

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

LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA

**EFEITO IMUNOMODULADOR DO ALCALOIDE SINTÉTICO MHTP NA
INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA EXPERIMENTAL**

JOÃO PESSOA – PB

2016

LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA

**EFEITO IMUNOMODULADOR DO ALCALOIDE SINTÉTICO MHTP NA
INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA EXPERIMENTAL**

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

Área de concentração: **Farmacologia**

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam

JOÃO PESSOA – PB

2016

LAÉRCIA KARLA DIEGA PAIVA FERREIRA

**EFEITO IMUNOMODULADOR DO ALCALOIDE SINTÉTICO MHTP NA
INFLAMAÇÃO PULMONAR ALÉRGICA EXPERIMENTAL**

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

Dissertação de Mestrado aprovada em _____

BANCA EXAMINADORA

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

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

Profa. Dra. Karina Carla de Paula Medeiros
(Departamento de Morfologia – UFRN. Avaliadora Externa)

Profa. Dra. Marcia Rosa de Oliveira
(Departamento de Biologia Molecular – UFPB. Suplente)

Dedico este trabalho a Deus e a minha base, meus pais sensacionais, meus tesouros aqui na terra Clélia Paiva da Veiga e Luiz Carlos de Souza Ferreira e minha irmã e companheira incondicional Larissa Adilís Maria Paiva Ferreira por serem meus verdadeiros incentivadores, amigos e companheiros na fé em Cristo Jesus!

AGRADECIMENTOS

Deus, meu sentimento para contigo é redenção. Quando me rendi aos teus pés, me mostrasse o quão grande é teu amor para comigo, mesmo sem eu merecer, me deste o melhor presente de todos: minha salvação, como na tua palavra fala “porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos caminhos, os meus caminhos, diz o Senhor (Is 55:8)”, te agradeço por tua proteção e cuidado para com minha vida durante esse ciclo e toda minha vida, por cada pessoa que colocaste nela, oportunidades a mim concedidas, porque todas as coisas cooperam para o bem daqueles que te amam.

Aos meus pais, Luiz Carlos de Souza Ferreira e Clélia Paiva da Veiga, pela educação, amor e carinho, todos os conselhos, todo esforço em minha criação. Vocês são meus exemplos de vida e principalmente de pais, EU AMO MUITO VOCÊS. **A minha avó, Maria Alves de Souza Ferreira**, “veia te amo demais, chantagista”, obrigada por estar nos bastidores da minha família e também ser a matriarca, tenho muito orgulho da senhora. **Aos meus familiares, tio(a)s, primo(a)s**, que não são poucos e não quero ser injusta com ninguém, obrigada pelos momentos de união, de alegrias, de encorajamento e amor de família compartilhados.

A minha pequena grande irmã, Larissa Adilis Maria Paiva Ferreira, que além de irmã de sangue é minha irmã em Cristo, obrigada por sempre estar do meu lado e ser meu porto seguro, você é uma benção de Deus em nossa família. Além disso, é minha Iniciação científica, quanto aprendizado, compartilhamento de alegrias e muito choro por todos os experimentos errados, todas as discussões de resultados e durante cada experimento, antes mesmo de você decidir seguir meus passos, já me ajudava na coleta do sangue, pulmão, e foram tantos... esse trabalho também é seu, em todo tempo está comigo. Você é meu tesouro, tenho muito orgulho de ser sua irmã e sua chefe (kkkk), você é muito produtiva, a melhor Ic de todos os tempos, e sempre estarei aqui para te ajudar.

A um príncipe real que Deus colocou na minha vida, Luís Romero Barbosa, obrigada por ser meu companheiro e ajudador nessa minha conquista,

espero que seja a primeira de muitas ao seu lado. Obrigada por todos os ensinamentos e renúncias, pela espera e pelo apoio. Além disso, obrigada por me ensinar o Prisma, você é o melhor professor de estatística do mundo (rsrsrs =D).

Aos meus amigos extra graduação, principalmente minhas gêmeas prediletas **Iara Renata e Kiara Raquel**, obrigada por me amarem como sou e por não desistirem de mim mesmo tão ausente, mas algo que aprendi é que o tempo não apaga uma amizade verdadeira, ele amadurece o sentimento e nos faz aproveitar ao máximo os momentos juntos de reencontros.

Aos amigos do mestrado, agradeço a todos que fazem parte da minha turma, principalmente a **Luiz André**, o criador do meu MHTP, que sempre tentou me ensinar química, a **Juliane Santos, Yuri Manguiera**, grupo só sucesso dos seminários, nossos momentos únicos pré seminários e provas são inesquecíveis. Os aguardo no doutorado!

Aos Professores da pós graduação, pela contribuição acadêmica e científica em minha dissertação e na minha vida profissional.

Aos que constroem o Laboratório de Imunofarmacologia, um local que me fez aprender ciência, onde fiz grandes amigos e aprendi a admirar cada um que faz parte dessa família científica. Aos de antes, **Juliana, Herman, Renata, Jacqueline, Anne**; aos de hoje, **Talissa, Luiz Henrique, José Marreiro, Juliane, Larissa Rodrigues, Larissa Adilis, Raquel, Allysson, Éssia, Deyse, Fernanda, John, Júlia, Geovânia, Lidiane**; aos de sempre, **Fagner, José Guilherme e Adriano**. Aos professores **Cláudio, Sandra e Giciane**, a qual me mostrou o mundo da asma e assim me apaixonei por Th2.

A minha orientadora, a Professora Doutora Márcia Regina Piuvezam. Agradeço a oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa como Iniciação científica, desde o 2º período da minha graduação em farmácia. Nunca me esquecerei do dia 19 de março de 2010. Obrigada pela orientação, pelo seu jeito de orientar e também pela confiança depositada em mim

As professoras membros da Banca Examinadora **Sandra Rodrigues Mascarenhas, Karina Carla de Paula Medeiros e Marcia Rosa de Oliveira**, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento desse trabalho.

Aos funcionários da Universidade Federal da Paraíba, que estiveram presentes durante todo o meu mestrado, em especial a Crispim, sempre presente no PCA, muito obrigada por sua colaboração e a Mônica.

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

“Para tudo há uma ocasião certa; há um tempo certo para cada propósito debaixo de céu.”

Eclesiastes 3:1

RESUMO

O alcaloide sintético 2-methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol, codificado como MHTP, possui rendimento de 93,45%, não apresentou efeito genotóxico com baixa toxicidade aguda pré clínica e DL50 maior que 1.000 mg/kg. O MHTP apresentou efeito vasorelaxante e anti-inflamatório em modelo de inflamação aguda, administrado por via oral. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito imunomodulador do MHTP, administrado por instilação nasal (i.n.), na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por ovalbumina (OVA), por meio dos parâmetros alérgico (quantificação de IgE sérica), inflamatório (migração celular, produção de citocinas, no fluido do lavado broncoalveolar- BAL) e morfológico (produção de muco e histologia pulmonar geral). Camundongos fêmeas BALB/c foram sensibilizados com OVA nos dias 0 e 12 do protocolo experimental e nos dias 19 a 22 foram tratados por via i.n. com MHTP nas doses 2,5 ou 5 mg/kg ou Dexametasona (2 mg/kg). Após cada tratamento, foi realizado os desafios por aerossol com OVA, durante 30 minutos diários; 24 horas após o último desafio, foi coletado o material biológico necessário para avaliação da inflamação pulmonar alérgica, característica da asma alérgica. O tratamento com MHTP na dose de 2,5 mg/kg diminuiu ($p < 0,05$) a migração de linfócitos totais, ($p < 0,0001$) linfócitos CD4⁺ e a produção das citocinas IL-13, IL-4, IL-17 e IL-10. A dose de 5 mg/kg, por sua vez, diminuiu ($p < 0,05$) a produção de IgE-OVA específica e migração de linfócitos CD3⁺; ($p < 0,0001$) migração de leucócitos totais, linfócitos CD4⁺, macrófagos e ($p < 0,001$) eosinófilos; ($p < 0,0001$) o percentual de granulócitos e a produção das citocinas IL-13, IL-4, IL-17 e IL-10. Além disso, MHTP reduziu os parâmetros inflamatórios histopatológicos e morfológicos e a hiperprodução de muco. Os resultados obtidos inferem que o mecanismo imunomodulador do MHTP está relacionado à regulação do perfil Th2, que é responsável por gerar e manter o processo inflamatório alérgico pulmonar, característico da asma alérgica.

Palavras chaves: MHTP; Alcaloide sintético; Inflamação Pulmonar; Asma Th2; Imunomodulação; Instilação nasal.

ABSTRACT

The synthetic alkaloid 2-methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol encoded as MHTP, has a 93.45% yield and it had no genotoxic effect with low acute toxicity in preclinical analyses, with LD50 higher than 1000 mg / kg. The MHTP presented vasorelaxant and anti-inflammatory effects in acute inflammation models by orally administration. The aim of this study was to evaluate the immunomodulatory effect of MHTP, administered intranasally (in) in experimental allergic pulmonary inflammation induced by ovalbumin (OVA) by means of allergic (measurement of serum IgE) and inflammatory parameters (cell migration and production of cytokines, the fluid bronchoalveolar- washed BAL, mucus production and histopathological pulmonary remodeling). Female BALB / c mice were sensitized with OVA at days 0 and 12 of the experimental protocol and on days 19 and 22 were treated via i.n. MHTP with the doses of 2.5 and 5 mg / kg or dexamethasone (2 mg/kg). After each treatment was aerosol challenged with OVA for 30 minutes daily; 24 hours after the last challenge, it was collected biological material for evaluation of allergic lung inflammation characteristic on allergic asthma. Treatment with MHTP at dose of 2.5 mg/kg decreased ($p < 0,05$) the migration of total lymphocytes, ($p < 0,0001$) the lymphocytes CD4⁺ and production of the cytokines IL-13, IL-4, IL-17 and IL-10. The dose of 5 mg/kg, in turn, decreased ($p < 0,05$) the production of OVA-specific IgE and migration of lymphocytes CD3⁺; ($p < 0,0001$) migration of leukocytes, total lymphocytes CD4⁺, macrophages and ($p < 0,001$) eosinophils; ($p < 0,0001$) the percentage of granulocytes; the production of the cytokines IL-13, IL-4, IL-17 and IL-10. In addition, MHTP reduced inflammatory histopathological parameters such as hyperplasia and hypertrophy of goblet cells and mucus overproduction. The results infer that the immunomodulatory mechanism of MHTP is related to regulation of Th2 profile that is responsible for generating and maintaining allergic pulmonary inflammation process characteristic of allergic asthma.

