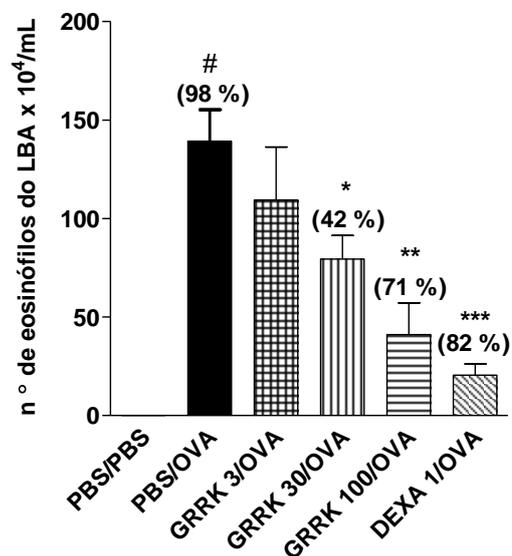
A**B**

Gráfico 9. Efeito do tratamento terapêutico com GRRK sobre o número de células totais (A) e de eosinófilos do LBA (B) em modelo de asma alérgica experimental. Amostras do LBA de camundongos ($n = 5$) foram coletadas 24 h após o último desafio com OVA para contagem de células totais na câmara de newbauer e eosinófilos em lâminas, na proporção de 100 cel./lâmina após coloração H/E. Os resultados estatísticos representam a diferença da migração de células do LBA dos grupos tratados com GRRK ou DEXA com o grupo PBS/OVA (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e $P < 0,001$) ou PBS/OVA com o grupo PBS/PBS (# $P < 0,001$) foram considerados significantes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. O gráfico é representativo de dois experimentos, realizados de maneira independente.

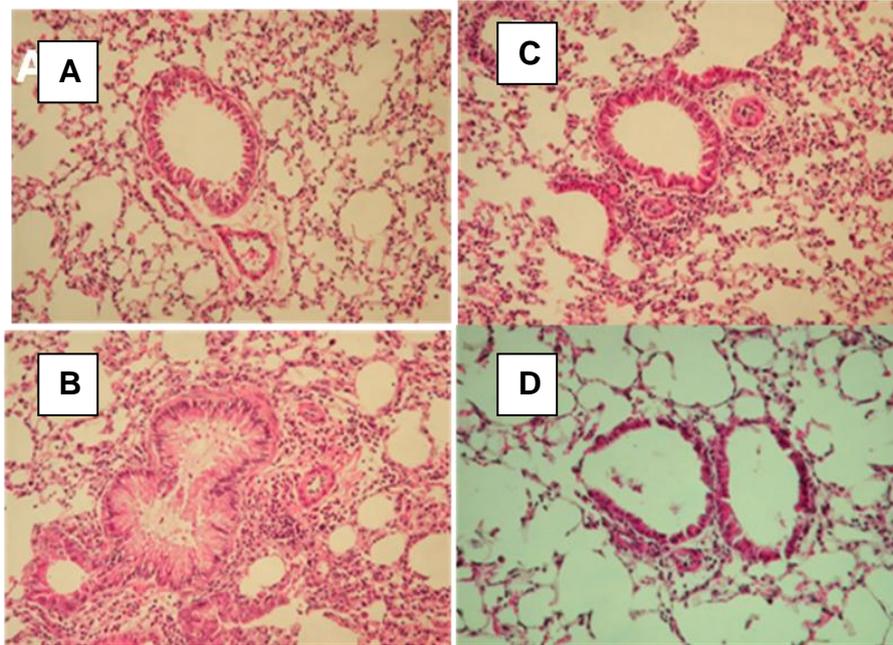


Figura 7. Efeito do tratamento terapêutico com GRRK sobre o infiltrado inflamatório em cortes histológicos pulmonares. Fotomicrografia representativa dos pulmões corados com H/E visualizados em microscopia óptica no aumento de 40X. Grupos: PBS/PBS (A), PBS/OVA (B), GRRK 30/OVA(C) e DEXA 1/OVA (D).

4.5.2. Efeito terapêutico do GRRK na produção de muco em pulmões de camundongos BALB/c.

No gráfico 11, observa-se que o grupo PBS/OVA apresentou um aumento significativo ($P < 0,001$) no índice de muco, quando comparado ao grupo de animais PBS/PBS. O grupo PBS/OVA (Figura 8 B) apresentou intensa produção de muco (glicogênio) pelas glândulas exócrinas unicelulares representadas pelas células calciformes nos bronquíolo. Nos animais tratados com GRRK (30 mg/kg) ou DEXA observou-se um índice de muco 2,5 ou 3 vezes menor com significância estatística de $P < 0,001$ em relação ao grupo PBS/OVA (Gráfico 10). Nesses dois grupos GRRK/OVA (Figura 8 C) e DEXA/OVA (Figura 8 D) observam-se nítida redução do número de células produtoras de muco, quando comparados ao grupo de animais PBS/OVA. Portanto, esses resultados demonstram que GRRK administrado de forma terapêutica também diminui significativamente a produção de muco pelas células calciformes pulmonares, semelhante ao tratamento com a dexametasona.

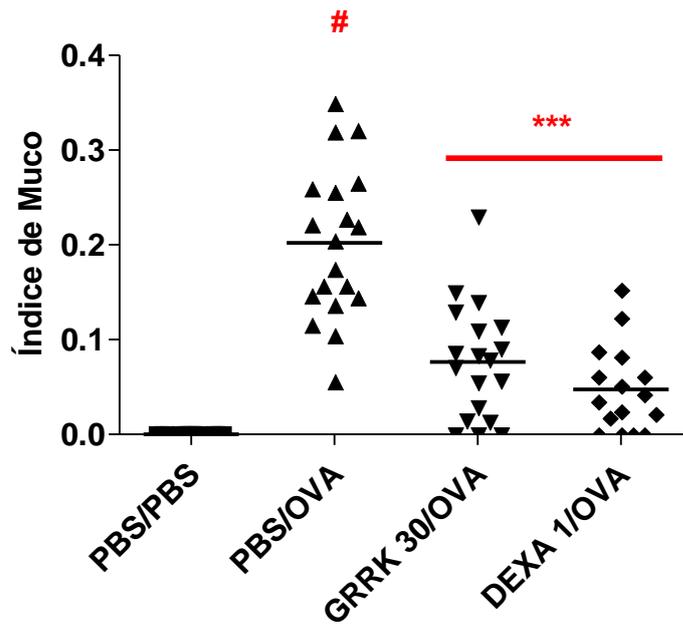


Gráfico 10. Efeito do tratamento terapêutico com GRRK sobre o índice de muco de pulmão em modelo de asma alérgica experimental. Os pulmões dos camundongos ($n = 20$) foram retirados 24 h após o último desafio com OVA para a realização dos cortes histológicos e coloração com ácido periódico de Shiff (PAS) para análise em microscopia óptica, utilizando um software que permitiu a quantificação do índice de muco. Os resultados estatísticos representam a diferença do índice de muco dos grupos tratados com GRRK ou DEXA com o grupo PBS/OVA ($***P < 0,001$) ou PBS/OVA com o grupo PBS/PBS ($\#P < 0,001$) considerados significantes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni.

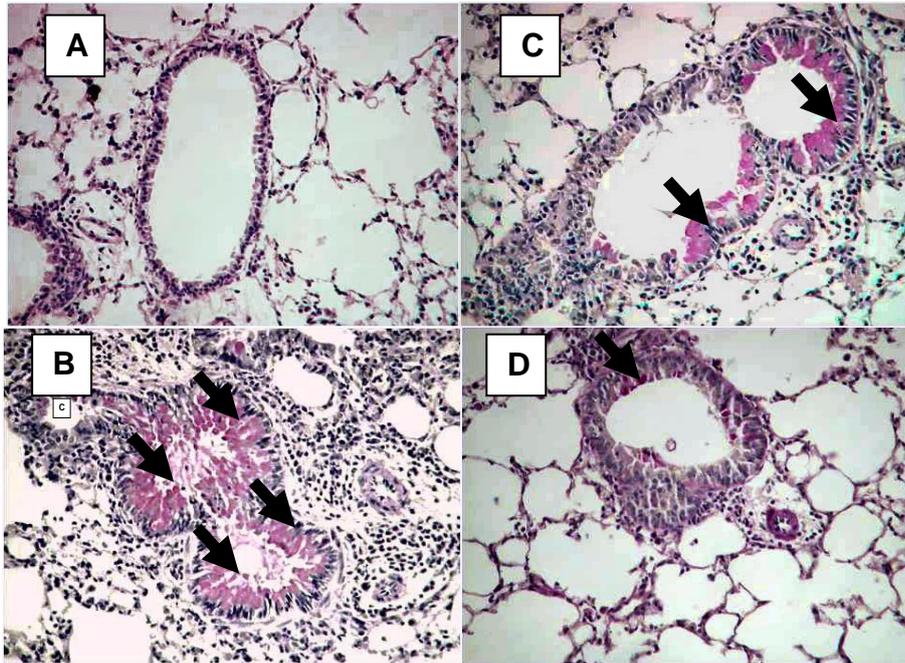


Figura 8. Efeito do tratamento terapêutico com GRRK sobre a produção de muco em cortes histológicos pulmonares. Fotomicrografia representativa dos pulmões corados com PAS visualizados em microscopia óptica no aumento de 40X. Grupos: PBS/PBS (A), grupo PBS/OVA (B), grupo GRRK 30/OVA(C) e grupo DEXA 1/OVA (D)

4.5.3. Efeito terapêutico do GRRK na HRB

Como se pode observar no Gráfico 11, o grupo de animais PBS/OVA ($7,3 \pm 1,3$; $P < 0,001$) apresentou um aumento significativo do *Penh* com percentual de 74 % quando comparado com o grupo de animais PBS/PBS ($1,6 \pm 0,9$). Os grupos de animais tratados com GRRK 30 ($3,9 \pm 0,9$; $P < 0,05$) ou 100mg/kg ($4,8 \pm 1,6$; $P < 0,05$) ou DEXA ($2,8 \pm 0,7$; $P < 0,001$) apresentaram diminuição significativa no valor do *Penh* em relação ao grupo PBS/OVA ($7,3 \pm 1,3$) (Gráfico 11), demonstrando que o GRRK tratado de forma terapêutica também foi eficaz em melhorar a função pulmonar no modelo de asma alérgica experimental.

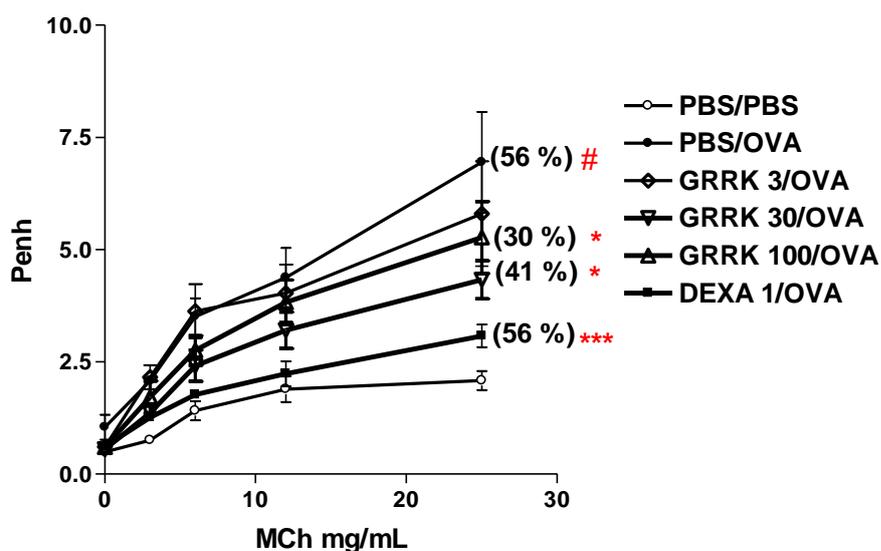


Gráfico 11. Efeito do tratamento terapêutico com GRRK sobre a hiperreatividade brônquica em modelo de asma alérgica experimental. Diferentes grupos de camundongos BALB/c ($n = 5$) foram submetidos à inalação de doses crescentes de metacolina (MCh) 3, 6, 12 e 25 mg/mL 24 h após o último desafio com OVA. Os resultados estatísticos representam a diferença da hiperreatividade dos grupos tratados com GRRK ou DEXA com o grupo PBS/OVA ($*P < 0,05$ e $***P < 0,001$) ou PBS/OVA com o grupo PBS/PBS ($\#P < 0,001$) foram considerados significantes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. O gráfico é representativo de dois experimentos, realizados de maneira independente.

4.5.4 Efeito terapêutico do GRRK na produção de citocinas (IL-5 e IL-13) do LBA

Embora tenha sido possível observar semelhanças na redução dos parâmetros da asma alérgica experimental entre os protocolos profilático e terapêutico, o tratamento terapêutico com GRRK 30 mg/Kg (1237 ± 154) não foi eficiente em reduzir a produção de IL-5 como pode ser observado no Gráfico 12 A. Apenas os grupos de animais tratados com GRRK 100 mg/kg (1050 ± 122 ; $P < 0,05$) ou DEXA (1030 ± 73 ; $P < 0,05$) apresentaram redução significativa na produção da IL-5 com percentual de 33 % em ambos os tratamentos quando comparados ao grupo PBS/OVA (1800 ± 187) (Gráfico 12), porém a produção de IL-13 foi reduzida de forma significativa nos grupos tratados com GRRK 30 (510 ± 70 ; $P < 0,05$) ou 100 mg/kg (405 ± 63 ; $P < 0,05$), com percentuais 39 e 43 %, respectivamente, proporcional ao grupo DEXA/OVA (363 ± 52 ; $P < 0,05$) que reduziu IL-13 de forma significante com percentual de 46 % (Gráfico 12 B) quando comparados ao grupo PBS/OVA (980 ± 120). Portanto, esses resultados demonstram que o tratamento com GRRK após o estabelecimento da asma foi capaz de inibir duas importantes citocinas do perfil Th2, IL-5 e IL-13.

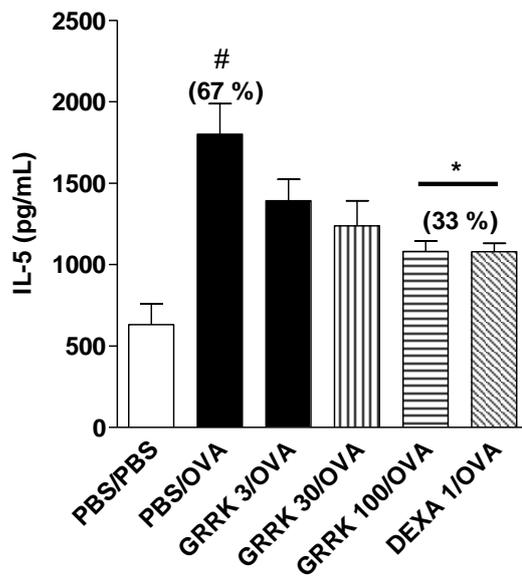
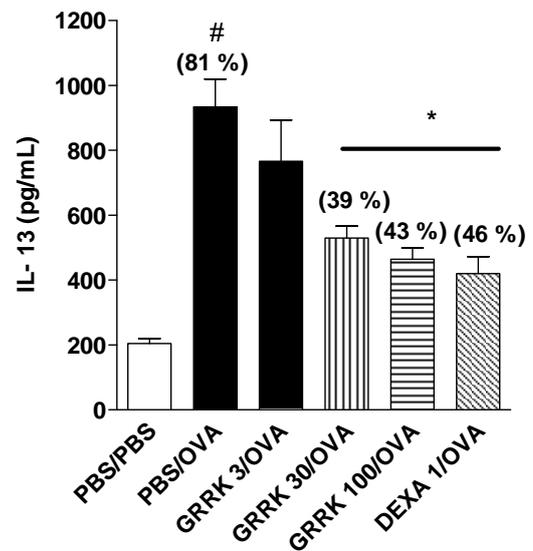
A**B**

Gráfico 12. Efeito do tratamento terapêutico com GRRK sobre a produção de citocinas de LBA em modelo de asma alérgica experimental. Sobrenadantes de amostras do LBA de camundongos BALB/c ($n = 5$) coletadas 24 h após o último desafio com OVA foram utilizadas para dosagem da citocinas IL-5 (A) e IL-13 (B). Os resultados estatísticos representam a diferença da produção de citocinas dos grupos tratados com GRRK ou DEXA com o grupo PBS/OVA ($*P < 0,05$) e PBS/OVA com o grupo PBS/PBS ($\#P < 0,001$) foram considerados significantes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. O gráfico é representativo de dois experimentos, realizados de maneira independente.

4.5.5 Efeito terapêutico do GRRK na produção de IgE OVA-específica

Os títulos de IgE OVA-específica foram de $1:1000 \pm 100$ para o grupo PBS/OVA. Os grupos de animais tratados com GRRK (30 mg/kg) ou DEXA (1mg/kg) apresentaram redução significativa ($P < 0,01$) de 5 vezes ($1:250 \pm 20$) quando comparados ao grupo PBS/OVA (Gráfico 13). Não foi possível quantificar o título de IgE OVA-específica no grupo PBS/PBS (controle). Portanto, o tratamento com GRRK foi capaz de inibir IgE OVA-específica, responsável por mediar a asma alérgica.

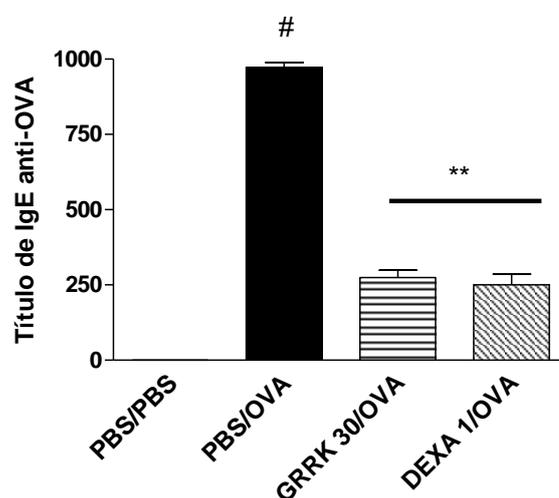


Gráfico 13. Efeito do tratamento terapêutico com GRRK sobre a produção de IgE anti-OVA de soro em modelo de asma alérgica experimental. Sobrenadantes de amostras de LBA de camundongos ($n = 7$) coletadas 24 h após o último desafio com OVA foram utilizadas para dosagem das citocinas IL-5 (A) e IL-13 (B). Amostras de soro foram coletadas para a avaliação do título de IgE OVA-específica pela técnica de anafilaxia cutânea passiva (PCA). Os resultados estatísticos representam a diferença dos grupos tratados com GRRK ou DEXA com o grupo PBS/OVA ($*P < 0,05$ e $**P < 0,01$) e PBS/OVA com o grupo PBS/PBS ($\#P < 0,001$) foram considerados significantes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. O gráfico é representativo de dois experimentos, realizados de maneira independente.

4.6 Avaliação do efeito profilático do GRRK sobre a caracterização fenotípica de células do LBA em modelo de asma alérgica experimental

4.6.1 Efeito profilático do GRRK sobre os linfócitos T CD4⁺ e LB

Para a análise no FACS das moléculas CD4 e B220 foi selecionado da suspensão celular do LBA uma população celular com baixa SSC (granulosidade) e baixo FSS (tamanho), considerada população linfocítica do LBA.

Os animais tratados com GRRK (30mg/kg) ou DEXA (1mg/kg) apresentaram diminuição representativa no percentual de células CD4⁺ (42% ou 30 %, respectivamente) e de células B220 (6% ou 3%, respectivamente) da suspensão de linfócitos do LBA quando comparados ao grupo PBS/OVA (Figura 9). Quando essas células marcadas com CD4⁺ foram quantificadas pôde-se observar que o grupo GRRK 30/OVA ($3,6 \pm 1,2$; $P < 0,001$) ou DEXA 1/OVA ($2,4 \pm 0,8$; $P < 0,001$) apresentaram redução significativa com percentual de 62 ou 76 %, respectivamente em relação ao grupo PBS/OVA ($13,3 \pm 2,2$). (Gráfico 14 A) Da mesma forma, quando se avaliou o número de células B220 no total de células do LBA pode-se observar que o grupo GRRK 30/OVA ($0,48 \pm 0,04$; $P < 0,001$) ou DEXA 1/OVA ($0,18 \pm 0,03$; $P < 0,001$) apresentou redução significativa com percentual de 65 ou 88 %, respectivamente em relação ao grupo PBS/OVA ($2,9 \pm 0,7$) (Gráfico 14B). No detalhe do Gráfico 14 encontram-se os valores das células totais do LBA dos grupos experimentais avaliados. Desta forma, esses resultados demonstram que o tratamento com GRRK foi capaz de inibir o influxo de duas importantes células efetoras, o LTCD4⁺ e LB controlando assim a resposta inflamatória alérgica pulmonar.

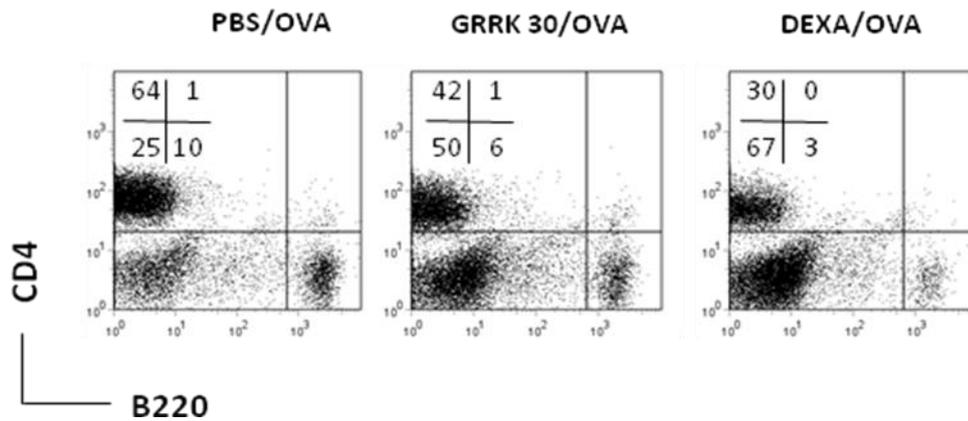


Figura 9. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre o percentual de linfócitos T CD4⁺ e LB do LBA em modelo de asma alérgica experimental. Amostras do LBA de BALB/c (n = 5) foram submetidas a marcação com anticorpos extracelulares anti-CD4 e anti-B220 e em seguida analisadas por FACS. A figura acima mostra dot *plots* de *gates* de células com baixa SSC (granulosidade) e baixa FSC (tamanho). A figura é representativa de dois experimentos, realizados de maneira independente.

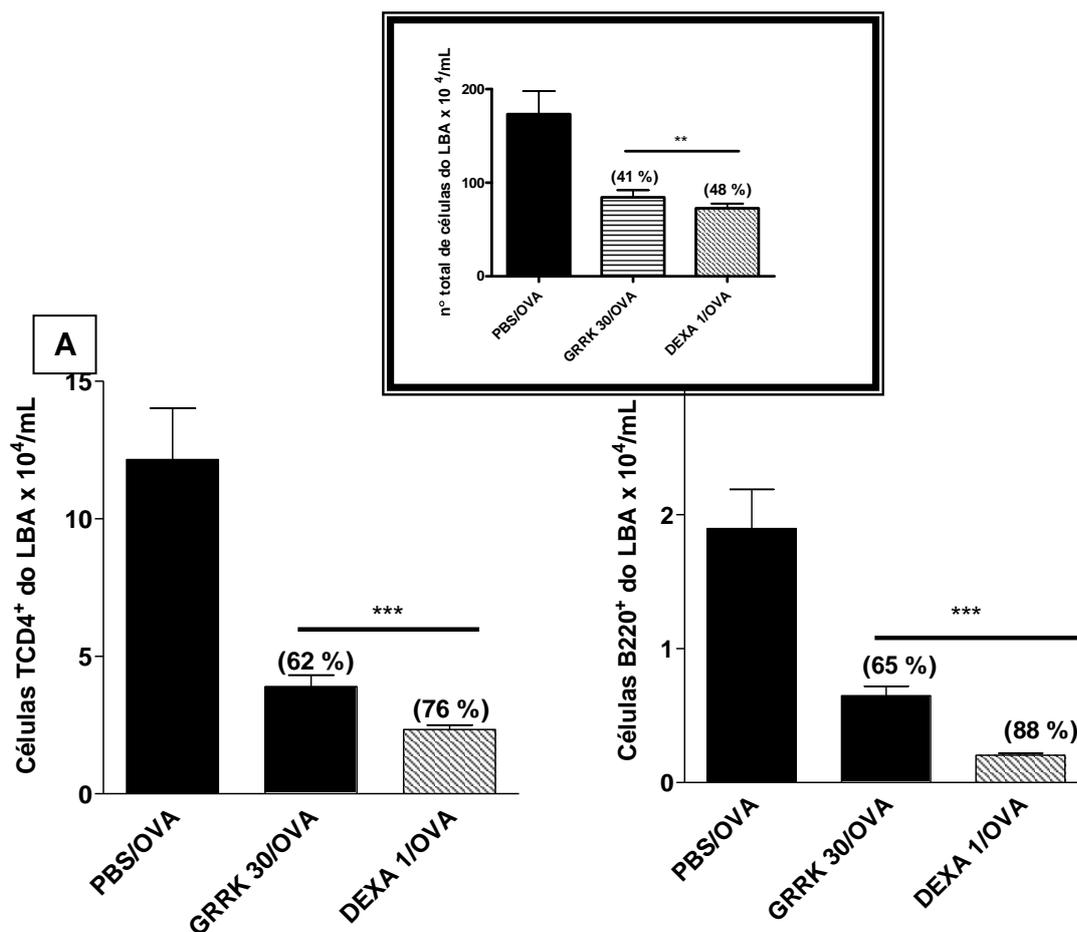


Gráfico 14. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre o número de linfócitos T CD4⁺ e LB do número total de células do LBA em modelo de asma alérgica experimental. Amostras do LBA de BALB/c (n = 5) foram submetidas a marcação com anticorpos extracelulares anti-CD4 e anti-B220 e em seguida analisadas por FACS. Os resultados estatísticos representam as diferenças significantes do número de células de LTCD4 (A) ou LB(B) do número total de células do LBA tratados com GRRK ou DEXA com o grupo de animais PBS/OVA (***) $P < 0,001$). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. O gráfico é representativo de dois experimentos, realizados de maneira independente.

4. 6.2 Efeito profilático do GRRK sobre a expressão de MHC de classe II, CD40 e CD80 em células apresentadoras de antígenos (APCs).

Os grupos de animais PBS/OVA e GRRK/OVA apresentaram diminuições representativas no percentual (1,3% e 2,9%, respectivamente) de células CD11b⁺CD11c⁺ (APCs) no LBA quando comparados ao grupo de animais controle PBS/PBS (4,7%) (Figura 10). Já o grupo de animais DEXA/OVA apresentou um aumento no percentual dessas células CD11b⁺CD11c⁺ (11,3%), quando comparadas ao grupo PBS/PBS ou PBS/OVA (Figura 10).

O grupo PBS/OVA apresentou maior intensidade de fluorescência média (MFI) das moléculas de MHC-II, CD80 e CD40 de células CD11b⁺CD11c⁺ (MFI: 1615, 1416 e 468, respectivamente), mesmo com um menor número de células CD11b⁺CD11c⁺, quando comparado ao grupo PBS/PBS (MFI: 272, 805 e 238, respectivamente) (Figura 10), demonstrando a ativação das APCs presentes no LBA de animais PBS/OVA (alérgicos).

Nos animais tratados com GRRK ou DEXA pode-se observar uma redução significativa do MFI das moléculas de MHC-II (951 e 304, respectivamente) e CD40 (308 e 220, respectivamente) em relação aos animais do grupo PBS/OVA (Figura 10). O tratamento com GRRK não foi capaz de inibir a expressão da molécula CD80 (Figura 10). Esses resultados mostraram que o tratamento com GRRK além de atuar em células efetoras também parece estar atuando na desativação das APCs na resposta inflamatória alérgica pulmonar.

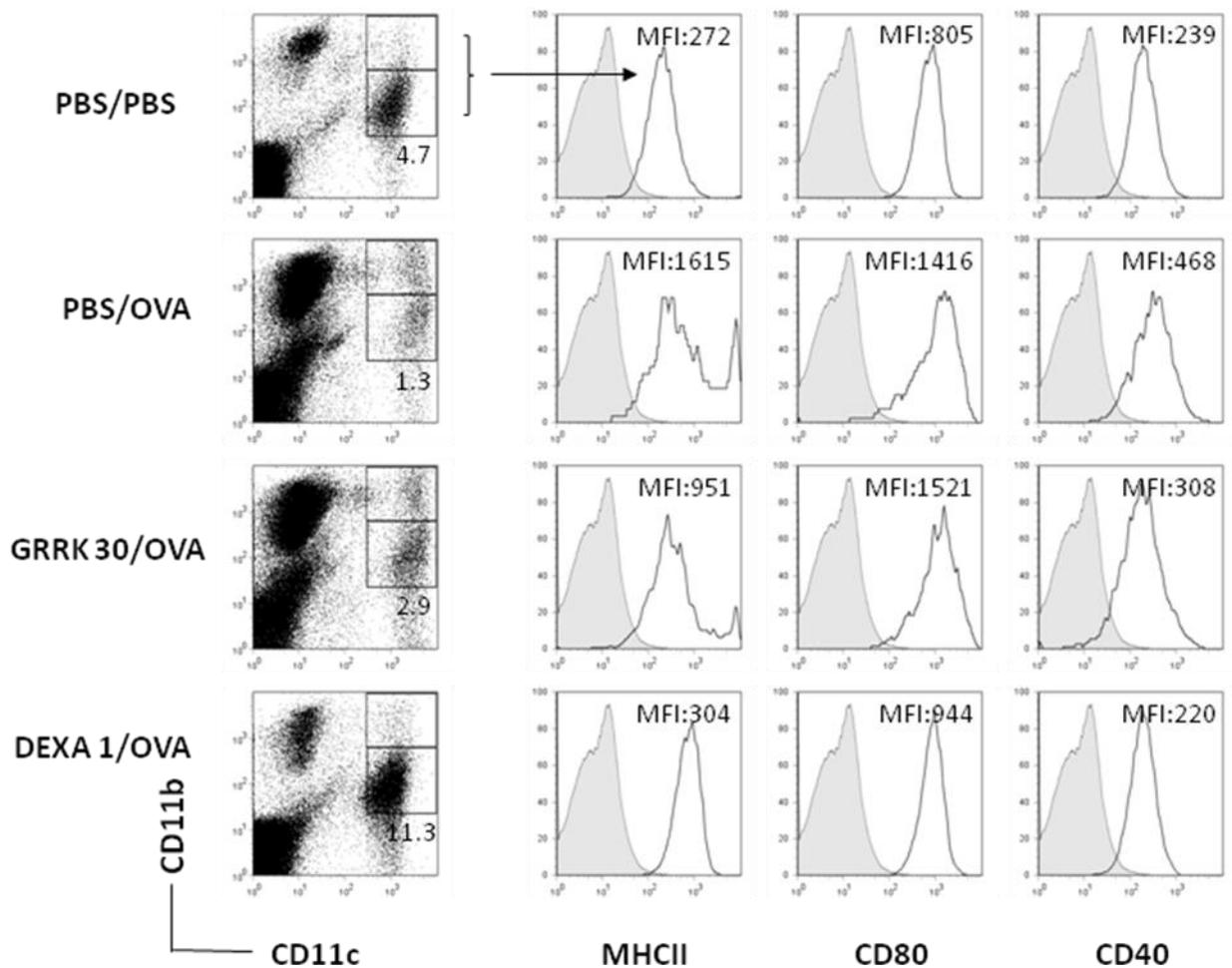


Figura 10. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre a expressão de moléculas MHC de classe II, CD40 e CD80 de células apresentadoras de antígenos (APCs) do LBA em modelo de asma alérgica experimental. Amostras do LBA de camundongos ($n = 5$) foram coletadas e submetidas a marcação com anticorpos extracelulares anti-CD11c, anti-CD11b, anti-CD80, anti-CD40, anti I-A^d (MHC II) and anti-IgG2a (isotipo controle) em seguida analisadas por FACS. A figura acima mostra plots de FACS de células expressando CD11c+CD11b+(esquerda) e histogramas de MHC de classe II, CD40 e CD80 de *gate* de células CD11c+CD11b+(direita). O gráfico é representativo de dois experimentos.Os resultados estão representados como intensidade média de fluorescência (MFI). Histograma sólido corresponde ao isotipo controle.