Keywords: MHTP; Synthetic alkaloid; Pulmonary inflammation; Th2 asthma; immunomodulation; Nasal instillation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do MHTP. 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinolina.....	18
Figura 2. Imunomodulação da asma alérgica Th2.	24
Figura 3. Síntese do MHTP.	31
Figura 4. Esquema representativo do protocolo experimental de inflamação pulmonar alérgica induzida por ovalbumina.	33
Figura 5. Esquema representativo da dosagem de IgE OVA-específica pelo método de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA).....	35
Figura 6. Esquema representativo da contagem de células totais e diferenciais. ...	37
Figura 7. Esquema representativo das subpopulações de leucócitos, por tamanho e granularidade celular, após análise por citometria de fluxo.	38
Figura 8. Esquema representativo da quantificação de citocinas pelo Ensaio Imunoenzimático de ELISA sanduíche.	40
Figura 9. Esquema representativo da preparação do corte histológico pulmonar...	42
Figura 10. Efeito do tratamento com MHTP na porcentagem de granulócitos (eosinófilos e neutrófilos) no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.	50
Figura 11. Efeito do tratamento com MHTP na porcentagem de Linfócitos T CD3 ⁺ no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.....	52
Figura 12. Efeito do tratamento com MHTP na porcentagem de Linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.	54
Figura 13. Análise histopatológica inflamatória do MHTP em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica corados pela coloração Hematoxilina-Eosina (HE).	60
Figura 14. Análise histopatológica inflamatória do MHTP em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica corados pela coloração P.A.S. (Ácido Periódico de Schiff).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos na inflamação pulmonar alérgica induzida por Ovalbumina.	34
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1. Efeito do tratamento com MHTP no título de IgE-OVA específica pelo método de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA) na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.....45
- Gráfico 2. Efeito do tratamento com MHTP na migração de leucócitos totais e diferenciais (linfócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos) para o espaço broncoalveolar na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.....47
- Gráfico 3. Percentual de granulócitos (eosinófilos e neutrófilos) no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) após o tratamento com MHTP na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.51
- Gráfico 4. Percentual de Linfócitos T CD3+ no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) após o tratamento com MHTP na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.....53
- Gráfico 5. Percentual de Linfócitos T CD4+ e CD8+ no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) após o tratamento com MHTP na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.55
- Gráfico 6. Efeito do tratamento com MHTP na produção das citocinas IL-13, IL-4, IL-17, IFN- γ e IL-10 no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.57
- Gráfico 7. Score inflamatório do tratamento com MHTP em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica.....61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al(OH)₃	Hidróxido de sódio
AMPc	3,5 - adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de variância
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BALF	Fluido do Lavado Broncoalveolar
CARAS	<i>Combide Asthama and Rinites Syndrome</i>
CD	Célula Dendrítica
CD80	<i>Cluster differentiation</i>
Dexa	Dexametasona
D1	Receptor de Dopamina 1
ECP	Proteína Catiônica Eosinofílica
EIA	Asma Induzida por Exercício
e.p.m.	Erro Padrão da Média
EUA	Estados Unidos da América
FcεRI	Receptor de alta afinidade pela região Fc da imunoglobulina E
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	<i>forward scattered light</i> = difração da luz
GATA 3	Proteína 3 ligante do GATA
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina-eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
i.d.	Intradérmica
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucinas

IL-4R	Receptor da IL-4
i.m.	Intra-muscular
i.n.	Instilação nasal
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
LTh	Linfócitos <i>T</i> helper
LTreg	Linfócitos T regulatórios
MBP	Proteína Básica Principal
MHC-II	Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe II
MHTP	1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4,-tetrahidroisoquinolina
Min	Minutos
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NO	Óxido Nítrico
OVA	Ovalbumina
PAS	Ácido Periódico – Schiff
PCA	Anafilaxia Cutânea Passiva
PE	Ficoeritrina
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
RPM	Rotações Por Minuto
SBM	Membrana Basal Subepitelial
SIH	Sistema de Informações Hospitalares
SSC	<i>side scattered light</i> = difusão da luz
STAT	Sinal de transdução e ativador de transcrição
TGF-β	Fator de transformação de crescimento β
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	O 2-methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol (MHTP)	18
1.2	Inflamação Pulmonar e Asma	19
1.3	Fenótipos da Asma e Imunomodulação	20
1.3.1	Asma alérgica Th2.....	21
1.3.2	Patogênese da Asma alérgica Th2.....	22
1.3.3	Asma não alérgica.....	25
1.3.4	Imunoregulação da Asma	26
1.4	Farmacoterapia da Asma	26
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo geral.....	29
2.2	Objetivos Específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1	Substâncias e sais	30
3.2	Aparelhos e equipamentos.....	30
3.4	Animais	30
3.5	Obtenção e preparo do MHTP	31
3.6	Protocolo Experimental de Inflamação Pulmonar Alérgica induzida por Ovalbumina	32
3.7	Tratamento dos animais	33
3.8	Dosagem do Título de IgE OVA-específica	34
3.9	Células Totais e Diferenciais no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF)	35
3.10	Diferenciação de granulócitos (eosinófilos e neutrófilos) e marcação celular de subpopulações de linfócitos T CD3 ⁺ , CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no BALF.....	38
3.11	Quantificação das citocinas IL-4, IL-13, IL-17, IFN- γ e IL-10 no BALF.....	39
3.12	Histologia Pulmonar	41
3.13	Análise estatística.....	44
4	RESULTADOS	45
4.1	Efeito do MHTP no Título de IgE-OVA específica na inflamação pulmonar alérgica experimental.....	45

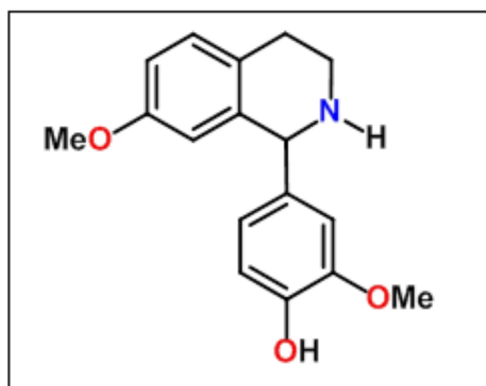
4.2	Efeito do MHTP no número de Células Totais e Diferenciais no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) na inflamação pulmonar alérgica experimental.....	46
4.3	Efeito do MHTP no percentual de granulócitos (eosinófilos e neutrófilos) no BALF na inflamação pulmonar alérgica experimental.....	49
4.4	Efeito do MHTP nas subpopulações de linfócitos T CD3 ⁺ , CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no BALF na inflamação pulmonar alérgica experimental.....	51
4.5	Quantificação das citocinas IL-4, IL-13, IL-17, IFN- γ e IL-10 no BALF na inflamação pulmonar alérgica experimental.....	56
4.6	Efeito do MHTP na análise histopatológica do tecido pulmonar na inflamação pulmonar alérgica experimental corados pela coloração Hematoxilina-Eosina (HE).....	59
4.7	Efeito do MHTP na análise histopatológica do tecido pulmonar na inflamação pulmonar alérgica experimental corados pela coloração P.A.S. (Ácido Periódico de Schiff).....	62
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÃO.....	74
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
APÊNDICES		

1 INTRODUÇÃO

1.1 O 2-methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol (MHTP)

O alcaloide 2-methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol (MHTP) (Figura 1) foi sintetizado com o objetivo inicial de compor o núcleo estrutural de alcaloides isoquinolinicos com estruturas químicas maiores e com propriedades terapêuticas, devido à utilização, histórica, de alcaloides naturais, metabolitos secundários de vegetais e análogos estruturais dos alcaloides sintéticos, no tratamento de diversas doenças (CORDEIRO, 2012).

Figura 1. Estrutura química do MHTP. 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina.



Fonte: CORDEIRO, 2012

O MHTP é um análogo estrutural do alcaloide natural, tetrahydroisoquinolinico carbono-1 substituído, criptostilina II, que assim como as criptostilinas I e III, ambos isolados a partir da planta *Cryptostylis fulva* (Orchidaceae) (LEANDER *et al.*, 1969), possuem atividade biológica de significância considerável. Diversos análogos estruturais das criptostilinas apresentaram atividades farmacológicas, como antagonista do receptor D1 de dopamina (MINOR *et al.*, 1994; MUNCHHOF, MEYERS, 1995) e antagonista da substancia P, neurotransmissor envolvido na transmissão da dor e inflamação neurogênica (FONG *et al.*, 1993).

O rendimento de 93,45% da síntese inédita do MHTP [2-methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol], permitiu o estudo da sua toxicidade aguda pré-clínica em camundongos da linhagem swiss; resultando em baixa toxicidade, sem a presença de atividade genotóxica (PAIVA - FERREIRA, 2014). O tratamento oral com o MHTP nas doses de 2,5 e 5 mg/kg em modelos de inflamação aguda, apresentou uma atividade anti-edematogênica em modelos experimentais de edema de pata induzido por agentes flogísticos. Essa atividade foi independente do processo de desgranulação de mastócitos; entretanto, dependente da redução da migração de células para o peritônio e produção de Óxido Nítrico (NO) (CORDEIRO, 2012; PACHECO DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

1.2 Inflamação Pulmonar e Asma

Atualmente o termo “asma” conota um grupo de sintomas clínicos como falta de ar, chiado e aperto no peito, resultante da limitação do fluxo aéreo expiratório reversível ou hiper-reatividade brônquica, decorrente do processo inflamatório crônico com hiperprodução de muco, remodelamento e estreitamento da parede das vias aéreas (SIMPSON *et al.*, 2010).

Estima-se que cerca de 300 milhões de pessoas no mundo são acometidas de asma, prevendo chegar a 400 milhões em 2025. A mortalidade e morbidade da asma é significativa, onde em 250 mortes no mundo, uma é ocasionada por uma crise asmática. Nos países desenvolvidos, 10% das crianças e 8,33% dos adultos são afetados por essa doença. Nos EUA, o custo médio anual, tanto com os custos médicos diretos como os indiretos devido a perda da produtividade, soma 18 milhões de dólares (LANCET, 2006).

No Brasil, de acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) do Ministério da Saúde e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a asma atinge 6,4 milhões de brasileiros acima de 18 anos, tendo prevalência de 39% a mais nas mulheres. Em 2014 foram diagnosticados com asma cerca de 3,9 milhões de mulheres e 2,4 milhões de homens. Essa doença é responsável por um número representativo de internações hospitalares, de acordo com dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH), no ano de 2014 foram registradas 105,5 mil

internações pela doença, originando um custo de R\$ 57,2 milhões para a rede pública de saúde brasileira (BRASIL, 2015).

A particularidade das características clínicas, fisiológicas e resposta a terapia medicamentosa da asma vem a definir seus diferentes fenótipos (LANCET, 2006).

1.3 Fenótipos da Asma e Imunomodulação

O fenótipo da asma é classificado como sendo as características clínicas de um indivíduo decorrente da interação do genótipo com fatores ambientais, o “*endotype*” é a via de sinalização celular que promove o fenótipo (ANDERSON, 2008; LOTVALL *et al.*, 2011). Para se definir um fenótipo é necessário caracterizar a patofisiologia, clínica, biomarcadores, genética e uma resposta à terapia medicamentosa (LOTVALL *et al.*, 2011).