4.8 Investigação do efeito profilático do GRRK sobre a resposta imune reguladora

4.7.1 Efeito profilático do GRRK sobre a produção de IFN- γ de mLN- Influência da resposta Th1

Na tentativa de avaliar um possível desvio de resposta imune, responsável pelos efeitos inibitórios da asma alérgica frente ao tratamento do GRRK, investigou-se a produção de citocina IFN- γ do perfil Th1, a partir de sobrenadante de cultura de células de linfonodos mediastinais, região mais próxima do pulmão.

Pode-se observar no gráfico 15 que as células dos linfonodos mediastinais do grupo PBS/OVA (1860 ± 60 ; $P < 0,001$) estimulados com Conavalina – A (Con-A) apresentaram um aumento significativo com percentual de 67 % na produção de IFN- γ , comparadas com as células do grupo PBS/PBS (539 ± 199). Contudo, as células dos animais tratados com GRRK 30 (2380 ± 30) ou DEXA (1998 ± 11) não apresentaram alterações na produção desta citocina quando comparadas ao grupo PBS/OVA (1860 ± 60). Portanto, o GRRK não tem efeito sobre IFN- γ em culturas de linfonodos mediastinais.

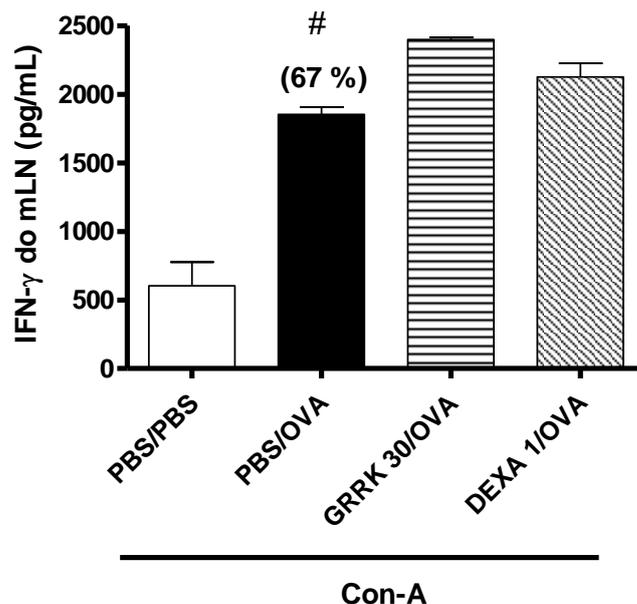


Gráfico 15. Efeito do tratamento profilático com GRRK na produção de IFN- γ de linfonodo mediastinal (mLN) em modelo de asma alérgica experimental. Sobrenadantes de culturas de células do linfonodo mediastinal (mLN) de camundongos ($n = 5$) coletadas 24 h após o último desafio com OVA foram utilizadas para dosagem de IFN- γ . Os resultados estatísticos representam a diferença dos grupos PBS/OVA com o grupo PBS/PBS ($^{\#}P < 0,001$) considerados significantes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. O gráfico é representativo de dois experimentos, realizados de maneira independente.

4.7.2 Efeito profilático do GRRK na expressão de LT CD4⁺ Foxp3⁺ do LBA-Influência na resposta T_{reg}

Para se investigar outra possível via regulatória do GRRK, avaliou-se a participação dos LT reguladores (LT CD4⁺foxP3⁺) no modelo de asma alérgica experimental.

O grupo de animais PBS/OVA apresentou um aumento no percentual (5,1 %) de células CD4⁺foxP3⁺ quando comparados ao grupo PBS/PBS (0,7%) (Figura 11). Os animais tratados com GRRK 30 apresentaram aumento representativo no percentual de células CD4⁺foxP3⁺ (8,5%), já os animais tratados com DEXA apresentaram supressão dessas células (1,7%) quando comparados ao grupo PBS/OVA com percentual de aproximadamente 5,0 % (Figura 11). Quando essas células marcadas com CD4⁺ foxP3⁺ foram quantificadas em relação ao número de células totais do LBA, o grupo GRRK 30/OVA não apresentou redução significativa na referida população celular, diferente dos animais tratados com DEXA ($0,05 \pm 0,003$; $P < 0,001$) que apresentaram redução significativa com percentual de inibição de 91 % do número de células CD4⁺foxP3⁺ do número total de células do LBA quando comparados ao animais do grupo PBS/OVA ($0,68 \pm 0,1$) (Gráfico 16). Ao lado encontram-se os valores das células totais do LBA dos grupos experimentais avaliados.

Esses resultados mostram que embora o GRRK tenha a capacidade de regredir a inflamação alérgica, esse flavonóide não foi capaz de modificar o perfil de células CD4⁺ foxP3⁺

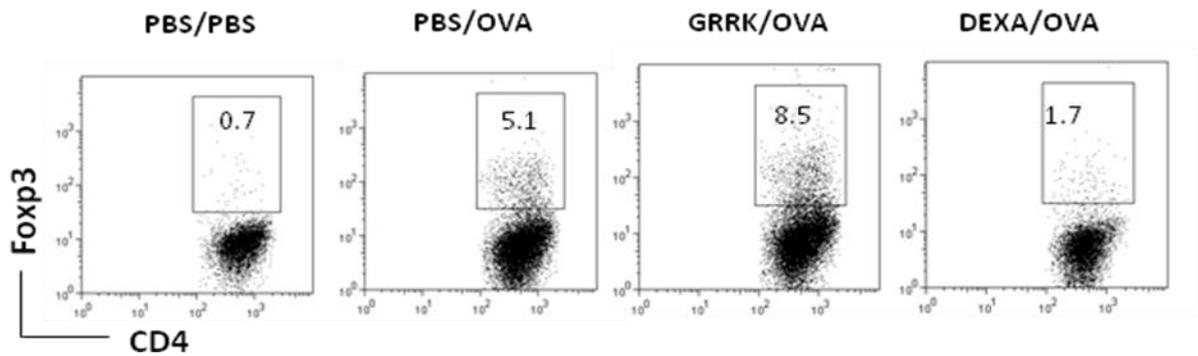


Figura 11. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre o percentual de linfócitos T CD4⁺ Foxp3⁺ do LBA em modelo de asma alérgica experimental. Amostras do LBA de camundongos (n = 5) foram submetidas a marcação com anticorpos extracelulares anti-CD4 e intracelular foxP3+ e em seguida analisadas por FACS. A figura acima mostra *plots* de *gates* de células com baixa CCS (granulosidade) e baixa FSC (tamanho).

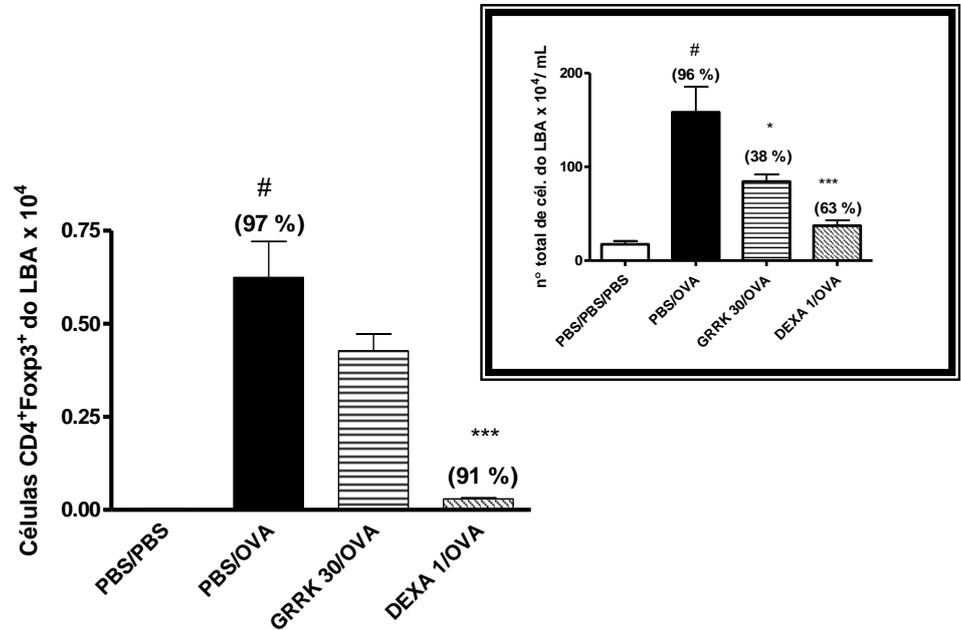


Gráfico 16. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre o número de linfócitos CD4⁺Foxp3⁺ do número total de células do LBA em modelo de asma alérgica experimental. Amostras de LBA de BALB/c (n = 5) foram submetidas a marcação com anticorpos intracelulares anti-CD4 e intracelulares foxP3⁺ e em seguida analisadas por FACS. Os resultados estatísticos representam a diferença dos grupos tratados GRRK ou DEXA com o grupo PBS/OVA (***) $P < 0,001$) e PBS/OVA com o grupo PBS/PBS (# $P < 0,001$) considerados significantes. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. O gráfico é representativo de dois experimentos, realizados de maneira independente.

4.7.3 Efeito profilático do GRRK na produção de TGF- β do LBA- Influência na resposta T_{Reg}

Quando se avaliou a produção da citocina TGF- β , produzida por LT_{Reg}, (Gráfico 17) os animais tratados com GRRK 30 mg/Kg ($63 \pm 7,1$) não apresentaram alteração significativa na produção desta citocina quando comparados ao grupo PBS/OVA (79 ± 17). No grupo de animais tratados com a DEXA ($17 \pm 5,1$; $P < 0,001$) observa-se redução da produção de TGF- β . Esses resultados mostram que embora o GRRK tenha a capacidade de regredir a inflamação alérgica, esse flavonóide não foi capaz de alterar a produção de TGF- β , uma importante citocina reguladora, produzida por células T_{Reg} nesse modelo estudado.

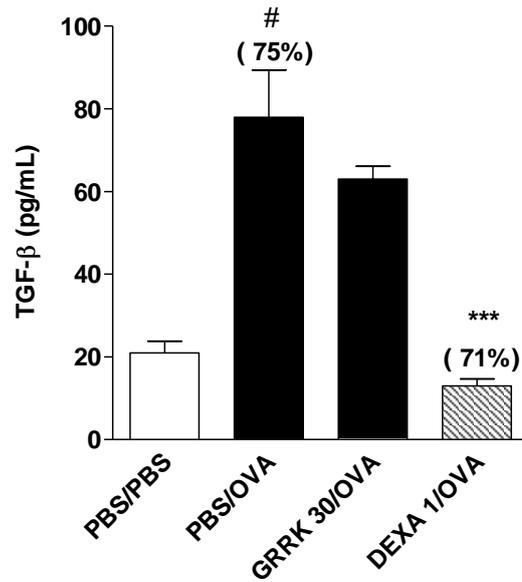


Gráfico 17. Efeito do tratamento profilático com GRRK sobre a produção de TGF-β de LBA em modelo de asma alérgica experimental. Sobrenadantes de amostras do LBA coletadas 24 h após o último desafio com OVA foram utilizadas para dosagem de TGF-β (B). Os resultados estatísticos representam a diferença dos grupos tratados com GRRK ou DEXA com o grupo PBS/OVA (***P* < 0,001) e PBS/OVA com o grupo PBS/PBS ([#]*P* < 0,001) considerados significantes. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. O gráfico é representativo de dois experimentos, realizados de maneira independente.

Discussão

5. Discussão

Em estudos anteriores realizados pelo grupo de imunofarmacologia do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica-LTF/UFPB/João Pessoa-PB, foi observado que extrato fenólico de pólen apícola (EFPA), rico em flavonóides apresentou atividade antiinflamatória em modelo de asma alérgica experimental induzida por ovalbumina (OVA) (MEDEIROS, et al., 2008). Na perspectiva em continuar esses estudos, e baseados em dados da literatura demonstrando o grande potencial imunomodulador dos flavonóides, esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antialérgica de três flavonóides (myricetina, isoramnetina e kanferol glicosilado-GRRK) isolados e caracterizados pelo grupo da química do LTF/UFPB/João Pessoa-PB e, em seguida, investigar o possível mecanismo de ação de um dos flavonóides previamente selecionado de acordo com o melhor rendimento e atividade antialérgica apresentada no modelo de asma alérgica experimental.

Antes de iniciar os testes imunofarmacológicos com os flavonóides isoramnetina, myricetina e GRRK, foram realizados ensaios de toxicidade utilizando a *Artemia salina* e a linhagem de fibroblastos L929. No ensaio de *Artemia* não houve morte dos microcústáceos (*Artemias*), mesmo nas altas concentrações dos três flavonóides testados, sugerindo ausência de toxicidade. Adicionalmente os flavonóides também apresentaram baixa toxicidade nas células L929, sugerindo segurança no uso dos flavonóides *in vivo* ou *in vitro*. Embora não tenha sido possível calcular a dose letal (DL₅₀) dos flavonóides Parra e colaboradores (2001) demonstraram haver certa correlação da concentração letal em 50% (CL₅₀) de *Artemia salina* e a DL₅₀ em camundongos de diferentes extratos de plantas.

A baixa toxicidade dos flavonóides nos impulsionou investigar o efeito do tratamento com estes flavonóides na migração de células inflamatórias para os pulmões e o grau de sobrevivência dos animais frente à reação de anafilaxia sistêmica ativa induzida por OVA, em modelo de asma alérgica experimental, caracterizado por um perfil de resposta imune do tipo Th2, clássico das alergias (revisado por MAYR, ZUBERI, LIU, 2003).

O choque anafilático, do ponto de vista imunológico é uma forma sistêmica extrema de hipersensibilidade tipo I, mediada pela liberação de histamina em resposta à ligação cruzada de IgE ao receptor de alta afinidade FcεRI presente na membrana dos mastócitos. Estas células quando ativadas causam desgranulação, com liberação de vários mediadores, dentre eles a histamina, prostaglandina e leucotrienos responsáveis por grande parte da sintomatologia da anafilaxia (NOURI-ARIA et al., 2004). Tem sido descrito que alimentos (crustáceos e amendoins), drogas (antimicrobianos e anestésicos) e venenos de insetos (abelha e formiga) causam anafilaxia fatal em indivíduos sensibilizados e, um número significativo de mortes em resposta a alérgenos tem aumentado nos últimos anos (SICHERER; LEUNG, 2004). A reação fatal atinge dois ou mais órgãos e apresenta como sintomas o aparecimento de urticária, vômito, dor abdominal, edema de laringe e/ou edema facial, além de broncoespasmo (revisado por MONERET-VAUTRIN et al., 2005). Alguns trabalhos demonstraram o efeito inibitório de flavonóides no desenvolvimento de reação anafilática induzida por alérgeno. Flavonóide do tipo quercetina mostrou-se prevenir 75% dos animais da reação de choque anafilático induzido por OVA (CRUZ et al., 2008); epigalocatequina foi capaz de inibir a anafilaxia cutânea passiva induzida pelo composto 48/80, por um mecanismo dependente do

aumento de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (LI et al., 2005). O tratamento com o extrato de *Selaginella tamariscina*, rico em flavonóides, inibiu de maneira dose-dependente à reação de choque anafilática (DAI et al., 2005). Esses dados corroboram com os encontrados neste trabalho que resultaram em um efeito protetor, dos flavonóides em estudo, na mortalidade do choque anafilático induzido por OVA.

O tratamento dos animais, sensibilizados e desafiados com ovalbumina (modelo de asma alérgica experimental) com isoramnetina, myricetina ou GRRK foi capaz de inibir a migração de células da inflamação para o pulmão. Além da inibição do choque anafilático, os flavonóides, em geral, têm-se mostrado como um importante antiinflamatório das vias aéreas (revisado por KAWAI et al., 2007). Flavonóides presentes no extrato de *Glycyrrhiza uralensis* foram capazes de inibir o influxo de células inflamatórias para as vias aéreas em modelo de inflamação aguda induzida por LPS (XIE et al., 2009). O flavonóide genisteína inibiu o influxo eosinofílico em cobaias sensibilizadas com ovalbumina (DUAN et al., 2003) e, em um estudo mais recente, foi observado que esse efeito inibitório foi parcialmente explicado pela diminuição da síntese de leucotrienos dependente da proteína p-38 (KALHAN et al., 2008). Os tratamentos com quercetina ou rutina em camundongos sensibilizados com OVA também foram capazes de inibir a migração de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos para o pulmão e a quantidade de peroxidase eosinofílica (EPO) e fosfolipase A2 (PLA2), consideradas importantes enzimas liberadas por essas células durante o processo inflamatório (JUNG et al., 2007). Esses dados da literatura corroboram com os dados encontrados com os flavonóides testados neste estudo, demonstrando, portanto, potente ação antiinflamatória destes flavonóides.

Considerando o efeito protetor dos três flavonóides na reação de choque anafilático, e na atividade antiinflamatória nas vias aéreas, fez-se a escolha de um deles, o GRRK, devido ao melhor rendimento de extração dentre os três flavonóides, no intuito de estudar de forma mais detalhada essa ação imunomoduladora.

Após a escolha do flavonóide GRRK para dar continuidade aos estudos, partiu-se para a avaliação da citocina TNF- α , considerada uma das mais importantes citocinas em iniciar um processo inflamatório. Para isso, utilizou-se um modelo de inflamação aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS), já que a meia vida desta citocina é curta (cerca de 180 min.). A identificação de compostos que interferem nesta citocina, bem como em sua via de sinalização vem sendo estudado como alvo terapêutico de doenças, tais como artrite reumatóide, asma e doenças auto-imunes relacionadas com processo inflamatório (revisado por NAN 2006). Alguns estudos da literatura demonstram a ação antinflamatória de produtos naturais mediante a inibição do TNF- α . O tratamento com o flavonóide quercetina, em basófilos humanos estimulados com éster de forbol (PMA), foi capaz de diminuir a produção de TNF- α , IL-1 e IL-6 por uma via dependente de NF κ -B (MIN et al., 2005). Sankaar e colaboradores (2007) demonstraram que os polifenóis derivados do chá verde foram capazes de inibir a ativação do TNF- α responsável pelo efeito anticancerígeno em camundongos. Neste estudo observa-se que o GRRK foi capaz de inibir o TNF- α , corroborando com os dados da literatura, confirmando o potencial antiinflamatório deste flavonóide

Em seguida partiu-se para a investigação do tratamento profilático e terapêutico do GRRK em modelo de asma alérgica experimental. O GRRK

mostrou-se eficiente em reduzir o fenótipo da asma alérgica experimental, tais como: infiltrado de células inflamatórias nas vias aéreas, hiperratividade brônquica (HRB) induzida por metacolina, produção de muco por células caliciformes, citocinas Th2 (IL-5 e IL-13), produção de imunoglobulina E (IgE) OVA-específica, marcadores de células efectoras, LT e LB (CD4 e B220, respectivamente) e expressão de marcadores de células apresentadoras de antígenos (CD40 e MHC-II), no entanto, esse efeito antiinflamatório não foi dependente de uma resposta Th1 ou de LT reguladores por não interferir na produção das citocinas IFN- γ e TGF- β e na expressão da molécula Foxp3⁺.

Um dos objetivos no tratamento da asma é diminuir a resposta inflamatória, diminuindo o influxo de células inflamatórias induzidas por alérgenos para as vias aéreas; inibir a produção de IgE alérgeno-específico e diminuir a produção de citocinas do perfil Th2, responsáveis em manter a resposta alérgica. Associada a essa ação antiinflamatória a terapia da asma necessita reverter a broncoconstrição, restabelecendo a função pulmonar prejudicada. Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas na tentativa de encontrar novos alvos terapêuticos para esta patologia (revisado por KAWAI et al., 2007).

Os glicocorticóides exercem um papel crucial no tratamento da asma, mas apesar do efeito antiinflamatório, os corticóides provocam vários efeitos colaterais, incluindo edema, osteoporose, diabetes, hipertensão e catarata (SAKLATVALA et al., 2002). A hipertrofia hepática e as mudanças metabólicas como o aumento da síntese de proteínas de fase aguda no plasma estão também associadas ao uso crônico dos glicocorticóides (PEDERSEN et al., 1989 e SAVARY et al., 1998). Muitas pesquisas têm evoluído na tentativa de

identificar novas moléculas que agem com a eficácia dos corticóides sem os efeitos colaterais (TEIXEIRA et al., 1995).

Vários flavonóides vêm sendo estudados por apresentar uma intensa atividade antialérgica e antiinflamatória. Os flavonóides quercetina e seu análogo isoquercetina inibiram o influxo de células inflamatórias para o pulmão, e para o sangue (ROGERIO et al., 2007), enquanto narirutin, além de promover esses efeitos, reduziu a produção de IgE de maneira dose-dependente em camundongos BALB/c (FUNAGUCHI et al., 2007). Nobiletin, um polimetoxiflavonóide, administrado por via intraperitoneal, inibiu a migração de eosinófilos para o pulmão e a produção de eotaxina por um mecanismo dependente de Fas (receptor de morte celular) em ratos sensibilizados com OVA (WU et al., 2005). Adicionalmente, o flavonóide luteonina mostrou-se capaz de aliviar a broncoconstricção e a hiperreatividade das vias aéreas em camundongos sensibilizados com OVA (DAS et al., 2003). Uma triagem farmacológica realizada com vários flavonóides demonstraram que essas substâncias diminuem o desenvolvimento da dermatite e dos níveis de imunoglobulina E (IgE) em modelo murino (KOTANI et al., 2000).

Estudos clínicos demonstram que o uso de extrato de folhas de *Selaginella tamariscina* na dose de 1g/dia, ricas nos flavonóides: astragalina (0,72%), isoquercetina (0,55%) e toriforin (0,32%), diminuiu o número de eosinófilos no sangue periférico (revisado por KAWAI et al., 2007) de indivíduos atópicos. Um estudo realizado por Knekt e colaboradores (2002) demonstrou que a alta ingestão de flavonóides, como a quercetina, kanferol, myricetina, nariregina e hespericina promoveu diminuição na incidência de doenças crônicas, tais como: asma, artrite, câncer, diabetes e doenças

cerebrovasculares, contudo o flavonóide que se mostrou mais eficiente em suprimir a asma foi a quercetina, presente em maçãs, enquanto que o kanferol mostrou-se mais eficiente em baixar o risco de doenças cerebrovasculares em humanos.

Kanferol é um flavonóide que apresenta atividade antiinflamatória em modelo experimental de aterosclerose, úlcera, edema de pata e em transplantes (GOEL et al, 1988; OKAMOTO et al., 2002; OKU e ISHIGURO, 2001; TU et al., 2007). Um recente trabalho publicado por Hirose e colaboradores (2009) demonstrou que o tratamento *in vitro* com Kanferol promoveu uma diminuição na degranulação de células leucêmicas basofílicas de ratos, comprovando uma intensa atividade antialérgica via ativação da heme-oxigenase. Entretanto, nenhum estudo foi realizado em modelo experimental de asma alérgica com esse flavonóide.

Análises de estrutura-atividade têm mostrado que a hidroxilação e a glicosilação na estrutura química de flavonóides parecem ser pré-requisitos para potencializar a atividade antiinflamatória (COMALADA et al., 2006). Desta forma, analisou-se em camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com OVA, o tratamento com o GRRK isolado de *Solanun asperum* utilizando dois protocolos, o profilático e o terapêutico e observou-se que o tratamento com ambos os protocolos foi capaz de atenuar os sinais clássicos da asma alérgica experimental, corroborando com os dados da literatura no que diz respeito ao potencial antiinflamatório dos flavonóides, em especial, os glicosilados.

A presença de eosinófilos nas vias aéreas é responsável por danos epiteliais e estas células estão estritamente relacionadas à fisiopatologia da asma. Os eosinófilos e seus produtos secretados são fatores importantes no

desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas e severidade da asma (revisado por LAMPINEM et. al., 2004).

Eosinófilos jovens e maduros são recrutados para os pulmões após o desafio antigênico com OVA em modelo de asma experimental (RADINGER et al., 2004). Essas células são encontradas em maior concentração no LBA, pulmão e nodos linfáticos diferindo o fenótipo eosinofílico de acordo com a localização (DUEZ et al., 2004). Os eosinófilos produzem mediadores vasoativos (cis-leucotrienos-LTC₄ e fator ativador de plaquetas –PAF) (TRIGGIANE et al., 2000), citocinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, RANTES, eotaxinas, TGF- α , TGF- β , TNF- α) e proteínas presentes em seus grânulos (proteína catiônica eosinofílica-ECP, proteína básica principal-MBP, neurotoxina derivada de eosinófilo-EDN e peroxidase eosinofílica-EPO) que orquestram o processo inflamatório nas vias aéreas (revisado por LAMPINEN et al., 2004).

O GRRK foi capaz de inibir o influxo dessas células no estabelecimento da asma experimental, sugerindo que este flavonóide esteja atuando em moléculas responsáveis pela migração dessas células para as vias aéreas.

Em seguida foi avaliado o efeito do GRRK sobre a função pulmonar no modelo em estudo. A hiperreatividade é definida como a exacerbação de resposta frente a algum estímulo (alérgeno), comum na patogênese da asma (HARGREAVE et al., 1986). O acúmulo de células inflamatórias, o exsudato, o aumento da musculatura lisa pulmonar, a deposição do tecido conectivo e a hiperplasia epitelial contribuem para o estreitamento da luz das vias aéreas, que parece ser à base da diminuição do fluxo de ar, característico da broncoconstrição em asmáticos (CROCKFORD e DAVIS, 2006). O epitélio respiratório tem sido reconhecido por ser a primeira barreira de proteção contra

estímulos irritantes. A perda morfofuncional desta barreira pode ser o papel chave da hiperreatividade, por permitir um acesso amplo a estímulos broncoconstrictores da árvore brônquica (CROCKFORD e DAVIS, 2006).

Alguns flavonóides têm demonstrado aliviar a broncoconstrição e a hiperreatividade brônquica em camundongos sensibilizados com OVA (das et al., 2003; SECOR JR. et al., 2005, KIM et al., 2006, PARK et al., 2007) . Apesar do mecanismo responsável pelo desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas ainda parecer bastante controverso, onde alguns trabalhos demonstraram que, com o infiltrado inflamatório observa-se hiperreatividade brônquica frente ao alérgeno ((NAKAJIMA et al., 1992; KIPS et al., 1995; FOSTER et al., 1996; HAMELMANN et al.,1997; MATTES et al., 2002). Outros trabalhos contradizem, demonstrando que a inflamação alérgica e a hiperreatividade brônquica são eventos e fenômenos independentes (WILDER et al., 1999; LECKIE et al., 2000, MOULD et al., 2000). Os resultados obtidos no tratamento com o GRRK demonstraram inibição na migração de células inflamatórias e diminuição da hiperreatividade, corroborando com os estudos que demonstram esta correlação.

Na expectativa de explicar o efeito antiinflamatório do GRRK nas vias aéreas de animais sensibilizados com OVA, investigou-se o efeito do referido flavonóide na produção de IL-5 no LBA. A IL-5 é considerada uma das mais importantes citocinas na maturação, crescimento e recrutamento de eosinófilos para os pulmões (SHI et al., 1997). WANG et al., (1998) e FOSTER et al., (1996) demonstraram que camundongos que não expressavam genes para IL-5 falharam em desenvolver eosinofilia em resposta a um alérgeno. Além disso, o tratamento de camundongos selvagens que foram tratados com anticorpos anti-

IL-5 apresentaram redução no recrutamento de eosinófilos para os pulmões (KUNG et al.,1994). Esses resultados sugerem que o efeito inibitório do tratamento de GRRK na produção de IL-5 seja responsável pela diminuição da migração de eosinófilos, uma vez que esta citocina está diretamente relacionada com a ativação e recrutamento destas células.

Estudos mostram que além da IL-5, a IL-13 também está diretamente envolvida na asma, sendo responsável principalmente na hipersecreção de muco por células caliciformes e formação de fibrose subepitelial em pulmões (KELLER et al., 2006, COHN et al 1998). A IL-13 exerce várias atividades imunomoduladoras via transdução de sinal com ativação de Janus cinase (JAK-STAT) presente em diferentes células do sistema imune, tais como: células dendríticas, linfócito B, monócitos, macrófago, eosinófilos, fibroblastos e células epiteliais, resultando na produção de vários mediadores que exacerbam os sinais clínicos da asma (CORRY e KHERADMAND, 2002, IZUHARA e ARIMA, 2004; WILLS-KARP, 2004).

Blanchard e colaboradores (2005) demonstraram que camundongos submetidos à administração intratraqueal com IL-13 apresentavam quadros de eosinofilia e hiperrreatividade brônquica. Desta forma, o desenvolvimento de moléculas inibidoras da atividade biológica da IL-13 pode ser importante no tratamento da asma. Adicionalmente, em estudos clínicos, pacientes asmático apresentaram super expressão da produção de IL-13 (KOTSIMBOS et al., 1996; BODEY et al., 1999). No presente estudo, o tratamento profilático ou terapêutico com o GRRK atenuou a produção de IL-13 do LBA de animais submetidos ao modelo de asma alérgica experimental, sugerindo que o GRRK esteja

interferindo de alguma forma na via de sinalização da síntese desta citocina, refletida através da diminuição da produção de muco e da hiperreatividade.

Tendo em vista a diminuição na produção de citocinas do perfil Th2, avaliou-se a produção de um importante anticorpo presente em todo processo alérgico, a Imunoglobulina E (IgE), que neste modelo foi a IgE OVA-específica. O GRRK também foi capaz de modular negativamente a produção dessa imunoglobulina, sugerindo que o GRRK esteja atuando na resposta imune humoral, sobre os linfócitos B (LB) alérgeno(OVA)-específico. Na tentativa de explicar tal interferência, investigou-se a ação do GRRK no número de linfócitos B do LBA pela técnica de citometria de fluxo (FACS), utilizando o anticorpo anti-B220, específico para LB. O tratamento com o GRRK diminuiu o número de LB, sugerindo que este flavonóide esteja agindo de alguma forma sobre a migração ou desativação dos LB ou ainda sobre a síntese de citocinas responsáveis pela manutenção destas células nas vias aéreas. Os resultados do presente trabalho corroboram com outros estudos realizados com flavonóides mostrando a diminuição na produção dessa imunoglobulina, IgE, em modelo de asma experimental (DAS et al., 2003; FUNAGUCHI et al., 2007).

Em uma segunda fase do estudo, caracterizou-se fenotipicamente as células do LBA de animais tratados de forma profilática com GRRK.

Como toda resposta imune adaptativa, a presença dos linfócitos é uma condição *sinequanun* para o desenvolvimento da defesa do organismo (BENTLEY et al., 1993). Na asma, os linfócitos T são encontrados como as principais células efetoras responsáveis por montar o quadro clássico desta patologia, produzindo citocinas e enzimas, promovendo ativação e proliferação de outras células inflamatórias, resultando no estabelecimento dos sintomas

clássico da asma (FOSTER et al., 2002). Haselden e colaboradores (1999) mostraram que após a administração de peptídeos alergênicos em animais experimentais houve aumento do número de LTCD4⁺ nas vias aéreas, desencadeando uma resposta asmática tardia. Em adição, camundongos deficientes de LTCD4⁺ (BRUSSELLE ET AL., 1994) ou animais depletados de LTCD4⁺ (MOULD et al., 2000) falharam em desenvolver inflamação eosinofílica ou HRB após a exposição a um alérgeno. Estudos clínicos mostraram que pacientes tratados com anticorpos monoclonais contra o LTCD4⁺ tem melhorado o pico expiratório forçado (PEF), parâmetro obtido pelo teste de espirometria no diagnóstico da asma (KON et al., 1998). Produtos naturais como a bromelaína, substância isolada do abacaxi, e o extrato de *Actinidia polygama* mostram ser eficientes em diminuir a expressão de moléculas CD4⁺ e o número de LTCD4⁺ em modelo de asma alérgica experimental (SECOR Jr. et al., 2005; LEE et al., 2006). No presente trabalho, GRRK foi capaz de inibir o número de LTCD4⁺ do LBA, sugerindo que GRRK esteja atuando em diminuir o influxo dessa célula no pulmão ou ainda levando a apoptose dos LTCD4⁺ (hipótese a ser testada).

Dando continuidade à caracterização fenotípica das células do LBA de animais tratadas com GRRK, partiu-se para a investigação das células apresentadoras de antígenos (APCs), responsáveis por processar e apresentar o alérgeno aos LTCD4⁺ e iniciar o mecanismo imunológico da asma. Para tal, analisou-se a expressão de molécula de classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC-II) e de duas moléculas co-estimuladoras CD40 e CD80 que atuam concomitantemente na ativação e apresentação antigênica nas APCs.