No período compreendido entre a década de 1990 e ano 2000, a fim de entender e descrever o mecanismo imunomodulador da asma, foi identificado o papel essencial dos linfócitos *Helper 2* (Th2) e outros elementos imunes, na gênese e manutenção do processo inflamatório das vias aéreas e na hiper-reatividade brônquica. Em decorrência destes estudos, a asma foi então classificada como uma doença alérgica eosinofílica mediada por Th2 e responsiva a terapia com corticoides (BORISH *et al.*, 1999; LECKIE *et al.*, 2000; FLOOD-PAGE *et al.*, 2007). Concomitante, em estudos realizados observou-se, em grupos de asmáticos, um perfil de resposta patológico distinto do padrão descrito (SOLÉR *et al.*, 2001; BUSSE *et al.*, 2001). A “asma” então passou a deixar de ser uma única doença e começou a ser estudada como um conjunto de fenótipos (WENZEL, 2012).

Atualmente a divisão mais aceita dos fenótipos da asma, compreende na subdivisão em Asma Alérgica tipo 2 (Th2) e Asma não alérgica. A Asma Alérgica Th2 está presente nos fenótipos: início precoce; início tardio e Asma Induzida por Exercício (EIA). A Asma não Th2 é representada pelos fenótipos: relacionada a obesidade e asma neutrofílica (WENZEL, 2012).

1.3.1 Asma alérgica Th2

Os fenótipos da asma alérgica: com início precoce (até a pré-adolescência), com início tardio (após os 20 anos) e a Asma Induzida por Exercício (EIA) apresentam uma imunomodulação conjunta do perfil Th2, com consequente produção de Imunoglobulina E- alérgeno específica (IgE) e sinalização das citocinas clássicas do perfil: IL-4, IL-5 e IL-13; eosinófilos e mastócitos (WENZEL, 2012).

Adultos que desenvolveram a asma desde a infância (início precoce) em sua maioria são diagnosticados como asma alérgica tipo 2 (Th2) devido a presença de um quadro atópico com produção de Imunoglobulina E (IgE) - alérgeno específica. Todavia, a resistência, desses pacientes, a terapia com corticoides e concentrações séricas baixas de IgE sugerem que nem toda asma de início precoce está associada a resposta Th2 (FITZPATRICK *et al.*, 2011).

A asma de início precoce está intimamente relacionada a presença de outras doenças atópicas como rinite alérgica e dermatite atópica (MOORE *et al.*, 2010). Uma média de 80% dos pacientes diagnosticados com asma alérgica apresentam também um quadro de rinite alérgica, provocando um quadro patológico denominado de “doença das vias aéreas unidas” ou “síndrome da asma e rinite alérgica combinada CARAS (*combine asthma and rinitis syndrome*)”, no qual propõe que essas doenças são derivadas do mesmo mecanismo imunopatológico e que ambas influenciam a gravidade uma da outra (WOODRUFF *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2014).

O diagnóstico de alergia é dado a partir da presença sérica de IgE e/ou positividade do teste cutâneo para proteínas de alérgenos inalados, como de ácaros presentes na poeira doméstica, de pêlos de animais, de esporos de fungos, de pólen de árvores e de amendoim; processo resultante da sensibilização do organismo ao alérgeno (SIMPSON *et al.*, 2010). As concentrações de IgE total e alérgeno específicas são mais elevadas na asma de início precoce do que na de início tardio (HUMBERT *et al.*, 1996). Estudos para avaliação dos fenótipos clínicos demonstraram uma forte influência hereditária e genética para este fenótipo de asma Th2 (MOORE *et al.*, 2010). Os genes associados ao perfil imune Th2 envolvendo os das citocinas IL-4, IL-13, IL-4R α e do fator de transcrição GATA 3 apresentam maior

mutação neste fenótipo e o grau de mutação está intimamente relacionado a severidade da asma (SLAGER *et al.*, 2011).

A caracterização da asma eosinofílica é determinada pelo aumento de eosinófilos na expectoração, broncoscopia ou sérico (GREEN *et al.*, 2002). A eosinofilia está intimamente relacionada com uma espessa membrana basal subepitelial (SBM) e alta expressão de TGF- β (MIRANDA *et al.*, 2004). Alguns asmáticos apresentam além de eosinofilia, neutrofilia na expectoração, ocasionando um processo inflamatório misto, demonstrando interações entre a ativação de outras vias imunológicas como o perfil imune Th17 com produção de IL-17 e o perfil imune Th2 (DOE *et al.*, 2010).

Os quadros de crise asmática induzida por exercícios físicos, geralmente se desenvolvem após o exercício físico em condições frias e secas. Todavia, a sua imunoregulação ainda não foi elucidada, sabe-se apenas que decorre de processos Th2, inflamação eosinofílica e ativação de mastócitos e seus mediadores. Este fenótipo tem maior prevalência em atletas atópicos (HALLSTRAND *et al.*, 2005).

1.3.2 Patogênese da Asma alérgica Th2

O parâmetro essencial de identificação do perfil Th2 no processo inflamatório pulmonar decorrente da asma é a dosagem das citocinas IL-4, IL-13 e IL-5, produzidas pelas células T CD4⁺, bem como a presença de uma eosinofilia sanguínea e tecidual (ROBINSON *et al.*, 1992).

O aumento sérico de IgE caracteriza uma atopia (predisposição genética para desenvolver alergias) e é considerada a marca da imunidade adaptativa Th2, esta é produzida pelos plasmócitos que são células B ativadas devido a sinalização celular mediada por IL-4, a qual propicia a troca de isotipo de imunoglobulinas para a IgE (CHENG *et al.*, 2014). Essa imunoglobulina se ligará aos seus receptores de alta afinidade do tipo Fc ϵ RI presentes nas membranas de mastócitos, basófilos e eosinófilos (WILLIAMS , GALLI, 2000). A inflamação pulmonar característica da asma alérgica tipo 2 (Th2) é dependente da sensibilização dessas células pela IgE e posterior desgranulação com liberação de mediadores vasoativos (COSTA *et al.*, 2008)

No contato posterior ao processo de sensibilização com o alérgeno (desafio) ocorrerá ligações cruzadas entre o alérgeno, a IgE e seu receptor membranar FcεRI que promoverá o mecanismo de desgranulação e liberação de mediadores vasoativos pré-formados, como a histamina, e neoformados, como leucotrienos e prostaglandinas, onde estes mediadores promovem a broncoconstrição e vasodilatação colaborando assim para a formação do processo inflamatório pulmonar (EDWARDS *et al.*, 2012).

Os mecanismos moleculares e celulares envolvidos no processo de sensibilização de um indivíduo a um determinado alérgeno se procede da seguinte maneira: no contato inicial do alérgeno com o organismo atópico, as células apresentadoras de antígeno, em especial, as células dendríticas (CDs) fagocitam, processam e apresentam peptídeos do alérgeno via moléculas codificadas pelos gens do Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe II (MHC-II) e moléculas coestimulatórias, como CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) aos linfócitos T auxiliares indiferenciados (L*Helper* – Th0) (EDWARDS *et al.*, 2012).

Devido a apresentação antigênica, os linfócitos Th0 diferenciam-se em Th2 (LLOYD , HESSEL, 2010) (Figura 2) capazes de produzir citocinas do perfil de resposta imune tipo 2 (IL-4, IL-13 e IL-5). A ligação das moléculas coestimulatórias à molécula CD28 dos linfócitos Th0 induz a expressão do fator GATA3, principal regulador Th2 (RODRIGUES-PALMERO *et al.*, 1999). Este fator é essencial na transcrição das citocinas clássicas do perfil Th2, as quais regulam a patogênese do processo inflamatório crônico pulmonar, característico da asma Th2.

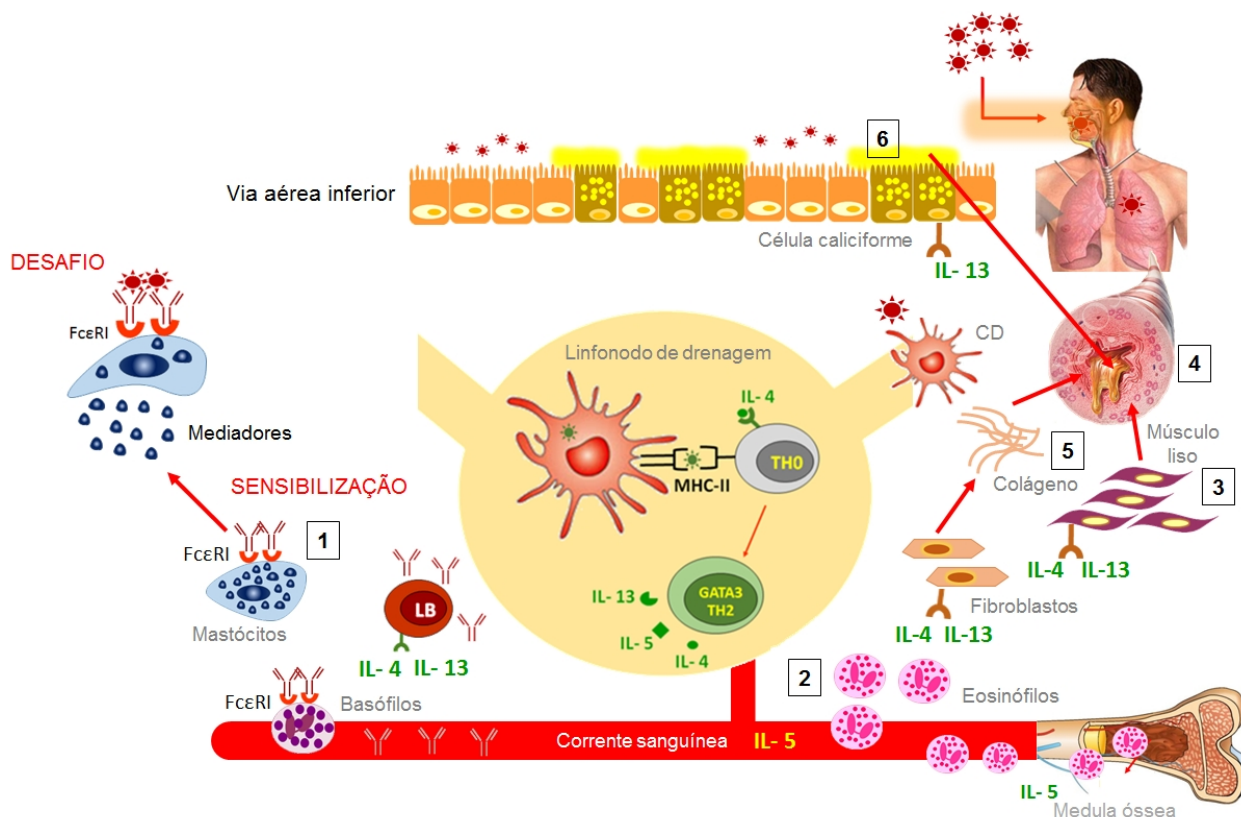
A IL-4 é essencial para a proliferação e manutenção do perfil de resposta imune adaptativa Th2, produção da imunoglobulina E (IgE) e participa do processo de migração de eosinófilos do vaso sanguíneo para o tecido. Sendo assim, a imunomodulação do perfil Th2 na asma é dependente da presença de IL-4 (BRUSSELLE *et al.*, 1994; CORRY *et al.*, 1995).