Um estudo recente publicado por Rezai-Zadeh e colaboradores (2008) mostrou que dois flavonóides, luteonina e apigenina foram eficientes em modular a ativação, induzida por $\text{INF-}\gamma$, de micróglia (macrófago do SNC) por inibir a expressão da molécula CD40 resultando em inibição da produção de IL-6 e $\text{TNF-}\alpha$, citocinas pró-inflamatórias. Esses pesquisadores sugeriram que os dois flavonóides estudados foram efetivos no tratamento de doenças neurodegenerativas. Adicionalmente, outro estudo realizado com a substância natural derivado do chá verde, o epigalactocatequina foi capaz de modular negativamente o fenótipo de células dendríticas derivadas de monócitos humanos (MODCs) estimuladas com IL-4 e fator estimulador de colônia monocítica-granulocítica (MG-CSF), pela diminuição na expressão de MHC-II e CD80 (YONEYAMA, 2008). No presente estudo, GRRK foi capaz de inibir a expressão de dois desses marcadores, as moléculas de classe II do MHC e o CD40, sem alterar o número das células $\text{CD11b}^+\text{CD11c}^+$ (APCs), sugerindo que o GRRK esteja suprimindo a ativação das APCs.

Após a avaliação do efeito do GRRK nas células envolvidas na asma alérgica experimental, investigou-se a participação de outras populações celulares, tais como Th1 e T regulador (LT_{Reg}) capazes de modular negativamente a resposta Th2.

A resposta imune Th1 é caracterizada pelo aumento na produção de $\text{INF-}\gamma$. A expansão dessa população celular ocorre mediante a ativação de STAT-1 sinalizado por $\text{INF-}\gamma$, que por sua vez induz à expressão de genes do receptor de IL-2, que via STAT-4 amplia a produção de $\text{INF-}\gamma$, estabilizando o padrão de citocinas Th1 (BELKAID et al., 2005). As respostas imunes regulam-se, ou seja, quando existe expansão da resposta do perfil Th2 a resposta de perfil Th1

encontra-se suprimida e vice-versa, de modo a manter um balanço Th1/ Th2, esse aumento de um tipo de resposta em detrimento da outra é conhecido como polarização de resposta imune, ou desvio da resposta imune (WESTERMANN et al., 1999).

Nesse contexto, alguns trabalhos mostraram a ação de flavonóides em favorecer uma das respostas Th1 ou Th2. Das e colaboradores (2003) e Park e colaboradores (2008) demonstraram que o tratamento com luteolina ou quercetina, em modelo experimental de asma, diminuíram os parâmetros inflamatórios observados por um mecanismo dependente de Th1, com aumento na produção de IFN- γ . Adicionalmente, outro estudo com o flavonóide genisteína, demonstrou que o aumento na produção de IL-4 foi responsável em diminuir efeitos inflamatórios induzidos por Th1 na artrite reumatóide induzida por colágeno (WANG ET AL., 2008). Contudo, o tratamento do GRRK não foi capaz de aumentar a produção de IFN- γ de cultura de linfonodo mediastinal, região mais próxima do pulmão, sugerindo que GRRK esteja agindo no processo da asma alérgica por uma via independente de Th1.

Em seguida analisou-se a participação dos linfócitos T_{Reg} (LTCD4⁺ Foxp3⁺), na tentativa de explicar o mecanismo responsável por suprimir a resposta Th2, via produção da citocina reguladora TGF- β , produzida principalmente por esse subtipo de linfócito T_{Reg}. Surpreendentemente, não foi observada diferença significativa entre os animais tratados ou não com o GRRK tanto na produção de TGF- β como no número de LTCD4⁺ Foxp3⁺.

Os LT_{Reg} estão presentes em diferentes tipos de respostas imunes na tentativa de controlar vários processos imunológicos. Lewkowich e colaboradores (2005) demonstraram que a depleção de LT_{Reg} naturais, antes da

fase indutora da resposta imune, contribuiu para o aumento das respostas alérgicas induzidas pela imunização com extrato de ácaros em animais resistentes, demonstrando que mecanismos de ativação das células T são bloqueados pela supressão via LT_{Reg} .

Ansorge e colaboradores (2003) demonstraram que própolis, e dois tipos de flavonóides (quercetina e hesperidina) foram capazes de inibir a produção de citocinas do perfil Th2 (IL-4), Th1 (IL-2) e aumentar a produção de TGF- β sintetizadas por LT_{Reg} em células mononucleares do sangue periférico de humanos (PBMC), ativadas por mitógeno. Essa pesquisa demonstrou a ação reguladora destes componentes naturais. Em contraste, outro estudo realizado por Guo e colaboradores (2007) demonstrou que quercetina administrada oralmente em camundongos com tumores pré-estabelecidos foi capaz de aumentar o número de LT citotóxicos e inibir $LTCD4^+CD25^+Foxp3^+$ demonstrando um efeito antitumoral desse componente via Th1. Tendo em vista o número reduzido de estudos com flavonóides em modelos de alergia direcionados para a investigação dos LT reguladores, torna-se inconclusiva o verdadeiro papel desse componente natural em LT_{Reg} nos modelos de inflamação alérgica.

Nesse contexto, apesar do GRRK não aumentar o número de LT_{Reg} ou a produção de TGF- β , sugere-se que este fenômeno poderia trazer benefícios em relação ao tratamento com esse flavonóide, uma vez que a ação do flavonóide mantém constante o número de LT_{Reg} nas vias aéreas, importante via na manutenção da homeostasia.

Tem sido descrito que flavonóides são capazes de modular mediadores inflamatórios e induzir a produção de mensageiros secundários responsáveis

pela produção de moléculas pró-inflamatórias (Calixto et al., 2000; Calixto et al., 2003). Um estudo realizado por Cortes e colaboradores (2007) demonstraram que células de linhagens não hematopoiéticas de camundongos (esplenócitos, HL-60, U937, M12 e A1.1) tratadas *in vitro* com kanferol apresentaram inibição da ativação da molécula STAT-6 ativada por IL-4. A STAT 6 está envolvida na via de sinalização Janus-cinase específica do tipo 3 (JAK-3). Em associação com outros estudos de análise comparativa estrutural, tem-se confirmado a semelhança química no tamanho e na estrutura planar de inibidores de JAK-3 com o kanferol (SUDBECK et al., 1999). Portanto, sugere-se uma possível ação do GRRK relacionado com a via JAK-3.

A existência de vários grupos glicosídeos presentes na molécula do GRRK que, portanto, difere do kanferol, podem estar associadas na seletividade de ação do GRRK. Apesar dos mecanismos de transdução de sinal não terem sido realizados, foi possível demonstrar que o GRRK atua modulando a expressão de moléculas de membrana celular tais como: CD4⁺, B220⁺, CD40 e MHC de classe II (Figura 13), sendo assim um flavonóide bastante promissor como ferramenta imunofarmacológica, podendo ser considerado um futuro tratamento clínico na asma alérgica.

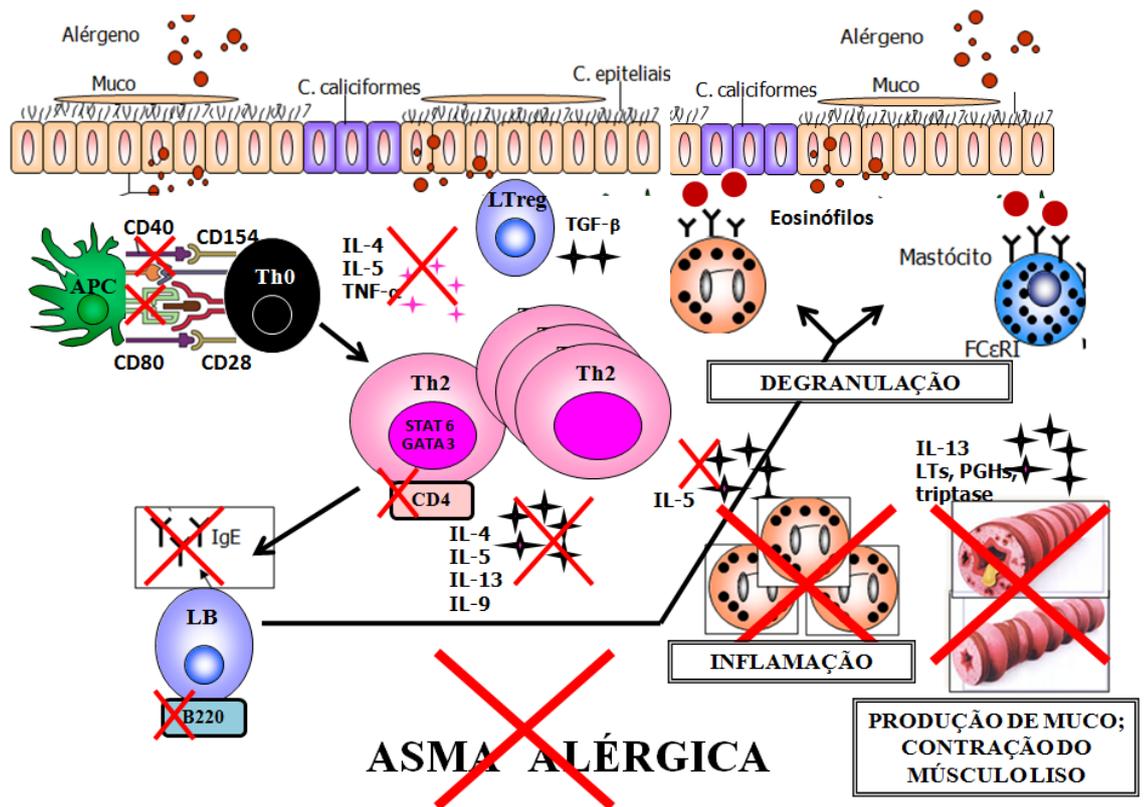


Figura 13. Possível local (X) de ação do GRRK na asma alérgica experimental.

Conclusão

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que:

➤ O tratamento com o flavonóide isoramnetina, myricetina ou kanferol glicosilado (GRRK) foi capaz de inibir o número de células totais no LBA e de aumentar o grau de sobrevivência de camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com ovalbumina no modelo de anafilaxia sistêmica;

➤ O tratamento profilático ou terapêutico com o GRRK foi capaz de inibir os principais parâmetros da asma alérgica experimental: infiltrado de células inflamatórias para o pulmão, produção de muco e hiperreatividade brônquica;

➤ Os mediadores imunológicos clássicos da asma, IL-5, IL-13 e IgE OVA-específica foram inibidos nos tratamentos com GRRK, sugerindo interferência desse flavonóide na resposta imune humoral;

➤ As células efectoras, LTCD4⁺ e LB, e as células apresentadoras de antígeno (APCs), presentes no pulmão foram notavelmente moduladas negativamente através da diminuição da expressão dos marcadores celulares: CD4, B220, MHC-II e CD40 após o tratamento com o GRRK, sugerindo que este flavonóide esteja atuando em um momento inicial da resposta imune responsável pelo efeito antiinflamatório;

➤ O tratamento com GRRK não interferiu na produção das citocinas IFN- γ e TGF- β , tampouco na expressão da molécula Foxp3, logo sugerimos que o referido flavonóide não atue na resposta Th1 ou Treg.;

➤ Devido à diversidade de componentes da resposta imune em que o GRRK mostrou-se efetivo, não foi possível demonstrar diretamente por qual(s) via(s) de sinalização o GRRK esteja atuando;

➤ Esses resultados demonstram efetivamente que o GRRK possui ação imunomoduladora, antiinflamatória e antialérgica úteis no tratamento da asma experimental.

Referências

REFERÊNCIAS

AGRA, M.F. A new species of *Solanum* subgenus *Leptostemonum* (Solanaceae) from Chapada da Diamantina, Bahia, Brazil. **Novon**, v.9, p.292-295, 1999a.

AGRA, M.F. Diversity and distribution of *Solanum* subgenus *Leptostemonum* in north-east Brazil. In: NEE, M.S., D.E.; LESRER, R.N.; JESSOP, J.P. *Solanaceae IV*. **Royal Bot Gard Kew**, p.197-203, 1999b.

AGRA, M.F. Estudo Taxonômico do Gênero *Solanum* (Solanaceae) no município de João Pessoa, Paraíba-Brasil.. 243. **Dissertação (Mestrado em Botânica)** - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 1991

AGRA, M.F.; BHATTACHARYYA, J. Ethnomedicinal and phytochemical investigation of the *Solanum* species in the Northeast of Brazil. **Roy Bot Gard**, p. 341-343, 1999b

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, p. 75-81, 2002.

AKDIS, M.B. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. **Curr Opin Immunol.**, v.18, p.738–744, 2006.

ANDERSON, J.E.; GOETZ, C.M.; MCLAUGHLIN, J.L.; SUFFNESS, M. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochem Anal**, v.2, p.107-111, 1991.

ANSORGE, S.; REINHOLD.; D.; LENDECKEL, U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells. **Z Naturforsch**, v.58, p.580-9, 2003.

BALBO, P.; SILVESTRI, M.; ROSSI, G.A.; CRIMI, E.; BURASTERO, S.E. Differential role of CD80 and CD86 on alveolar macrophages in the presentation of allergen to T lymphocytes in asthma. **Clin Exp Allergy**, v.31, p.625-36, 2001.

BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; OLIVEIRA, R.A.; PAULO, M.Q.; TROLIN, G.; CUNHA, E.V.; ATAIDE, J.R.; BHATTACHARYYA, J. Chemical and pharmacological investigation of *Solanum* species of Brazil--a search for solasodine and other potentially useful therapeutic agents. **J.Mem Inst Oswaldo Cruz Review**, v.86, p.189-91,1991.

BARNES, P.J.; RODGE, I. W; THOMPSON, N. C. Pathogenesis of asthma. In: *Asthma basic mechanism and clinical management*. **J Bras Psiq**, v. 46, p. 77-81, 1997.

BENTLEY, A.M.; MENG, Q.; ROBINSON, D.S.; HAMID, Q.; KAY, A.B.; DURHAM, S.R. Increases in activated T lymphocytes, eosinophils and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 8, p.35–42, 1993.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T.B.; OUKKA, M.; WEINER, H.L.; KUCHROO, V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v.44, p.235-238, 2006.

BLANCHARD, C.; MISHRA, A.; SAITO-AKEI, H.; MONK, P.; ANDERSON, I.; ROTHENBERG, M.E. Inhibition of human interleukin-13-induced respiratory and oesophageal inflammation by anti-human-interleukin- 13 antibody (CAT-354). **Clin Exp Allergy** v.35, p.1083-1093, 2005.

BLASA, M.; CANDIRACCI, M.; ACCORSI, A.; PIACENTININ, M. P.; ALBERTINI, M. C.; PIATTI, E. Raw Mielefiori honey is packed full of antioxidants. **Food chemistry**, v. 97, p.217-222, 2006.

BLUMENTHAL, M.N.; TOMITA, K.; OATES, T.; JAZRAWI, E.; CHUNG, K. F.; Collaborative studies on the genetics of asthma--National Heart, Lung and Blood Institute. **Clin Exp Allergy**, v.25, p. 29-32, 1995.

BODEY, K.J.; SEMPER, A.E.; REDINGTON, A.E.; MADDEN, J.; TERAN, L.M.; HOLGATE, S.T.; FREW, A.J. Cytokine profiles of BAL T cells and T-cell clones obtained from human asthmatic airways after local allergen challenge. **Allergy**, v. 54, p.113-120, 1999.

BRUSSELLE, G.G.; KIPS, J.C.; TAVERNIER, J.H.; HEYDEN, V.J.; CUVELIER, C.A.; PAUWELS, R.A.; BLUETHMANN, H. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. **Clin Exp Allergy**, v.24, p.73–80, 1994.

CALIXTO, J.B., BEIRITH, A., FERREIRA, J., SANTOS, A.R., FILHO, V.C. AND YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother Res**, v.14, p.401-418, 2000

CALIXTO, M.C.; TRICHES, K.M. AND CALIXTO, J.B. Analysis of the inflammatory response in the rat paw caused by the venom of Apis melifera bee. **Inflamm Res**, v.52, p.132-139, 2003.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J Ethnopharmac**, v.100, p. 131–134, 2005.

CAMPBELL, H.D.; BAILÓN, E.; SIERRA, S.; GALVEZ, J. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.84, p. 6629-33,1987.

CAMPOS, M. G. Caracterização do pólen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas atividades biológicas. **(Tese de Doutorado)** - Faculdade de Farmácia, Coimbra, Portugal, 1997.

CAMPOS, M.G.; WEBBY, R.F.; MARKHAM, K.R.; MITCHELL, K.A.; DA CUNHA, A.P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **J Agric Food Chem**, v. 51, p. 742-745, 2003.

CARAMORI, G.; LIM, S.; ITO, K.; TOMITA, K.; OATES, T.; JAZRAWI, E.; CHUNG, K. F.; BARNES, P.J.; ADCOCK, I. M. Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies. **Eur Respir J**, v. 18, p. 466-473, 2001.

CHANG, C.P.; HUANG, W.T.; CHENG, B.C.; HSU, C.C.; LIN, M.T. The flavonoid baicalin protects against cerebrovascular dysfunction and brain inflammation in experimental heatstroke. **Neuropharmacology**, v.5, p.1024-33, 2007

CHANG, C.Y.; HUANG, L.J.; WANG, J.P.; TENG, C.M.; CHEN, S.C.; KUO, S.C. Synthesis and anti-platelet, anti-inflammatory and anti-allergic activities of methoxyisoflavanquinone and related compounds. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 48, p. 964-973, 2000.

CHATKIN, J.M.; BARRETO, S.M.; FONSECA, N.A.; GUTIERREZ, C.A.; SEARS, M.R. Trends in asthma mortality in young people in southern Brazil. **Ann Allerg Asthma Immunol**, v. 82, p. 287-292, 1999.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K.J.; LI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G.; WAHL, S.M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. **J Exp Med**, v.198, p.1875-1886, 2003.

COHN, L.; TEPPER, J.S.; BOTTOMLY, K. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. **J Immunol**, v.61, p. 3813-6, 1998.

COLLISON, L.W.; TOMITA, K.; OATES, T.; JAZRAWI, E.; CHUNG, K. F.; BARNES, P.J.; ADCOCK, I. M. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. **Nature**, v.450, p. 566-9, 2007

COMALADA, M.; BALLESTER, I.; BAILÓN, E.; SIERRA, S.; XAUSJ, J.; GALVEZ, J.; MEDINA, F.S.; ZARZUELO, A. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. **Biochem Pharmacol**, v.16, p.1010-21, 2006.

CONNOR, T.J.; KELLY, J.P.; LEONARD, B.E. An assessment of the acute effects of the serotonin releasers methylenedioxymethamphetamine, methylenedioxyamphetamine and fenfluramine on immunity in rats. **Immunopharmacology**, v. 46, p. 223-235, 2000.

CONSENTINO, F.; VOLPE, M. Antihypertensive effect and end-organ protection of flavonoids: some insights, more questions. **J Hypertension**, v. 20, p. 1721-1724, 2002.

CORRIGAN, C.J.; KAY, A.B. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Immunol Today**, v.13, p.501-7, 1992.

CORRY, D.B.; DAKHAMA, A.; TOMKINSON, A.; MARQUILLIES, P. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. **J Exp Med**, v.183, p. 109-17, 1996.

CORRY, D.B.; KHERADMAND, F. Biology and therapeutic potential of the interleukin-4/interleukin-13 signaling pathway in asthma. **Am J Respir Med**, v.1, p. 185–193, 2002.

CORTES, J.R.; PEREZ, G.M.; RIVAS, M.D.; ZAMORANO, J. Kaempferol inhibits IL-4-induced STAT6 activation by specifically targeting JAK3. **J Immunol**, v.179, p.3881-3887, 2007.

COYLE, A.J.; LEHAR, S.; LLOYD, C.; TIAN, J.; DELANEY, T.; MANNING, S. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. **Immunity**, v.13, p.95-105, 2000.

CRUZ, E.A.; DA-SILVA, S.A.; MUZITANO, M.F.; SILVA, P.M.; COSTA, S.S.; ROSSI-BERGMANN, B. Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. **Int Immunopharmac**, v.10, p.1616-21, 2008.

D'ARCY, W.G.; HAWKES, L.; NEE, E. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: Solanaceae III: taxonomy, chemistry evolution. ed. London: Royal Botanic Gardens Kew and Linnean Society of London, v. 6, p. 75-137, 1991.

DAI, Y.; BUT, P.P.; CHU, L.M.; CHAN, Y.P. Inhibitory effects of *Selaginella tamariscina* on immediate allergic reactions. **Am J Chin Med**, v.33, p. 957-66, 2005.

DAS, M.; RAM, A.; GHOSH, B. Luteolin alleviates bronchoconstriction and airway hyperreactivity in ovalbumin sensitized mice. **Inflamm Res**, v.52, p.101-106, 2003

DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. **J sci food and agric**, v. 80, p. 1744-1756, 2000.

DOMINIQUE, M.A.; BULLENS, E.L.S.; TRUYEN, L.; COTEUR, E.; DILISSE, PETER, W.; HELLINGS, LIEVEN, J. DUPONT, A.; JAN, L.; CEUPPENS, L. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx?. **Respir Res**, v.4, p.1465-9921, 2006

DUAN, W.; KUO, I.C.; SELVARAJAN, S.; CHUA, K.Y.; BAY, B.H.; WONG, W.S.; Antiinflammatory effects of genistein, a tyrosine kinase inhibitor, on a guinea pig model of asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v.167, p.185-192, 2003.

DUDOV, I.A.; MORENETS, A.A.; ARTIUKH, V.P.; STARODUB, N.F. Immunomodulatory effect of honeybee flower pollen load. **Ukr Biokhim Zh**, v. 66, p. 91-93, 1994.

DUEZ, C.; DAKHAMA, A.; TOMKINSON, A.; MARQUILLIES, P.; BALHORN, A.; TONNEL, A.B.; BRATTON, D.L.; GELFAND, E.W. Migration and accumulation of eosinophils toward regional lymph nodes after airway allergen challenge. **J Allergy Clin Immunol**, v. 114, p. 820-825, 2004.

EATON-EAVANS, J. Osteoporosis and the role of diet. **Br J Biomed Sci**, v. 51, p.358-370, 1994.

ERIC, R.; SECOR, J.R.; WILLIAM, F.; CARSON, I.V. A.; MICHELLE, M.; CLOUTIER, B.C.; LINDA, A.; GUERNSEY, A.; CRAIG, M.; SCHRAMM, B.; CAROL, A.; WU, A., ROGER, S. Thrall a. Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovalbumin induced murine model of allergic airway disease. **Cell Immunology**, v.237, p.68-75, 2005.

FINOTTO S. T-cell regulation in asthmatic diseases. **Chem Immunol Allergy**, v.94, p.83-92, 2008.

FINOTO., S.; NEURATH, M. F.; GLICKMAN, J.N.; QIN, S.; LEHR, H. A.; GREEN, F. H.; ACKERMAN, K. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. **Science**, v. 11, p. 336-338, 2002.

FIREMAN, P. Understanding asthma pathophysiology. **Allergy Asthma Proc**, v.24, p. 79-83, 2003

FLICK, D.A.; GIFFORD, G.E. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. **J Immunol Methods**, v.30, p.167-75, 1984

FOSTER, P.S.; HOGAN, S.P.; RAMSAY, A.J.; MATTHAEI, K.I.; YOUNG, I.G. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. **J Exp Med**, v.183, p.195-201, 1996

FOSTER, P.S.; MARTINEZ-MOCZYGEMBA, M.; HUSTON, D.P.; CORRY, D.B. Interleukins-4, -5, and -13: emerging therapeutic targets in allergic disease. **Pharmacol Ther**, v. 94, p. 253-264, 2002.

FUNAGUCHI, N.; OHNO, Y.; LA, B.L.; ASAI, T.; YUHGETSU, H.; SAWADA, M.; TAKEMURA, G.; MINATOGUCHI, S.; FUJIWARA, T.; FUJIWARA, H. Narirutin inhibits airway inflammation in an allergic mouse model. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.34, p. 766-770, 2007.

GAVETT, S.H.; SCHNARR, B.; KLEIN, C.E.; BROCKER, E.B.; MOHRS, M.; BROMBACHER, F. Depletion of murine CD4⁺ T lymphocytes prevents antigen-

induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.10, p. 587-93, 1994.

GILANI, A. H.; RAHMANB, A. Trends in ethnopharmacology. **J. Ethnopharmac**, v. 100, p. 43–49, 2005.

GOEL, R.K; PANDEY, V.B.; DWIVEDI, S.P.; RAO, Y.V. Antiinflammatory and antiulcer effects of kaempferol, a flavone, isolated from *Rhamnus procumbens*. **Indian J Exp Biol**, v. 26, p.121-4,1988.

GONZALEZ, G.; HINOJO, M.J.; MATEO, R.; MEDINA, A.; JIMENEZ, M. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. **Int J Food Microbiol**, v. 105, p. 1-9, 2005.

GONZALO, J.A.; TIAN, J.; DELANEY, T.; CORCORAN, J., ROTTMAN, J.B. ICOS is critical for T helper cell–mediated lung mucosal inflammatory responses. **Nat Immunol**, v.2, p.597-604, 2001.

GRUNEWALD, S.M.; WERTHMANN, A.; SCHNARR, B.; KLEIN, C.E.; BROCKER, E.B.; MOHRS, M.; BROMBACHER, F.; SEBALD, W.; DUSCHL, A. An antagonistic IL-4 mutant prevents type I allergy in the mouse: inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system completely abrogates humoral immune response to allergen and development of allergic symptoms in vivo. **J Immunol**, v. 160, p. 4004-4009, 1998.

GULLO, V. P.; HUGHES, D. E. Exploiting new approaches for natural product drug discovery in the biotechnology industry. **DDT: Technol**, v. 2, p. 281-286, 2005.

GUO, T.L.; CHI, R.P.; HERNANDEZ, D.M.; AUTTACHOAT, W.; ZHENG, J.F. Decreased 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis coincides with the induction of antitumor immunities in adult female B6C3F1 mice pretreated with genistein. **Carcinogenesis**, v.28, p.2560-6, 2007.

HÄMÄLÄINEN, M.; NIEMINEN, R.; VUORELA, P.; HEINONEN, M.; MOILANEN, E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. **Mediators Inflamm**, v.3, p. 45673-80, 2007.

HAMELMANN, E.; SCHWARZE, J.; TAKEDA, K.; OSHIBA, A.; LARSEN, G.L.; IRVIN, C.G.; GELFAND, E.W. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. **Am J Respir Crit Care Med**, v.156, p. 766-775, 1997.

HANSSEN, M. The Healing power of pollen and other products from the beehive, propolis, royal jelly, honey. **Thor pub Wellin**, v. 6, p. 65-71, 1979.

HARBORNE, J.; GRAYER, R, J. Flavonoids and insects. In: ed. Lit. J.B. Harborne The Flavonoides : Advances in research since 1986. **Thor pub Wellin**, p. 589-618, 1993.

HARBORNE, J.B. Flavonoids and Evolution of Angiosperms. **Bioch. Syst. and Ecol.**, v.5, p.7-22, 1977.

HARGREAVE, F.E.; DOLOVICH, J.; O'BYRNE, P.M; RAMSDALE, E.H.; DANIEL, E.E. The origin of airway hyperresponsiveness. **J Allergy Clin Immunol**, v.78, p.825-32, 1986

HARRINGTON, L.E.; MANGAN, P.R.; WEAVER, C.T. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. **Int Arch Allergy Immunol**, v.18, p.349-56, 2006.

HASELDEN, B.M.; KAY, A.B.; LARCHE, M. Immunoglobulin E-independent major histocompatibility complex-restricted T cell peptide epitope-induced late asthmatic reactions. **J Exp Med**, v.189, p.1885–1894, 1999

HENDRIKS, J.J.; ALBLAS, J.; VAN DER POL, S.M.; VAN TOL, E.A.; DIJKSTRA, C.D.; DE VRIES, H.E. Flavonoids influence monocytic GTPase activity and are protective in experimental allergic encephalitis. **J Exp Med**, v. 20; p. 1667-72, 2004

HERBERT, J.; KUMAR, R. CD4 T-Lymphocytes Regulate Airway Remodeling and Hyper-Reactivity in a Mouse Model of Chronic Asthma Paul S. Foster, Ming Yang, Cristan **Lab Investigation**, v. 82,p. 455-62, 2002.

HIRANO, T.; HIGA, S.; ARIMITSU, J.; NAKA, T.; SHIMA, Y.; OHSHIMA, S.; FUJIMOTO, M.; YAMADORI, T.; KAWASE, I.; TANAKA, T. Flavonoids such as luteolin, fisetin and apigenin are inhibitors of interleukin-4 and interleukin-13 production by activated human basophils. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 134, p. 135-140, 2004.

HIROSE, E.; MATSUSHIMA, M.; TAKAGI, K., OTA, Y.; ISHIGAMI, K.; HIRAYAMA, T.; HAYASHI, Y.; NAKAMURA, T.; HASHIMOTO, N.; IMAIZUMI, K.; BABA, K.; HASEGAWA, Y. KAWABE, T. Involvement of Heme Oxygenase-1 in Kaempferol-Induced Anti-Allergic Actions in RBL-2H3 Cells. **Inflammation**, v.12, p. 1238-1245, 2009.

HUBER, S.; SCHRAMM, C.; LEHR, H.A.; MANN, A.; SCHMITT, S.; BECKER, C.; PROTSCHKA, M.; GALLE, P.R.; NEURATH, M.F.; BLESSING, M. TGF- β signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. **Cutting edge: J Immunol**, v.173, p.6526-6531, 2004.

HUGHES, D.A. Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. **Proc Nutr Soc**, v. 58, p. 79-84, 1999.

HUMBLES, A.A.; BLASER, K.; AKDIS, C.; SCHMITT, S.; BECKER, J. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. **Science**, v. 305, p. 1776-9, 2004.

IZUHARA, K.; ARIMA, K. Signal transduction of IL-13 and its role in the pathogenesis of bronchial asthma. **Drug News Perspect**, v. 17, p. 91– 98. 2004.

IZUHARA, K.; ARIMA, K.; YASUNAGA, S. IL-4 and IL-13: their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies. *Curr Drug Targets* **Inflamm Allergy**, v.3, p. 263-9. 2002.

JUNG, C.H.; LEE, J.Y.; CHO, C.H.; KIM, C.J. Anti-asthmatic action of quercetin and rutin in conscious guinea-pigs challenged with aerosolized ovalbumin. **Arch Pharm Res**. v.30, p.599-607, 2007

JUSSIEU, A.L. *Genera Plantarum Secundum Ordines Naturales disposita*. **Paris: Herissan & Barrois**, 1789.

JUTEL, M.; WATANABE, T.; AKDIS, M.; BLASER, K.; AKDIS, C.A. Immune regulation by histamine. **Curr Opin Immunol**, v. 14, p. 735-740, 2002.

JUZWIAK, S. Experimental evaluation of the effect of pollen extract on the course of paracetamol poisoning. **Ann Acad Med Stetin**, v. 39, p. 57-69, 1993.

KALHAN, R.; SMITH L.J.; NLEND, M.C.; NAIR, A.; HIXON, J.L.; SPORN, P.H. A mechanism of benefit of soy genistein in asthma: inhibition of eosinophil p38-dependent leukotriene synthesis. **Clin Exp Allergy**, v.38, p.103-12, 2008

KAWAI, M.; HIRANO, T.; HIGA, S.; ARIMITSU, J.; MARUTA, M.; KUWAHARA, Y.; OHKAWARA, T.; HAGIHARA, K.; YAMADORI, T.; SHIMA, Y.; OGATA, A.; KAWASE, I.; TANAKA, T. Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. **Allergol Int**, v.56, p 113-123, 2007.

KELLER, A.C. Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. **J Allergy Clin Immunol**, v.117, p. 283-90, 2006.

KIMA, S.; PARKA, H.; LEE, C.; CHOIC, I.W.; MOONB, D.; ROHD, H.; LEE, H. E.; PARK, Y. Epigallocatechin-3-gallate protects toluene diisocyanate-induced airway inflammation in a murine model of asthma **FEBS Letters**, v.580, p.1883–1890, 2006.

KIMATA, M.; SHICHIJO, M.; MIURA, T.; SERIZAWA, I.; INAGAKI, N.; NAGAI, H. Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. **Clin Exp Allergy**, v. 30, p. 501-508, 2000.