A IL-13 participa do processo de hiper-reatividade brônquica, hiperplasia, hipertrofia e metaplasia das células caliciformes, esse processo leva a diferenciação das células epiteliais a produzirem muco espesso contendo as mucinas MUC5AC e MUC5BC, causando obstrução do lúmen das vias aéreas (WILLS-KARP *et al.*, 1998).

A eosinofilia característica do processo inflamatório pulmonar é decorrente da ação da IL-5, a qual participa do processo de maturação desses leucócitos na medula óssea. O recrutamento de eosinófilos para o tecido pulmonar e mucosa

intersticial decorre da atuação de quimiocinas, como eotaxina 1, 2 e 3 (CCL11, CCL24 e CCL26, respectivamente). Substâncias liberadas dos eosinófilos após sua ativação e citólise, como a proteína catiônica eosinofílica (ECP) e proteína básica principal (MBP) que podem causar diretamente a hiper-reatividade brônquica devido a danificação local das células do tecido pulmonar (COYLE *et al.*, 1994; COYLE *et al.*, 1995; YOUSEFI, SIMON, 2012). Os eosinófilos ainda apresentam a capacidade de apresentar os antígenos aos linfócitos T (VAN *et al.*, 2003). Na Figura 2 está representada, de forma sucinta, a imunomodulação da asma alérgica Th2.

Figura 2. Imunomodulação da asma alérgica Th2.



O alérgeno, ao entrar em contato com a via aérea inferior, é fagocitado pela célula dendrítica (CD) e esta se encaminha para o linfonodo de drenagem local, onde ocorre a apresentação antigênica ao linfócito Th0, o qual se diferencia em Th2, produtor das citocinas IL-4, IL-13 e IL-5. Essas citocinas imunomodulam a imunidade celular Th2, ocasionando a inflamação pulmonar crônica alérgica, devido a sensibilização por IgE (1); migração eosinofílica (2); hipertrofia e hiperplasia de células musculares lisas (3), com hiperreatividade brônquica (4); remodelamento da via aérea, com deposição de colágeno na camada subepitelial (5); hipertrofia e hiperplasia das células caliciformes com o aumento da produção de muco (6); obstrução do fluxo aéreo e manutenção do perfil Th2 (4). Fonte: (PAIVA-FERREIRA, 2016).

1.3.3 Asma não alérgica

A resistência de um grupo de asmáticos ao tratamento com terapias tendo como alvo o perfil Th2 e corticoides, aliada a outros mecanismos que contribuem para a hiper-reatividade brônquica, foram responsáveis por definir uma outra subdivisão de asma, sendo, portanto, independente da ativação do perfil Th2 (FLOOD-PAGE *et al.*, 2007).

A obesidade vem corroborando com um papel importante no desenvolvimento, controle e gravidade da asma, sendo este parâmetro avaliado como um fator de desenvolvimento, bem como um fator de morbidade desta doença. De fato, a obesidade está associada a um maior gasto energético no momento da respiração; des-condicionamento; falta de ar; vulnerabilidade de refluxo gastroesofágico os quais estão associados aos sintomas clássicos da asma: tosse e aperto no peito (NILSSON *et al.*, 2003; PAKHALE *et al.*, 2010). A obesidade ainda está associada a um estado pró-inflamatório geral com alta expressão dos mediadores inflamatórios TNF- α e IL-6, e ainda participa da diminuição da resposta a corticoterapia (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993).

O fenótipo classificado como asma neutrofílica é caracterizado pela neutrofilia presente em asmáticos resistentes ao tratamento com corticoide, uma vez que essa classe medicamentosa, inibi a apoptose dos neutrófilos, contribuindo assim, com a permanência dessa célula no tecido pulmonar (KATO *et al.*, 1995). A neutrofilia pulmonar está associada a diminuição da função desse órgão, com um maior aprisionamento de ar e dificuldade de expiração devido a um maior espessamento das paredes das vias aéreas e maior expressão de metaloproteinases, caracterizando a hiper-reatividade brônquica nos asmáticos não alérgicos (SIMPSON *et al.*, 2005).

O perfil de células TCD4⁺ denominadas de Th17 está diretamente relacionado a inflamação pulmonar característica pela asma neutrofílica e vem sendo estudado no intuito de se definir um alvo molecular e/ou celular terapêutico (MCKINLEY *et al.*, 2008; LAJOIE *et al.*, 2010). A expressão das citocinas IL-17A e IL-17F está aumentada na asma severa resistente a corticoide onde observa-se diminuição da função pulmonar devido a capacidade de causar contração direta das células

musculares lisas dos brônquios, assim levando a uma hiper-reatividade brônquica (DOE *et al.*, 2010).

1.3.4 Imunoregulação da Asma

As células do sistema imune que regulam negativamente o processo inflamatório das vias aéreas característico da asma são as células T regulatórias (Treg) devido ao seu papel supressor dos outros perfis de células T CD4⁺, tais como: Th2 e Th17 pela produção e liberação das citocinas IL-10 e TGF- β (BARNES, 2008).

As células T CD8⁺ também desempenham um papel imunoregulador no processo inflamatório das vias aéreas na asma alérgica devido a inibição do processo de sensibilização do organismo para alérgenos, atenuando a resposta Th2 via inibição da produção de IgE e produção da citocina IFN- γ , a qual, está envolvida na alteração da capacidade das células dendríticas pulmonares (DCs) durante a apresentação antigênica polarizar os linfócitos T CD4⁺ para o fenótipo Th1 (TANG *et al.*, 2012). A depleção dos linfócitos T CD8⁺ está envolvida com o aumento dos níveis séricos de IgE alérgeno - específica, remodelamento e hiper-reatividade das vias aéreas (STOCK *et al.*, 2004; TSUCHIYA *et al.*, 2009).

Outra população de célula T capaz de imunomodular a resposta imune tipo 2 (Th2) na asma é o perfil de resposta imune Th1 com a produção principalmente de IFN- γ , IL-2 e TNF- β . O IFN- γ antagoniza a formação do fator de transcrição GATA 3 responsável pela geração das células Th2. Estudos tem mostrado que o processo inflamatório da asma pode ser suprimido pela transferência de células Th1 ou mesmo pela administração de IL-12, citocina responsável pela ativação do fator de transcrição Tbet que induz a produção das citocinas (IFN- γ , IL-2 e TNF- β) detectadas no perfil de resposta Th1 (GAVETT *et al.*, 1995).

1.4 Farmacoterapia da Asma

O tratamento para a inflamação pulmonar característica da asma baseia-se na administração de classes terapêuticas que visam o controle da resposta imunológica, sendo os corticoides a classe mais utilizada; e o alívio dos sintomas da hiper-

reatividade brônquica, onde os agonistas β 2-adrenergicos são os medicamentos de escolha (HOLGATE , POLOSA, 2008).

Os corticoides administrados por via inalatória são classificados como os agentes anti-inflamatórios de maior impacto no tratamento do processo inflamatório crônico das vias aéreas presentes na asma. O tratamento com corticoide promove o alívio dos sintomas como a melhora do fluxo aéreo e diminuição da hiper-reatividade brônquica (BARNES, 1995).

Os corticoides participam da modulação de eosinófilos, que sofrem apoptose (WOOLLEY *et al.*, 1996), de citocinas Th2 e do processo inflamatório associado. Suprimem a produção e expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. O mecanismo de ação dessa classe terapêutica envolve a sua difusão através da membrana plasmática e a interação com receptores de glicocorticóides no citoplasma, induzindo ativação destes receptores e migração para o núcleo, onde eles modulam a atividade de genes alvos, incluindo os codificantes dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1, responsáveis pela ativação da transcrição de mediadores inflamatórios (BARNES, ADCOCK, 2003). Todavia, seu efeito é amplo e inespecífico (MANEECHOTESUWAN *et al.*, 2009). O uso contínuo dessa classe terapêutica desencadeia efeitos colaterais graves devido a alteração endócrina e imunológica sistêmica (DEL, 2006).

Os broncodilatadores agonistas β 2-adrenergicos são subdivididos em: os de ação longa e os de ação curta, onde a duração da sua ação é em torno de 12 a 24 horas e de 6 horas, respectivamente. O mecanismo de ação dos broncodilatadores se dá pela sua ligação aos receptores β 2-adrenergicos, os quais ativam a proteína sinalizadora de transdução (Gs) com consequente ativação da ciclase de adenilil, aumento na produção de 3,5 adenosina monofosfato cíclica (AMPc) e consequente ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA), a qual vai levar ao relaxamento muscular das vias aéreas por fosforilação da cadeia leve de miosina e abertura dos canais de Ca^{2+} dependente de K^+ (KCa), aliviando a broncoconstrição na asma (HOLGATE , POLOSA, 2008). No entanto cerca de 5 a 10% dos asmáticos apresentam resistência ao tratamento com corticoide e associado a internações hospitalares devido a infecção viral respiratória causada por rinovírus (SIMPSON *et al.*, 2010).

Outras classes medicamentosas são utilizadas no auxílio da terapia com corticoides e agonistas β 2-adrenergicos, como os antagonistas de leucotrienos, metilxantinas, inibidores da fosfodiesterase (MATHEW *et al.*, 2012) e imunoterapia, que se baseia em alvos moleculares específicos, como alvos componentes da via Th2, por exemplo, anticorpos contra a IgE; IL-4R e IL-13, inibidores dos fatores de transcrição de células Th2, STAT 6 e GATA 3, são estratégias utilizadas na imunomodulação do perfil Th2 na asma Th2 (FAHY *et al.*, 1997; WENZEL *et al.*, 2007; GAUVREAU *et al.*, 2011).

O tratamento com medicamentos por via inalatória para o controle do processo inflamatório crônico pulmonar é o de escolha devido à grande área de absorção pulmonar e sua alta vascularização. A absorção evita o metabolismo hepático de primeira passagem, promove um aumento da deposição do fármaco no pulmão e, reduz a concentração sistêmica da droga com conseqüente redução dos possíveis efeitos colaterais. A instilação nasal é um método de tratamento prático e de fácil acessibilidade promovendo diminuição dos efeitos sistêmicos secundários e toxicidade, e assim, melhorando a qualidade de vida do paciente (DUGAS *et al.*, 2013).

O tratamento por instalação nasal de alcaloides naturais isoquinolinicos (warifteina, metilwarifteina e milonina) da planta *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menisoermaceae) em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica característica da asma alérgica tipo 2 (Th2) demonstrou atividade anti-inflamatória e conseqüente melhoria dos parâmetros histopatológicos da asma (VIEIRA, 2013). Devido ao avanço nos estudos da via respiratória como via de administração terapêutica em doenças pulmonares, esse trabalho propôs averiguar o efeito imunomodulador do tratamento por instilação nasal com o alcaloide MHTP, um alcaloide isoquinolinico sintético, em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito imunomodulador do MHTP, administrado por instilação nasal, na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Quantificar o título de IgE-OVA específica nos soros dos animais dos diferentes grupos experimentais;
- ✓ Avaliar a migração de Células Totais e diferenciais (Linfócitos, Macrófagos, Eosinófilos e Neutrófilos) no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos diferentes grupos de animais experimentais;
- ✓ Averiguar a presença de diferentes subpopulações de células T no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos diferentes grupos de animais experimentais;
- ✓ Quantificar a produção de citocinas IL-13, IL-4, IL-17, IFN- γ e IL-10 no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos diferentes grupos de animais experimentais;
- ✓ Demonstrar os parâmetros histopatológicos característicos do modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica induzida por Ovalbumina pela migração de leucócitos para o espaço perivascular e peribroncoalveolar; pela vasodilatação; integridade epitelial; oclusão alveolar; hiperplasia e hipertrofia das células caliciformes e hiperprodução de muco.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Substâncias e sais

A lista das substâncias utilizadas encontra-se no apêndice A.

3.2 Aparelhos e equipamentos

A lista de aparelhos e equipamentos utilizados encontra-se no apêndice B.

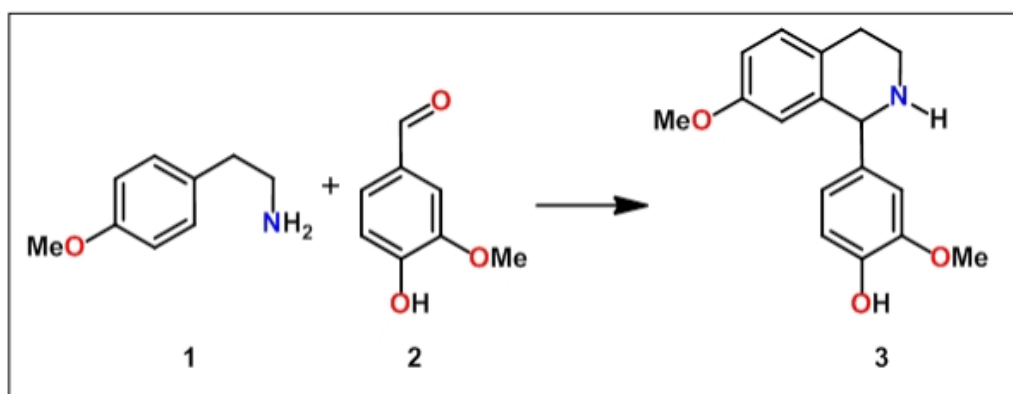
3.4 Animais

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c fêmeas com idade entre 6-8 semanas, pesando de 20 a 25g e ratas Wistar, pesando de 120 a 150g foram utilizados na metodologia experimental de inflamação pulmonar alérgica induzida por Ovalbumina. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de 25 ± 2 °C, em ciclos de claro e escuro de 12 horas (6h00 as 18h00 claro e de 18h00 as 6h00 escuro) com livre acesso à água (autoclavada) e a uma dieta controlada, a base de ração do tipo *pellets* (PURINA) durante todo o período de experimentação. Cada grupo experimental compreendeu 6 animais. Para avaliação da reprodutibilidade dos resultados foram realizadas três repetições de cada protocolo experimental. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), além de observar as exigências dispostas na Lei nº11794/2008. A eutanásia e a anestesia dos animais foram realizadas pela administração intra-muscular (i.m.) de solução anestésica contendo 29 mg/mL de cetamina e 1,91 mg/mL de xilasina em solução salina (NaCl 0,9%). Os animais utilizados nesse trabalho foram fornecidos pelo biotério Prof. Dr. Thomas George do IPeFarM/UFPB. Os procedimentos experimentais desse trabalho foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA/UFPB) sob a certidão nº 3105/14.

3.5 Obtenção e preparo do MHTP

A síntese do alcaloide tetrahydroisoquinolínico carbono 1- substituído, 2-methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol (MHTP) foi realizada no Centro de Biotecnologia, UFPB sob a orientação do Prof. Dr. Luís Cezar Rodrigues. A metodologia de obtenção e caracterização química do MHTP está disponível no trabalho de dissertação intitulado “Aplicação da reação de *Pictet–Spengler* na síntese de alcaloides fenil tetra hidroisoquinolínicos inéditos” (2012) do Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos/CCS/UFPB, João Pessoa, PB. Em resumo, para a realização da síntese do MHTP se fez necessário a utilização de dois reagentes, a 4-metoxifeniletilamina (1) e a vanilina (2), aplicando a reação de *Pictet–Spengler* (Figura 3). Ao ser concluída a reação, foi obtido 3,5 g do MHTP, com fórmula molecular $C_{17}H_{19}NO_3$ e massa molecular 285 g/mol, obtendo um rendimento de 93,45%, sendo caracterizado como um líquido oleoso viscoso amarelado, cristalizando-se ao ser armazenado na geladeira (CORDEIRO, 2012).

Figura 3. Síntese do MHTP.



Fonte: CORDEIRO, 2012.

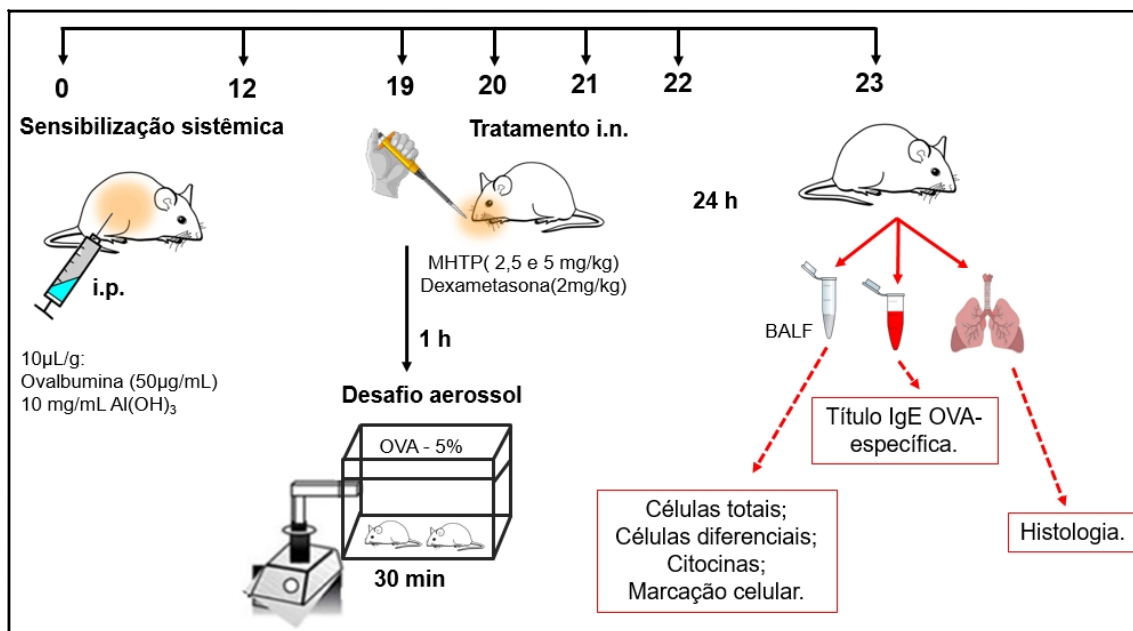
A suspensão de MHTP, para administração de 40 μ L por animal, na dose de 5 mg/kg foi preparada utilizando a concentração de 3,125 mg/mL de MHTP em 100 μ L de Ácido Clorídrico (HCl) 1N e em seguida foi adicionado 500 μ L de solução salina. O pH foi ajustado para 7 com hidróxido de sódio (NaOH) 1N e o volume completado para 1000 μ L. Para a administração do MHTP na dose 2,5 mg/kg foi retirado um

volume da suspensão de 5 mg/kg e adicionado salina para a concentração de 1,563 mg/mL de MHTP.

3.6 Protocolo Experimental de Inflamação Pulmonar Alérgica induzida por Ovalbumina

O modelo de inflamação pulmonar alérgica induzida por Ovalbumina (OVA) desenvolvido, foi adaptado do protocolo experimental de Lloyd e colaboradores (2000). Nos dias 0 e 12 do protocolo, os camundongos BALB/c fêmeas foram sensibilizados com a injeção de 10 μ L/g via intraperitoneal (i.p.) de uma suspensão contendo 50 μ g/mL de OVA grade V (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) e 10 mg/mL de Al(OH)₃ (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) em solução salina. No período compreendido entre os dias 19 a 22 do protocolo experimental, os animais foram desafiados diariamente com aerossol de OVA grade II (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) a 5% em solução salina. Cada desafio foi realizado durante 30 minutos diários em uma câmara fechada, sob um fluxo contínuo de aerossol, com o auxílio de um nebulizador ultra-sônico, 1 hora depois do tratamento diário. No dia 23 do protocolo experimental, 24 horas após o último desafio, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica, como descrito no item (3.2.1 Animais), e posteriormente foram coletados os materiais biológicos: sangue, utilizado para extração do soro e dosagem do Título de IgE-OVA específica; Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF), para quantificação de citocinas (sobrenadante), contagem de células e marcação celular (*pellet*); tecido pulmonar, para avaliação histopatológica (infiltrado celular e avaliação da estrutura tecidual, hiperplasia das células caliciformes e hiperprodução de muco). O esquema do protocolo experimental de inflamação pulmonar alérgica induzida por Ovalbumina está representado na figura 4.

Figura 4. Esquema representativo do protocolo experimental de inflamação pulmonar alérgica induzida por ovalbumina.



3.7 Tratamento dos animais

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais (n=6), o grupo Basal representa animais saudáveis (não sensibilizado com OVA), que expressam os níveis imunológicos basal; o grupo OVA (sensibilizado com OVA), representa animais doentes, que apresentam alterações imunológicas devido a um quadro alérgico inflamatório pulmonar. O grupo MHTP representa os animais sensibilizados com OVA e tratados com o MHTP em duas doses 2,5 ou 5 mg/kg, por fim o grupo Dexa representa os animais sensibilizados com OVA e tratados com uma droga padrão, utilizada na clínica para o controle terapêutico de doenças inflamatórias pulmonares alérgicas como a asma, a Dexametasona (2 mg/kg) (DECADRON, Achê®, fosfato dissódico de dexametasona diluído em salina para concentração de 1,25 mg/mL). Os grupos basal e OVA receberam o veículo (salina) durante os tratamentos, afim de ser avaliado o papel deste em detrimento ao MHTP. Todos os grupos foram tratados com 40 µL via instilação nasal (i.n.) através de gotejamento nas narinas até total absorção (PELLATON-LONGARETTI *et al.*, 2010) após os animais estarem anestesiados. O tratamento ocorreu 1 hora antes do desafio com aerossol de OVA, e este se repetiu 4 dias seguidos (do dia 19 ao dia 22 do protocolo

experimental). Na tabela 1 indica os tratamentos e desafios dos grupos experimentais para melhor compreensão.