KIPS, J.C.; BRUSSELLE, G.G.; JOOS, G.F.; PELEMAN, R.A.; DEVOS, R.R.; TAVERNIER, J.H.; PAUWELS, R.A. Importance of interleukin-4 and interleukin-12 in allergen-induced airway changes in mice. **Int Arch Allergy Immunol**, v.107, p.115-118, 1995.

KNAP, L. Fitoterapia abre novos campos de pesquisa. **Gazeta Mercantil, São Paulo, Caderno 1**, p. 6, 18 set. 2001.

KNAPP, S.; BOHS, L.; NEE, M.; SPOONER, D.M. Solanaceae - a model for linking genomics with biodiversity. **Comp and Func Genomics**, v.5, p.285-291, 2004.

KNEKT,, P.; KUMPULAINEN, J.; JARVINEN, R.; RISSANEN, H.; HELIOVAARA, M.; REUNANEN, A.; HAKULINEN, T.; AROMAA, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **Am J Clin Nutr**, v. 76, p. 560-568, 2002.

KON, O.M.; SIHRA, B.S.; COMPTON, C.H.; LEONARD, T.B.; KAY, A.B.; BARNES NC. Randomised, dose-ranging, placebocontrolled study of chimeric antibody to CD4 (keliximab) in chronic severe asthma. **Lancet**, v.352, p.1109–1113, 1998.

KOSMIDER, K. Effect of cerniton on platelet aggregation in vivo. **Herba Polon**, v. 29, p. 237, 1983.

KOTANI, M.; MATSUMOTO, M.; FUJITA, A.; HIGA, S.; WANG, W.; SUEMURA, M.; KISHIMOTO, T.; TANAKA, T. Persimmon leaf extract and astragaloside inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. **J Allergy Clin Immunol** v.106, p. 159-166, 2000.

KOTSIMBOS, T.C.; ERNST, P.; HAMID, Q.A. Interleukin-13 and interleukin-4 are coexpressed in atopic asthma. **Proc. Assoc. Am. Physicians**, v.108, p.368–373, 1996.

KROCZEK, R.; HAMELMANN, E. T-cell costimulatory molecules: optimal targets for the treatment of allergic airway disease with monoclonal antibodies. **J Allergy Clin Immunol**, v.116,p. 906–909, 2005.

KÜHNAU, J. The flavonoids, a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. **World rev nut and dietetics**, v. 24, p. 117, 1976.

KUNG, T.T.; JONES, H.; ADAMS, G.K.; UMLAND, S.P.; KREUTNER, W.; EGAN, R.W.; CHAPMAN, R.W.; WATNICK, A.S. Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation. **Int Arch Allergy Immunol**, v.105, p. 83-90, 1994.

KUNIYASU, Y.; CHUNG, K.F.; DJUKANOVIC, R., HANSEL, T.T.; HOLTGATE, S.T. Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. **Int Immunol**, v.12, p. 1145-55, 2000.

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

LARCHE, M.; ROBINSON, D.S.; KAY, A.B. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, p. 450-463, 2003.

LECKIE, M.J.; BRINKE, A.; KHAN, J.; DIAMANT, Z.; O'CONNOR, B.J.; WALLS, C.M.; MATHUR, A.K.; COWLEY, H.C.; CHUNG, K.F.; DJUKANOVIC, R.; HANSEL, T.T.; HOLGATE, S.T.; BARNES, P.J. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. **Lancet** v.356, p.2144–2148, 2000.

LEE, Y.S.; HAN, C.H.; KANG, S.H.; LEE, S.J.; KIM, S.W.; SHIN, O.R.; SIM, Y.C.; LEE, S.J.; CHO, Y.H. Synergistic effect between catechin and ciprofloxacin on chronic bacterial prostatitis rat model. **Int J Urol**, v.12, p.383-9, 2005.

LEI, X.F.; OHKAWARA, Y.; STAMPFLI, M.R.; MASTRUZZO, C.; MARR, R.A.; SNIDER, D. Disruption of antigen-induced inflammatory responses in CD40 ligand knockout mice. **J Clin Invest**, v.101, p.1342-53, 1998.

LEWKOWICH, I.P.; DJUKANOVIC, R.; HANSEL, T.T.; HOLGATE, S.T. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. **J Exp Med**, v. 202, p. 1549-61, 2005.

LI, W. X.; CUI, C. B.; CAI, B.; WANG, H, H. Y.; YAO, X. S. Flavonoids from *Vitex trifolia* L. Inhibit cell cycle progression at G2/M phase and induce apoptosis in mammalian cancer cells. **J. Asian Nat. Prod. Res**, v. 7, p. 615-626, 2005.

LIMA, J. T.; ALMEIDA, J. R.G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ASSIS T. S.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, B. A. Spasmolytic Action of Diplopropin, a Furanoflavan from *Diplopropis ferruginea* Benth., Involves Calcium Blockage in Guinea-Pig Ileum. **Z. Naturforsch. B**, v. 60 b, p. 1093-1100, 2005.

LYNGHEIM, L.; SCAGNETTI, J. Bee Pollen – **Nat Mir Health Food** Wiltshire Book Company, Hollywood, 1979.

MADDOX, L.; SCHWARTZ, D.A. The pathophysiology of asthma. **Annu Rev Med**, v. 53, p. 477-498, 2002.

MAMURA, M.; LEE, W.; SULLIVAN, T.J.; FELICI, A.; SOWERS, A.L.; ALLISON, J.P.; LETTERIO, J.J. CD28 disruption exacerbates inflammation in Tgf-b1S/S mice: in vivo suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells independent of autocrine TGF-b1. **Blood**, v.103, p.4594-4601, 2004.

MATTES, J.; YANG, M.; MAHALINGAM, S.; KUEHR, J.; WEBB, D.C.; SIMSON, L.; HOGAN, S.P.; KOSKINEN, A.; MCKENZIE, A.N.; DENT, L.A.; ROTHENBERG, M.E.; MATTHAEI, K.I.; YOUNG, I.G.; FOSTER, P.S. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. **J Exp Med**, v.195, p.1433-1444, 2002.

MAYR, S.I.; ZUBERI, R.I.; LIU, F.T. Role of immunoglobulin E and mast cells in murine models of asthma. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, p. 821-827, 2003.

MEDEIROS, K.C.P. Extrato fenólico do pólen apícola da *Apis melífera* inibe hipersensibilidade do tipo I em modelo de asma e relaxa músculo liso de traquéia. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** - Universidade Federal da Paraíba. 2006.

MEDEIROS, K.C.P.; FIGUEIREDO, C.A.V.; FIGUEREDO, T.B.; FREIRE, K.R.L.; SANTOS, F.A.R.; ALCANTARA-NEVES, N.M.; SILVA, T.M.S.; PIUVEZAM, M.R. Antiallergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice, **J Ethnopharmac**, v.119, p.41-6. 2008.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIDDLETON, E., JR.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol Rev**, v. 52, p. 673-751, 2000.

MILLER, A.; LIDER, O.; WEINER, H.L. Antigen driven bystander suppression after oral administration of antigen. **J.Exp.Med**, v.174, p. 791-798, 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde, Estatísticas de Mortalidade, 2005. <Disponível em: <<http://www.ministeriodasaude.gov.br>>Acesso em:10 Fevereiro, 2009.

MONERET-VAUTRIN, D.A.; MORISSET, M.; FLABBEE, J.; BEAUDOUIN, E.; KANNY, G. Epidemiology of life-threatening and lethal anaphylaxis: a review. **Allergy**, v. 60, p. 443-451, 2005.

MOON, K.; KIM, S.; KIM, T.; YUN, E. S.; PARK, C.; CHO, Y. S.; MOON, H.; LEE, K. Allergen-induced CD11b1 CD11cint CCR31 macrophages in the lung promote eosinophilic airway inflammation in a mouse asthma model. **Int Immunology**, v. 19, p. 1371–1381, 2007.

MOULD, A.W.; RAMSAY, A.J.; MATTHAEI, K.I.; YOUNG, I.G.; ROTHENBERG, M.E.; FOSTER, P.S. The effect of IL-5 and eotaxin expression in the lung on eosinophil trafficking and degranulation and the induction of bronchial hyperreactivity. **J Immunol**, v.164, p.2142–2150, 2000.

NAKAJIMA, H.; IWAMOTO, I.; TOMOE, S.; MATSUMURA, R.; TOMIOKA, H.; TAKATSU, K.; YOSHIDA, S. CD4+ T-lymphocytes and interleukin-5 mediate antigen-induced eosinophil infiltration into the mouse trachea. **Am Rev Respir Dis**, v.146, p.374-377, 1992.

NEE, M. Synopsis of *Solanum* in the New World. In: NEE, M.S., D.E.; LESTER, R.N.; JESSOP, J.P. **Solanaceae IV: advances in biology and utilization**. Royal Botanic Gardens.Kew, p. 285-333, 1999

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NOURI-ARIA, K.T.; WACHHOLZ, P.A.; FRANCIS, J.N.; JACOBSON, M.R.; WALKER, S.M.; WILCOCK, L.K.; STAPLE, S.Q.; AALBERSE, R.C.; TILL, S.J.; DURHAM, S.R. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. **J Immunol**, v. 172, p. 3252-3259, 2004.

OKAMOTO, I.; IWAKI, K.; KOYA-MIYATA, S.; TANIMOTO, T.; KOHNO, K.; IKEDA, M. AND KURIMOTO, M. The flavonoid Kaempferol suppresses the graft-versus-host reaction by inhibiting type 1 cytokine production and CD8+ T cell engraftment. **Clin Immunol**, v.103, p.132-144, 2002.

OKU, H.; ISHIGURO, K. Antipruritic and antidermatitic effect of extract and compounds of *Impatiens balsamina* L. in atopic dermatitis model NC mice. **Phytother Res**, v.15, p. 506-510, 2001

PAIVA, J.; FIGUEIREDO, E. Polinização e Melissopalínologia. **1º Congresso Nacional de Apicultura (Portugal)**. Câmara Municipal da Nazaré, 1987.

PARK, H.H.; LEE, S.; SON, H.Y.; PARK, S.B.; KIM, M.S.; CHOI, E.J.; SINGH, T.S. HAM, J.H.; LEE, M.G.; KIM, J.E.; HYUN, M.C.; KWON, T.K.; KIM, Y.H.; KIM, S.H. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. **Arch Pharm Res**, v.31, p.1303-11, 2008.

PARK, H.J.; LEE, C.M.; JUNG, I.D.; LEE, J.S.; JEONG, Y.I.; CHANG, J.H.; CHUN, S.H.; KIM, M.J.; CHOI, I.W.; AHN, S.C.; SHIN, Y.K.; YEOM, S.R.; PARK, Y.M. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. **Int Immunopharmac**, v.4, p. 1230-1240, 2008.

PARK, K.Y.; LEE, S.H.; MIN, B.K.; LEE, K.S.; CHOI, J.S.; CHUNG, S.R.; MIN, K.R.; KIM, Y. Inhibitory effect of luteolin 4'-O-glucoside from *Kummerowia striata* and other flavonoids on interleukin-5 bioactivity. **Planta Med**, v. 65, p. 457-459, 1999.

PARK, S.; SHIN, W.; SEO, J.; KIM, E. Anthocyanins inhibit airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine asthma model. **Food Chem Toxic**, v.45, p.1459-1467, 2007.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, p. 395-400, 2000.

PEARCE, N.; AIT-KHALLED, 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.

PEDERSEN, P.; HASSELGREN, P.O.; ANGERAS, U.; HALL-ANGERAS, M.; WARNER, B.W.; LAFRANCE, R. Protein synthesis in liver following infusion of the catabolic hormones corticosterone, epinephrine, and glucagons in rats. **Metabolism**, v.38,p.927-32, 1989.

PEREZ, R. M.; CERVANTES, H.; ZAVALA, M. A.; SANCHEZ, S. J.; PEREZ, S.; PEREZ, C. Isolation and hypoglycemic activity of 5, 7, 3- trihydroxy-3,6,4-trimethoxyflavone from *Brickellia veronicaefolia*. **Phytomedicine**, v. 7, n. 1, p.25-29, 2000.

PERIS, J. Producción y comercio de los productos apícolas en España. El Campo de Banco de Bilbao. **Apicultura**, v. 93, 1984.

PUEL, C.; MARDON, J.; AGALIAS, A.; DAVICCO, M.J.; LEBECQUE, P.; MAZUR, A. HORCAJADA, M.N.; SKALTSOUNIS, A.L.; COXAM, V. Major phenolic compounds in olive oil modulate bone loss in an ovariectomy/inflammation experimental model. **Agric Food Chem**, v.56, p.9417-22, 2008.

RADINGER, M.; JOHANSSON, A.K.; SITKAUSKIENE, B.; SJOSTRAND, M.; LOTVALL, J. Eotaxin-2 regulates newly produced and CD34 airway eosinophils after allergen exposure. **J Allergy Clin Immunol**, v. 113, p. 1109-1116, 2004.

REINBOTHE, C.; DIETRICH, B.; LUCKNER, M. Regeneration of plants from somatic embryos of *Digitalis lanata*. **J. Plant Physiol**, v. 137, p. 224-228, 1990.

REZAI-ZADEH, K.; EHRHART, J.; BAI, Y.; SANBERG, P.R.; BICKFORD, P.; TAN, J.; SHYTLER, R.D. Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. **J Neuroinflam**, v.25;p.35-41, 2008.

RIFFO-VASQUEZ, Y.; SPINA, D. Role of cytokines and chemokines in bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation. **Pharmacol Ther**, v. 94, p. 185-211, 2002.

ROBERTSON, D.G.; KERIGAN, A.T.; HARGREAVE, F.E. Late asthmatic responses induced by ragweed pollen allergen. **J Allergy Clin Immunol**, v. 54, p.244-54, 1974.

ROBINSON, D.S. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **N Engl J Med**, v.326, p. 298-304, 1992.

ROGERIO, A.P.; KANASHIRO, A.; FONTANARI, C.; DA SILVA, E.V.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; SOARES, E.G.; FACCIOLI, L.H. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. **Inflamm Res**, v.56, p.402-408, 2007.

SAKLATVALA, J. Glucocorticoids: do we know how they work? **Arthritis Res**, v.4, p.146-50, 2002.

SAVARY, I.; DEBRAS, E.; DARDEVET, D.; SORNET, C.; CAPITAN, P.; PRUGNAUD, J. Effect of glucocorticoid excess on skeletal muscle and heart protein synthesis in adult and old rats. **Br J Nutr**, v.79, p. 297-304, 1998

SEN, G.C.; LENGYEL, P. The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry. **J Biol Chem**, v. 267, p. 5017-5020, 1992.

SHI, H.; QIN, S.; HUANG, G.; CHEN, Y.; XIAO, C.; XU, H.; LIANG, G.; XIE, Z.; QIN, X.; WU, J.; LI, G.; ZHANG, C. Infiltration of eosinophils into the asthmatic airways caused by interleukin 5. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.16, p. 220-224, 1997.

SHICHIJO, M.; YAMAMOTO, N.; TSUJISHITA, H.; KIMATA, M.; NAGAI, H.; KOKUBO, T. Inhibition of syk activity and degranulation of human mast cells by flavonoids. **Biol Pharm Bull**, v. 26, p. 1685-1690, 2003.

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

SILVA, T.M.; BATISTA, M.M.; CAMARA, C.A.; AGRA, M.F. Molluscicidal activity of some Brazilian Solanum spp. (Solanaceae) against Biomphalaria glabrata. **Ann Trop Med Parasitol**, v.99, p.419-25, 2005.

SILVA, T.M.S.; DE CARVALHO, M.G.; BRAZ, R.; AGRA, M.D. Occurrence of flavones and flavonols aglycones and its glycosides in Solanum (Solanaceae). **Química Nova**, v.26, p.517-522, 2003.

SINGH, B.; NARLA, R.K.; MAHAJAN, S.; GHOSH, S. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. **Immunol Rev.**, v.182: p. 190-200, **2001**.

SOIKE, H.; LENG- PESCHLOW, E. Characterisation of flavonoids from Baccharis trimera and their antihepatotoxic properties. **Plant. Med**, v. 53, p.37-39, 1987.