Tabela 1. Tratamentos na inflamação pulmonar alérgica induzida por Ovalbumina.

Grupos	Sensibilização	Tratamento	Desafio
Basal	Salina	Salina (i.n.)	Salina
OVA	OVA	Salina (i.n.)	OVA
MHTP 2,5	OVA	MHTP 2,5mg/kg (i.n.)	OVA
MHTP 5	OVA	MHTP 5mg/kg (i.n.)	OVA
Dexa	OVA	Dexametasona 2mg/kg (i.n.)	OVA

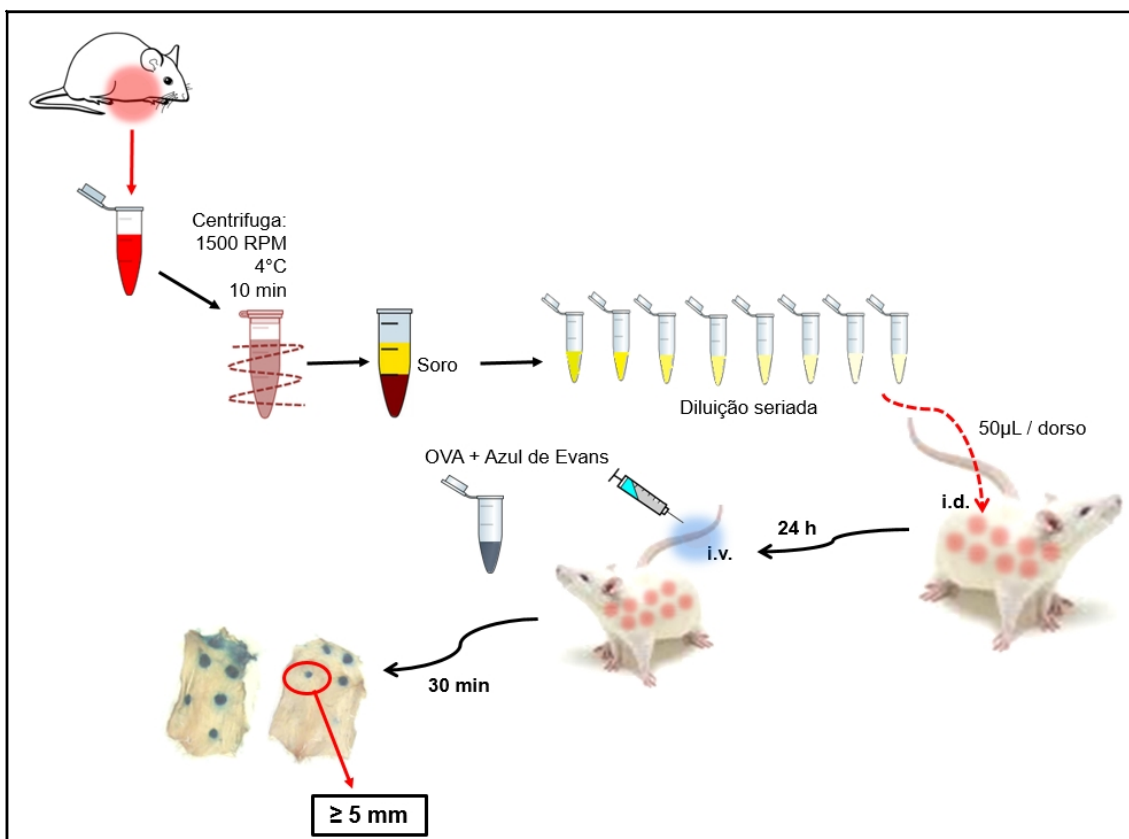
3.8 Dosagem do Título de IgE OVA-específica

O título de IgE OVA-específica foi determinado pelo teste de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA). Inicialmente 24 horas após o último desafio, no dia 23 do protocolo experimental. Os animais foram anestesiados e então realizada assepsia com álcool 70% em seguida o plexo braquial foi exposto com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica e foi coletado cerca de 0,5 a 1mL de sangue com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, esse foi armazenado em tubos do tipo *ependorf* inclinados a 45° e estocados em geladeira por cerca de 4 horas, para facilitar formação dos coágulos e coleta dos soros, realizada após a centrifugação do sangue em 1500 RPM a 4°C por 10 minutos. Os soros foram armazenados a -20°C para serem utilizados no PCA.

Os soros armazenados foram diluídos em salina. Para cada amostra foi realizada oito diluições seriadas (1:64; 1:128; 1:256; 1:512; 1:1.024; 1:2.048; 1:4.096 e 1:8.192) e um volume de 50 µL dessas amostras foi injetado por via intradérmica (i.d.) em oito diferentes sítios do dorso de ratas Wistar depiladas e previamente anestesiadas. Após 24 horas, foi realizado o desafio antigênico nas caudas das ratas pela administração intravenosa (i.v.) de 0,5 mL/animal na veia da cauda de uma solução contendo 10 mg/mL do corante Azul de Evans a 1% (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) e 4 mg/mL de OVA grade V. Após 30 minutos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e os diâmetros das manchas formadas no dorso foram medidas com o auxílio de uma régua milimétrica de 20cm. O título foi determinado

pela maior diluição do soro capaz de promover uma mancha mensurável ≥ 5 mm (COSTA *et al.*, 2008). A Figura 5 demonstra esquematicamente a dosagem do Título de IgE-OVA específica.

Figura 5. Esquema representativo da dosagem de IgE OVA-específica pelo método de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA).



3.9 Células Totais e Diferenciais no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF)

Para quantificação do número total das células e do número de células diferenciais, 24 horas após o último desafio, ocorrido no dia 22 do protocolo experimental, os animais foram anestesiados, após esse procedimento foi coletado o sangue pelo plexo braquial, em seguida a traqueia foi exposta com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica, para maior visualização dessa estrutura os lobos da glândula tireoide foram retirados e então foi inserido um cateter periférico IV-18G de poliuretano (Descarpac) para a coleta do BALF. No cateter foi conectada uma seringa contendo 1 mL de HBSS^{-/-} gelado, este foi administrado na traqueia sentido

pulmão. Inicialmente foi injetado apenas 0,5 mL de HBSS^{-/-} gelado, aguardou-se um tempo de 10 segundos e então foi aspirado o mesmo volume, finalizando a primeira lavagem, em seguida foi injetado todo o volume de HBSS^{-/-} gelado contido na seringa de 1 mL, após 10 segundos foi aspirado, sendo realizado a segunda lavagem, o BALF coletado foi transferido para um tubo tipo *eppendorf* e armazenado no gelo, para preservar a viabilidade celular. Em seguida uma nova seringa foi conectada ao cateter e foi injetado mais 0,5 mL de HBSS^{-/-} gelado, repetindo a espera de 10 segundos e aspirando todo o BALF contido no pulmão, realizando assim três lavagens, o BALF foi transferido para o mesmo tubo *eppendorf*, totalizando o BALF com 1,5 mL de HBSS^{-/-} gelado.

Uma alíquota do BALF (10 µL) foi retirada e adicionada, na proporção 1:4, a 30 µL de solução de Turk (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), que devido a sua ação hemolítica, lisa as hemácias e cora os leucócitos do BALF. Foi então retirado uma alíquota de 10 µL da solução de Turk com BALF e levada a câmara hemocitométrica (Neubauer), sendo realizada a contagem das células totais no microscópio óptico (40 X - BX40, OLYMPUS) (Figura 6). A equação 1 demonstra o cálculo que baseia os resultados das células totais, onde: N é o número de Células Totais do BALF, C é o número de Campos da Câmara Hemocitométrica (CH), n é o número de Células Contadas na CH, e F é o Fator de Diluição do BALF.

$$N = \frac{C \cdot n}{F} = \frac{4 \cdot 10}{4} \quad (1)$$

Após a contagem das células totais ser realizada, o BALF foi centrifugado (centrífuga CR422, JONAM) em 1000 RPM a 4°C por 5 minutos. Os sobrenadantes foram retirados e congelados à -20°C para posterior dosagem de citocinas (BEZERRA-SANTOS *et al.*, 2006).

O *pellet* do BALF foi ressuspenso em 500µL de HBSS^{-/-} gelado e homogeneizado, em seguida foi retirado 200 µL do BALF e centrifugado na citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método panótico (Kit Panótico, Renylab), o qual se baseia em três passos principais: a fixação das células na lâmina por ação de um fixador, um

corante básico cora de azul estruturas ácidas como o núcleo das células, e um corante ácido cora de rosa estruturas celulares básicas como o citoplasma, então esses contrastes de coloração celular proporciona uma visualização e contagem diferencial de células realizada por microscopia óptica.

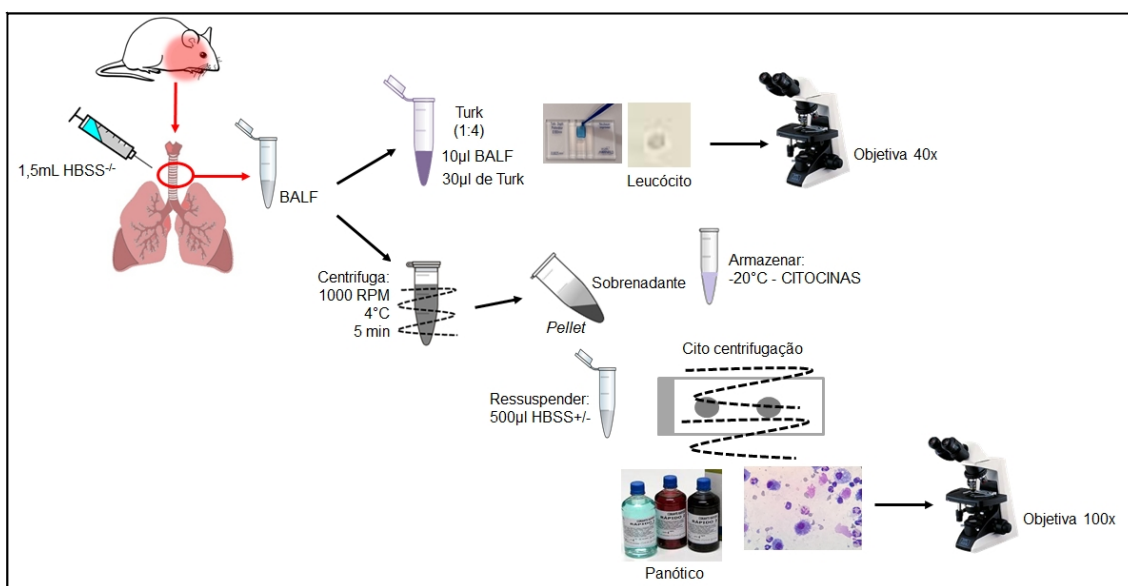
Cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células, utilizando para isso a objetiva de imersão (100X), os leucócitos contados foram divididos em quatro subpopulações: linfócitos; macrófagos; eosinófilos e neutrófilos (Figura 6).