STAFF, I.A.; TAYLOR, P.E.; SMITH, P.; SINGH, M.B.; KNOX, R.B. Cellular localization of water soluble, allergenic proteins in rye-grass (Lolium perenne) pollen using monoclonal and specific IgE antibodies with immunogold probes. **Histochem J**, v. 22, p. 276-290, 1990.

STEINHARTER, T.P.; COOPERDRIVER, G.A.; ANDERSON, G.J. The Phylogenetic Relationship of Solanum Flavonols. **Bioch Syst Ecology**, v.14, p.299-305, 1986.

SUDBECK, E.A.; LIU, X.P.; NARLA, R.K.; MAHAJAN, S.; GHOSH, S.; MAO, C.; UCKUN, F.M. Structure-based design of specific inhibitors of Janus kinase 3 as apoptosis-inducing antileukemic agents. **Clin Cancer Res** v.5, p.1569-1582, 1999.

SZABO, S. J.; SULLIVAN, B. M.; PENG, S. L.; GLIMCHER, L.H. Molecular mechanism regulating th1 immune responses. **Annu Rev. Immunol**, v. 21, p. 713-758, 2003.

TANG, C.; WARD, C.; REID, D.; BISH, R., O'BYRNE, P.M.; WALTERS, E.H. Normally suppressing CD40 coregulatory signals delivered by airway macrophages to TH2 lymphocytes are defective in patients with atopic asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v.107, p.863–870, 2001.

TEIXEIRA, M.M.; WILLIAMS, T.J.; HELLEWELL, P.G.,. Mechanisms and pharmacological manipulation of eosinophil accumulation in vivo. **Trends Pharmacol Sci**, v.16, p.418-423, 1995.

TESCIUBA, A.G.; SUBUDHI, S.; ROTHER, R.P.; FAAS, S.J.; FRANTZ, A.M.; ELLIOT, D. Inducible costimulator regulates Th2-mediated inflammation, but not Th2 differentiation, in a model of allergic airway disease. **J Immunol**, p.167- 178, 2003.

THEOHARIDES, T.C.; ALEXANDRAKIS, M.; KEMPURAJ, D.; LYTINAS, M. Anti-inflammatory actions of flavonoids and structural requirements for new design. **Int J Immunopathol Pharmacol** v.14, p.119-127, 2001.

TIMBERLAKE, C. F.; HENRY, B. S. Plant pigments as natural food colours. **Endeavour**, v. 10, p. 31-36, 1986.

TRIGGIANI, M.; CALABRESE, C.; GRANATA, F.; GENTILE, M.; MARONE, G. Metabolism of lipid mediators in human eosinophils. **Chem Immunol**, v. 76, p. 77-98, 2000.

TU, Y.C.; LIAN, T.W.; YEN, J.H.; CHEN, Z.T.; WU, M.J. Antiatherogenic effects of kaempferol and rhamnocitrin. **J Agric Food Chem**, v.55, p.9969-9976, 2007.

UMETSU, D.T.; MAHAJAN, S.; GHOSH, S.; MAO, C.; UCKUN, F.M. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. **Nat Immunol**, v.3, p. 715-20, 2002.

VIGNOLA, A.M.; CHANEZ, P.; CHIAPPARA, G.; MERENDINO, A.; PACE, E.; RIZZO, A.; LA ROCCA, A.M.; BELLIA, V.; BONSIGNORE, G.; BOUSQUET, J. Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. **Am J Respir Crit Care Med**, v.156, p.591-599, 1997.

WAGNER, H. Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. **Planta Med**, v. 55, p. 235-241, 1989.

WANG, J.; ZHANG, Q.; JIN, S.; HEN, D.; ZHAO, S.; LIU, S. Genistein modulate immune responses in collagen-induced rheumatoid arthritis model. **Maturitas**, v. 20, p.405-12, 2008.

WANG, C. L.; LI, H. Q; MENG, W. D.; QING, F. L. Trifluoromethylation of flavonoids and anti-tumor activity of the trifluoromethylation flavonoid derivation. **Bioorg. Med. Chem. Lett**, v. 15, p. 4456-4458, 2005.

WANG, J.; PALMER, K.; LOTVALL, J.; MILAN, S.; LEI, X.F.; MATTHAEI, K.I.; GAULDIE, J.; INMAN, M.D.; JORDANA, M.; XING, Z. Circulating, but not local lung, IL-5 is required for the development of antigen-induced airways eosinophilia. **J Clin Invest**, v.102, p.1132-1141, 1998.

JI, W.; CHEN X.; CHEN Z.; HU Y.; HUANG, L.; QIU, Y. Therapeutic effects of anti-B7-1 antibody in an ovalbumin-induced mouse asthma model. **Int Immunopharmacol.** v. 8, p. 1190–1195, 2008.

WESTERMANN, J.; BODE, U. Distribution of activation T cells migrating through the body: a matter of life and death. *Immunol. Today*, v.20, p.302-6, 1999.

WILDER, J.A.; COLLIE, D.D.; WILSON, B.S.; BICE, D.E.; LYONS, C.R.; LIPSCOMB, M.F. Dissociation of airway hyperresponsiveness from immunoglobulin E and airway eosinophilia in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* v. 20, p.1326–1334, 1999

WILLS-KARP, M., Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol. Rev.* v.202, p.175-190, 2004.

WOJCICKI, J.; SAMOCHOWIEC, L.; BARTLOMOWICZ, B.; HINEK, A.; JAWORSKA, M.; GAWRONSKA-SZKLARZ, B. Effect of pollen extract on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*, v. 62, p. 39-45, 1986.

WONG, W. S. F.; KOH, D. S. K. Advances in Immunopharmacology of Asthma. *Bioch Pharmacol*, v. 59, p. 1323-1355, 2000.

WU, Y.Q.; ZHOU, C.H.; TAO, J.; LI, S.N. Antagonistic effects of nobiletin, a polymethoxyflavonoid, on eosinophilic airway inflammation of asthmatic rats and relevant mechanisms. *Life Sci*, v.78, p.2689-2696, 2006.

XIE, Y.C.; DONG, X.W.; WU, X.M.; YAN, X.F.; XIE, Q.M. Inhibitory effects of flavonoids extracted from licorice on lipopolysaccharide-induced acute pulmonary inflammation in mice. **Int Immunopharmacol**, v.9, p.194-200, 2009

YAZDANBAKHSH, M.; KREMSNER, P.G.; REE, V. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. **Science**, v.296, p. 490-4, 2002.

YONEYAMA, S.; KAWAI, K.; TSUNO, N.H.; OKAJI, Y.; ASAKAGE, M.; TSUCHIYA, T.; YAMADA, J.; SUNAMI, E.; OSADA, T.; KITAYAMA, J.; TAKAHASHI, K.; NAGAWA H. Epigallocatechin gallate affects human dendritic cell differentiation and maturation. **J Allergy Clin Immunol**, v.121, p.209-14, 2008.

YSSEL, H.; GROUX, H. Characterization of T cell subpopulations involved in the pathogenesis of asthma and allergic diseases. **Int Arch Allergy Immunol**, v.121, p. 10-8, 2000.

ZHAO, J.; ZHANG, C.Y.; XU, D.M.; HUANG, G.Q.; XU, Y.L.; WANG, Z.Y.; FANG, S.D.; CHEN, Y.; GU, Y.L. The antiatherogenic effects of components isolated from pollen typhae. **Thromb Res**, v. 57, p. 957-966, 1990.

Apêndice



RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

MEDEIROS, K.C.P.; BORDUCCHI, E; NASCIMENTO, R.J.B., GOMES, E; PIUVEZAM, M.R AND RUSSO, M. **Glycoside kaempferol treatment, a natural plant flavonoid, prevents murine airway allergic disease.** In: XXXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology 2008, Rio de Janeiro. Ribeirão Preto – SP, 2008.

MEDEIROS, K.C.P.; BORDUCCHI, E; NASCIMENTO, R.J.B., GOMES, E; PIUVEZAM, M.R AND RUSSO, M. **The flavonoid 3-o-[β -d-glicopiranosil-(1-6)-Iramnopiranosil]7-o- α -I-ramnopiranosil-7-o- α -I-ramnopiranosil kaempferol (GRRK-kaempferol) inhibts pulmonary cell migration and airways hyperreactivity in murine model of asthma.** 39^o Congresso Brasileiro de Farmacologia. Ribeirão Preto – SP, 2007.

MEDEIROS, K. C. P., Borducchi, E., FAUSTINO, L. S., NASCIMENTO, E.A.G.M., Silva, PIUVEZAM, M. R., RUSSO, M. **Isorhamnetin inhibts pulmonary cell migration and airways hyperreactivity in murine model of asthma** In: 13 th International Congress of Immunology, 2007, Rio de Janeiro. Immuno Rio 2007 - 13 th International Congress of Immunology. , 2007.

MEDEIROS, K. C. P.; ALMEIDA ,K.R.; ALCANTERA_NEVES, N.M., FIGUEREDO, T.B., FREITAS, K.R.L.; SILVA, T.M.S.; PIUVEZAM, M. R.;; **Effect of bee pollen phenolic extract of *apis mellifera* in immediate allergic response.** XXXI Meeting of the Brazilian Society for Immunology. Buzios- R.J. 2006

MEDEIROS, K. C. P.; SILVA, J. L. V; RIBEIRO, L.A.A. .; SILVA, T.M.S.; PIUVEZAM, M. R.;;SILVA, B.A. **Relaxant effect of the bee pollen phenol extract from *apis mellifera* on guinea-pig trachea.** 38^o Congresso Brasileiro de Farmacologia. Ribeirão Preto – SP, 2006.

MEDEIROS, K. C. P.; FREITAS, K.R.L.; ARRUDA, I.T.S.; SILVA, T.M.S.; PIUVEZAM, M. R.;; **Bee pollen extract inhibits immediate allergic response in ovalbumin-sensitized mice.** XXX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2005, São Pedro, SP. ABSTRACT. p.134-134, 2005.

Notícias

Plantas medicinais: mais um aliado para o tratamento de alergias

Por Cristina Caldas
23/06/2008

Foi da casca da mangava brava, uma planta típica do cerrado, que pesquisadores derivaram um extrato alcoólico que se mostrou eficaz no tratamento e prevenção de alguns sintomas da asma, em camundongos. O artigo, publicado este ano no periódico científico *European Journal of Pharmacology* (Vol.580; n.1-2, 2008), "abriu perspectiva para o uso dessa planta no tratamento de processos alérgicos", destacou Lúcia Faccioli, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP), líder do trabalho realizado em colaboração com Momtchilo Russo, do Departamento de Imunologia da USP.



Lafouzia pacari (arbusto e detalhe da casca) Foto: Maria de Fátima Barbosa Coelho

Faccioli contou que a idéia de estudar a mangava brava, também conhecida

como dedaleira (*Lafoensia pacari* St.Hill), surgiu após contato com Deijanira Albuquerque, da Universidade Federal do Mato Grosso, que pretendia demonstrar cientificamente as propriedades antiinflamatórias da planta usada popularmente para úlcera gástrica, combate a febre, tônico e cicatrizante. No Paraguai, a planta é chamada de morosyvo e é utilizada para o tratamento de câncer.

Conduzido principalmente por Alexandre Rogério, os trabalhos resultantes dessa linha de pesquisa já haviam mostrado efeitos antiinflamatórios da dedaleira em modelos experimentais de infecção. Além disso, o ácido elágico - composto fenólico encontrado em muitos alimentos, dentre eles o morango, e um dos metabólitos secundários da dedaleira - foi identificado como responsável por esses efeitos, explica Faccioli.

No trabalho atual, os pesquisadores utilizaram o modelo clássico de induzir alergia em camundongos usando o alérgeno ovalbumina, uma proteína de ovo de galinha. Quando administrada em condições e intervalos adequados, a proteína leva ao desencadeamento de vários sintomas da asma, como intensa infiltração de células no pulmão, liberação de moléculas inflamatórias, dificuldade em respirar quando desafiado com substância broncoconstrictora, produção exacerbada de muco no pulmão, entre outros.

Quando tratados com o extrato da planta, assim como com o ácido elágico, os camundongos apresentaram uma diminuição no número de eosinófilos e neutrófilos - células inflamatórias - no pulmão em comparação com os alérgicos não tratados. Além disso, os pesquisadores observaram também uma inibição na liberação de citocinas como IL-5, IL-4 e IL-13, moléculas aumentadas em processos inflamatórios com predomínio de eosinófilos, como aqueles que ocorrem nas alergias, na asma e em algumas parasitoses, afirma a pesquisadora.

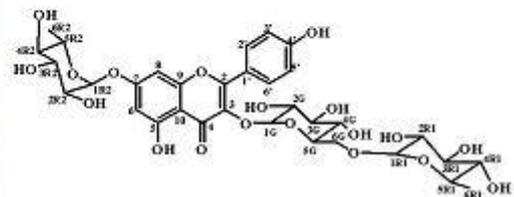
Mas nem todos os atributos importantes da asma foram controlados com o tratamento. O extrato da mangava brava foi incapaz de inibir significativamente a síntese de substâncias (leucotrienos), que causam broncoconstrição, secreção de muco e aumento da permeabilidade vascular característicos da asma. Contudo, os pesquisadores observaram uma tendência do tratamento com ácido elágico em diminuir a síntese de leucotrienos. E concluem: "Esses tratamentos reduziram alguns dos mais significativos fenótipos relacionados com a asma", o que confirma o uso popular da mangava brava como agente antiinflamatório. Além disso, Faccioli destaca que "há indicativos que o extrato alcoólico da *Lafoensia pacari* não é tóxico", com base em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Extrativismo

E de onde são coletadas as plantas para a obtenção do extrato? "É um problema uma espécie ser indicada para uso farmacológico e não ser cultivada", destaca Maria de Fátima Barbosa Coelho, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, no Rio Grande do Norte. A pesquisadora afirma que desconhece que a *Lafoensia pacari* seja cultivada para a extração da casca para uso medicinal. No entanto, isso não seria problema, uma vez que "suas sementes germinam com facilidade, pode-se fazer mudas e transplantar para o campo aos cinco ou seis meses, e com cerca de três anos algumas plantas já apresentam um bom desenvolvimento do tronco e poderiam fornecer cascas", orienta a pesquisadora. Laércio Wanderlei dos Santos, que

desenvolveu sua dissertação de mestrado com Maria de Fátima Coelho, obteve bons resultados com adubação orgânica da mangava brava em Barra do Garças, Mato Grosso.

Opções de plantas medicinais não faltam na vasta biodiversidade brasileira. Outra possibilidade que vem sendo aventada pelos pesquisadores é o uso de flavonóides - substâncias químicas encontradas principalmente em frutas e verduras vermelho-alaranjada, em polens e em flores - para o tratamento e prevenção de alergias. Karina Carla de Paula Medeiros e Márcia Regina Piuvezam, do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, desenvolvem atualmente projeto em colaboração com Russo, para o estudo de um flavonóide derivado do kanferol, extraído das partes aéreas da planta *Solanum asperum* Richard, conhecida popularmente por coça-coça, jussara, jurubeba-branca ou velame-bravo. O objetivo é avaliar o efeito da administração desse flavonóide tanto na prevenção quanto no tratamento da asma já estabelecida, no mesmo modelo experimental em camundongos descrito acima. Dados preliminares sugerem que o derivado do kanferol inibe reações inflamatórias, bem como melhora a função pulmonar relacionada com a asma alérgica; no entanto, os mecanismos envolvidos do flavonóide para tais efeitos ainda estão em investigação. "Entendendo os mecanismos básicos é possível desenvolver produtos que atuem durante a sensibilização com o alérgeno ou diminuam os sintomas do indivíduo já sensibilizado", conclui Russo.



Solanum asperum Richard e flavonóide derivado. Foto: Tania Maria Sarmiento da Silvav

-----Anexo incorporado-----

----- Forwarded message -----

From: **The European Journal of Pharmacology** <ejp-office@pharm.uu.nl>

Date: 2008/12/1

Subject: A manuscript number has been assigned to GLYCOSIDE KAEMPFEROL INHIBITS AIRWAY INFLAMMATION AND HYPERRESPONSIVENESS IN A MURINE MODEL OF ASTHMA.

To: mrpiuvezam@lft.ufpb.br

Dear Professor Piuvezam,

Your submission entitled "GLYCOSIDE KAEMPFEROL INHIBITS AIRWAY INFLAMMATION AND HYPERRESPONSIVENESS IN A MURINE MODEL OF ASTHMA." has been assigned the following manuscript number: EJP-30165.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/ejp/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

EJP Editorial Office

Editorial Office