A equação 2 demonstra o cálculo que baseia os resultados das células diferenciais, onde: ' ' é a População de leucócitos (linfócitos; macrófagos; eosinófilos e neutrófilos), é o número calculado de Leucócitos Diferenciais do BALF, é o número de Leucócitos Diferenciais Contados de uma População, é o número Total de Leucócitos diferenciais.

$$, = \frac{,}{,} = \frac{,}{100}$$

2

Figura 6. Esquema representativo da contagem de células totais e diferenciais.

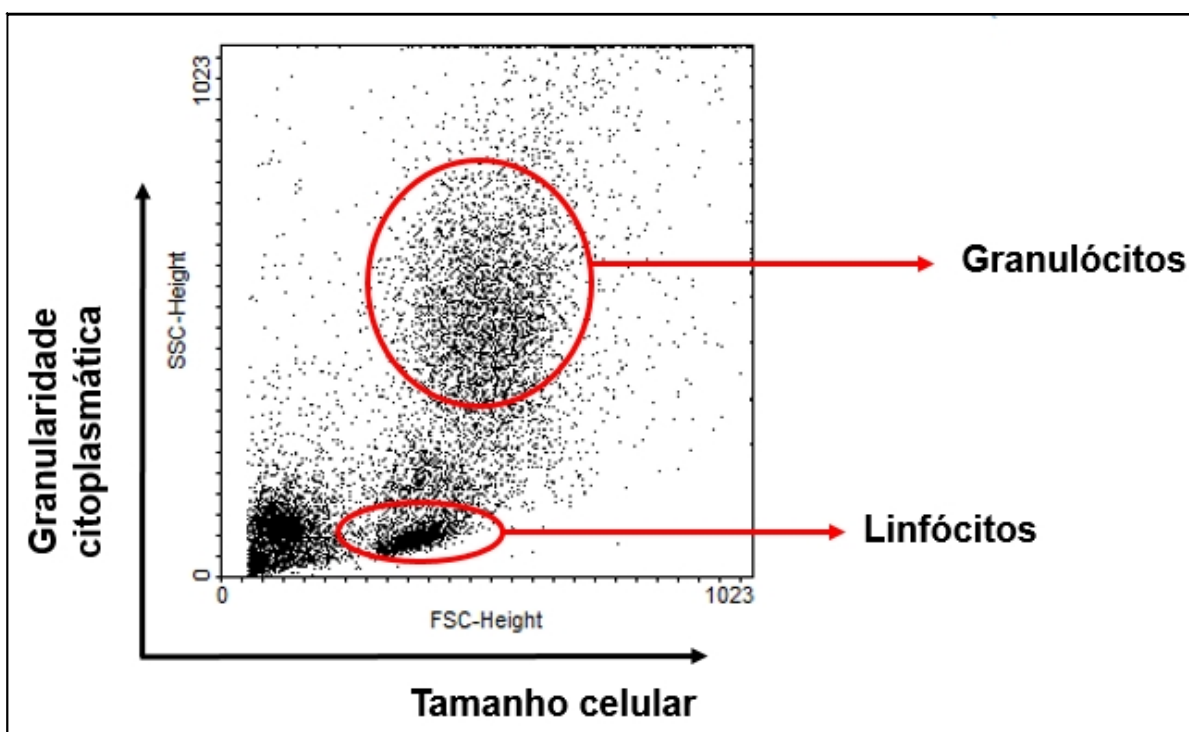


3.10 Diferenciação de granulócitos (eosinófilos e neutrófilos) e marcação celular de subpopulações de linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ no BALF

Afim de avaliar uma determinada subpopulação celular é realizada uma marcação celular utilizando a técnica de citometria de fluxo, na qual tem a capacidade de contar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo, analisando características físicas e/ou químicas de uma célula utilizando um aparelho de detecção óptico-eletrônico, o citômetro.

A distinção de populações celulares heterogêneas através da análise por citometria de fluxo é permitida através da avaliação dos parâmetros “*forward scattered light*” (FSC) e “*side scattered light*” (SSC), os quais distinguem as células pelo tamanho (difração da luz) e granularidade (difusão da luz) respectivamente. A análise do tamanho dos linfócitos foi identificada por FSC^{lo}/SSC^{lo} e a granularidade por SSC^{hi} (VAN RIJT *et al.*, 2004), desse modo foi quantificado os granulócitos e os linfócitos. A figura 7 representa as subpopulações de leucócitos de acordo com o tamanho e granulosidade após análise da citometria de fluxo.

Figura 7. Esquema representativo das subpopulações de leucócitos, por tamanho e granularidade celular, após análise por citometria de fluxo.



A análise por citometria de fluxo foi realizada pela medição da fluorescência dos marcadores celulares. A fluorescência verde emitida pelo isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi detectada após passagem em filtro de 530nm (FL1). A fluorescência laranja da ficoeritrina (PE) foi detectada após passagem em filtro de 585nm (FL2). O citômetro de fluxo (FACSCalibur II, Becton Dickinson) utilizado foi equipado com laser de íons de argônio de 15mW em 488nm, resfriado a ar.

O *pellet* do BALF foi utilizado para análise dos parâmetros FSC e SSC, bem como na expressão de CD3⁺ e CD4⁺ e CD8⁺ pelas subpopulações de linfócitos avaliadas.

Para a marcação das moléculas de superfície de células utilizamos anticorpos anti-CD3⁺ (FITC), anti-CD4⁺ (FITC), anti-CD8⁺ (PE) (todos da R e D Systems). Para isto, 5×10^5 células/mL foram centrifugadas a 1200 RPM. Para impedir ligações inespecíficas, as células foram previamente mantidas na presença de soro de camundongo por 5 minutos e posteriormente incubadas por 20 minutos a 4°C em 10 µL do anticorpo, na concentração estipulada pelo fabricante. No fim da incubação, as células foram lavadas e resuspensas em HBSS⁻ para leitura em citômetro de fluxo.

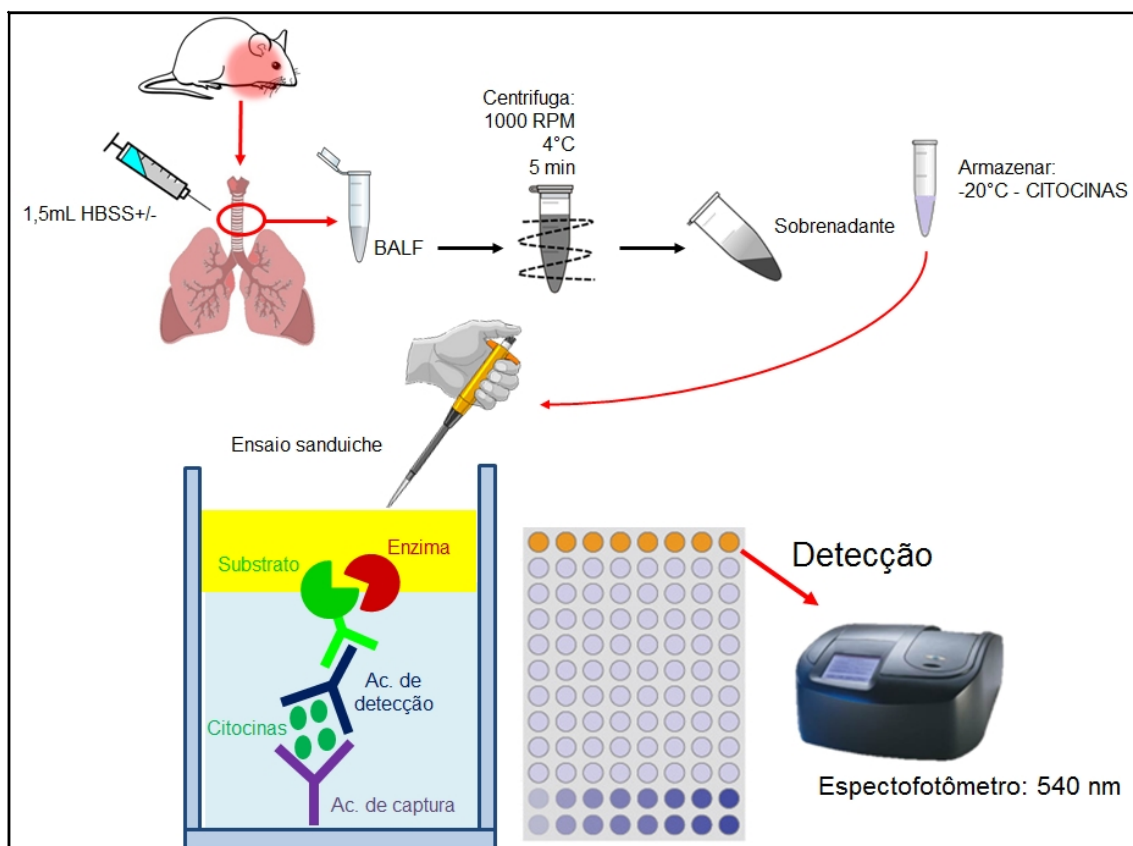
3.11 Quantificação das citocinas IL-4, IL-13, IL-17, IFN-γ e IL-10 no BALF

O sobrenadante do BALF armazenado a -20°C foi utilizado para a quantificação das citocinas IL-4, IL-13, IL-17, IFN-γ e IL-10, onde foi utilizado o Teste Imunoenzimático ELISA direto ou sanduíche, de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

De forma sucinta, o método de sanduíche, ou captura, é indicado para identificação de antígenos (IL-4, IL-13, IL-17, IFN-γ e IL-10), e este antígeno fica entre dois anticorpos. Assim, um anticorpo primário específico ao antígeno (citocinas) é adsorvido no poço da microplaca. Em seguida o BALF contendo o antígeno (IL-4, IL-13, IL-17, IFN-γ e IL-10) é adicionado. Depois o segundo anticorpo específico ao antígeno marcado com uma enzima é adicionado. Esta enzima que reage com o substrato fazendo com que o cromógeno mude de cor. A presença de

cor nos poços indica a presença do antígeno (IL-4, IL-13, IL-17, IFN- γ e IL-10), e os poços que não mudarem de cor indica a ausência do antígeno em questão. A leitura foi realizada em leitor de placa (MICROPLATE READER versa Max, tunable, BN 2529 Molecular Devices) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir de cada curva-padrão de cada citocina quantificada. A figura 8 demonstra esquematicamente e de forma geral a quantificação das citocinas utilizando o ELISA sanduíche.

Figura 8. Esquema representativo da quantificação de citocinas pelo Ensaio Imunoenzimático de ELISA sanduíche.



3.12 Histologia Pulmonar

Para avaliar as características histológicas pulmonares dos camundongos, ambos os lóbulos direito e esquerdo do pulmão de cada animal foram coletados 24 horas após o último desafio ocorrido no dia 22 do protocolo experimental. Após anestesia e coleta do sangue pelo plexo braquial e BALF, o tórax do animal foi aberto com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica e então foi realizada a perfusão cardíaca com administração de 20 mL de salina no coração, no intuito de realizar uma lavagem do pulmão.

Para evitar a digestão do tecido por enzimas presentes no interior das células (autólise) ou por enzimas bacterianas, os cortes foram colocados em fixadores: formalina tamponada por 72 horas e logo após em álcool etílico 70% até o momento do corte histológico. Esse procedimento mantém a integridade do tecido, uma vez que os fixadores preservam a estrutura dos tecidos ao interagirem com os grupos aminos das proteínas, por pontes de hidrogênio.

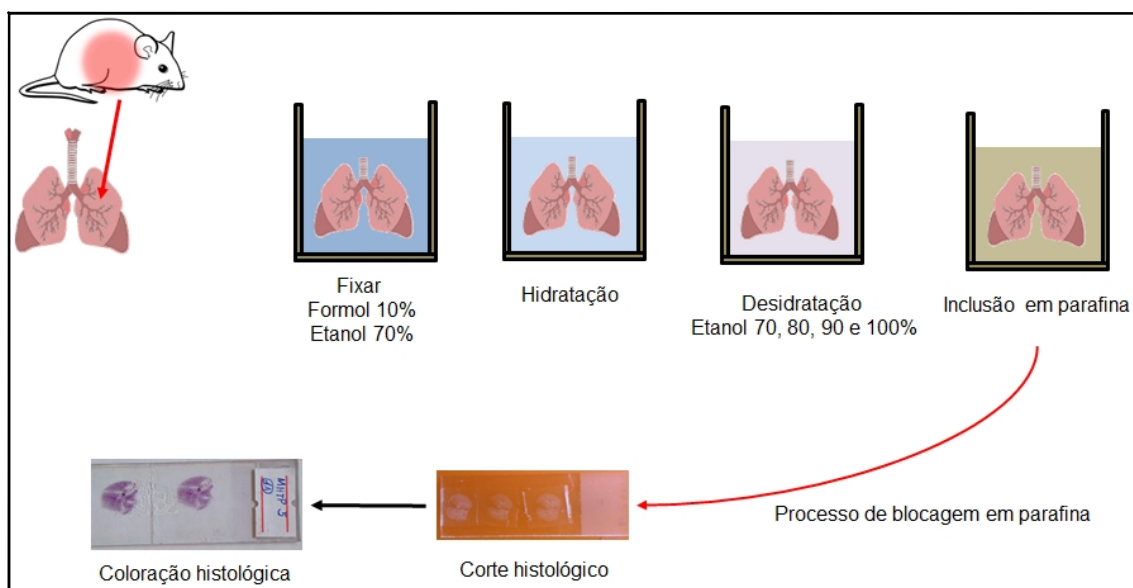
Os pulmões fixados foram inicialmente hidratados por imersões em água corrente durante 24 horas. Após esse procedimento as amostras foram desidratadas durante 1 hora em cada diferente concentração de álcool etílico (70, 80, 90 e 100%). O processo de desidratação foi realizado porque a água presente nos tecidos não é miscível em substâncias apolares como a parafina para inclusão, além disso, a graduação nas concentrações de álcool é imprescindível para que ocorra a desidratação homogênea dos tecidos, evitando que ocorram danos na estrutura tecidual.

Após a remoção do álcool, o tecido pulmonar passou por duas horas imersos em xilol e em seguida em parafina líquida (parafina histológica- ERVIEGAS, São Paulo, SP), mantida nesse estado com o auxílio de dispensador de parafina a 56°C – ponto de fusão (CR422, JONAM) e posteriormente, o tecido foi transferido para o molde (fôrma histológica) contendo parafina líquida. Poucos minutos após ser colocada na fôrma, a parafina solidificou e obteve-se o "bloco" de parafina contendo o fragmento do tecido em seu interior. Os blocos de parafina assim formados, foram retirados das fôrmas e realizados cortes histológicos com espessura de 5µm, com o auxílio de um micrótomo (SP Labor 300). Os cortes foram colocados em banho-maria

(38 – 39°C), sendo retirados após, com lâminas. A secagem das lâminas foi realizada em temperatura ambiente.

Com os cortes aderidos nas lâminas, estes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) ou Ácido Periódico de Schiff (PAS) e depois foi realizado a montagem das lâminas. Como meio de montagem foi utilizado o bálsamo do Canadá. Cada grupo de animais teve três lâminas coradas em cada coloração. Na Figura 9 está a representação simplificada e esquemática dos passos que foram realizados na preparação do corte histológico pulmonar.

Figura 9. Esquema representativo da preparação do corte histológico pulmonar.



3.12.1 Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)

A técnica hematoxilina-eosina (HE) é clássica, básica, dicrômica e geral, possuindo dois corantes: hematoxilina, corante básico que cora componentes ácidos como os núcleos de todas as células, e eosina corante ácido que cora componentes básicos como o citoplasma de todas as células, proporcionando uma observação geral de todas as estruturas pulmonares. As lâminas foram inicialmente desparafinizadas por imersão no xilol, o primeiro xilol com duração de 10 min e o segundo xilol com duração de 10 min. Em seguida, as lâminas passaram pelo processo de hidratação em álcool absoluto, o primeiro álcool por 5 min e o segundo álcool por 5 min.

As lâminas foram colocadas sucessivamente em álcool 90, 80 e 70% por 5 min e água destilada por 1 min. Então, foram imersas na hematoxilina por 30 segundos, mergulhadas rapidamente em água destilada, depois em água destilada novamente, com a finalidade de retirar o excesso de corante. Em seguida, as lâminas foram colocadas no corante eosina, por 5 min, e em seguida desidratadas com álcool 80, 90% e absoluto 3 min em cada. O material histológico passou pelo banho em xilol por 10 min, onde o primeiro xilol foi por 5 min e o segundo xilol por mais 5 min. Após coloração foi colocado sobre o corte o bálsamo do Canadá e uma lamínula. Depois, com auxílio de uma pinça, foram retiradas as bolhas e a lamínula foi comprimida com firmeza sobre o corte para o espalhamento do bálsamo. Após 24h foram retirados os excessos de bálsamo para acabamento do preparo das lâminas. Nas lâminas coradas pela hematoxilina-eosina são observados em azul escuro os núcleos, em rosa os citoplasmas e em vermelho as hemácias.

Para análise morfológica dos cortes corados pela hematoxilina-eosina (HE), foi criado um score (pontuação) de 0 – 6, onde este é quantificado de acordo com a lesão evidenciada. As lesões evidenciadas foram vasodilatação (presente ou ausente), manutenção da integridade bronquiolar (presente ou ausente), migração de células, onde zero (0) significa ausência de migração, (1) poucas células 0-9 células por campo, (2) mais de 10 células por campo e (3) formação de anéis de células perivascular e peribronquiolar. Por fim, como parte do score avaliou-se o obstrução alveolar (presente ou ausente). Quando presente soma-se a análise 1, quando ausente 0 e quanto a migração, depende do número de células. Avaliado em 5 campos da lâmina (ZOU *et al.*, 2014).

3.12.2 Coloração P.A.S. (Ácido Periódico – Schiff)

O ácido periódico de Schiff revela glicogênio e mucina intracelular. As lâminas foram inicialmente desparafinadas por imersão no xilol durante 10 min hidratadas em álcool absoluto, álcool 90, 80 e 70% por 5 min e água destilada por 1 min. Depois foram colocadas no ácido periódico por 10 min, na água destilada por 1 min e no reativo de Schiff por 25 min, quando retiradas foram colocadas em 3 banhos sulfurosos de 2 min cada e mergulhadas 1 min em água. Em seguida, as lâminas foram colocadas em hematoxilina por 5 min e mergulhadas em água. Durante 6 min foram desidratadas com álcool 80, 90% e absoluto sendo 2 min em cada álcool. Para

clareamento foi utilizado xilol, as lâminas foram imersas no primeiro xilol por 5 min e no segundo xilol por 5 min.

Nas lâminas coradas por P.A.S. é observado em rosa a presença de glicogênio ou polissacarídeos neutros (contendo grupos 1,2 glicol), mucina (glicoproteína, principal constituinte do muco), proteoglicanos não se coram, os núcleos e os citoplasmas se coram em roxo claro. Nos cortes analisados por P.A.S. a análise foi qualitativa.

3.13 Análise estatística

Todos os dados foram analisados pelo programa Graph Pad Prism© versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.).

Para analisar os dados do Citômetro de Fluxo foi utilizado inicialmente o programa Flowing 2.5.1 e posterior análise no Graph Pad Prism.

Todos os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o ANOVA “one-way” seguido do teste de Dunnett, onde foram considerados significativos os valores de $p < 0.05$. Valores de $++p < 0.001$ e $+++p < 0.0001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo Basal, e $*p < 0.05$; $**p < 0.001$ e $***p < 0.0001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo OVA.

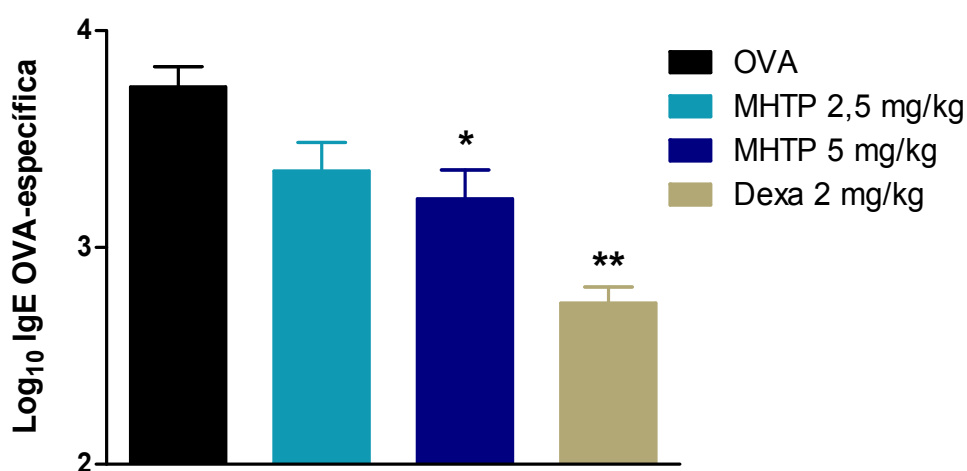
4 RESULTADOS

4.1 Efeito do MHTP no Título de IgE-OVA específica na inflamação pulmonar alérgica experimental

Devido à não sensibilização, com OVA, os animais do grupo Basal não apresentaram título de IgE-OVA específica, não sendo adicionado no Gráfico 1. O título de IgE-OVA específica foi em média 1:8.192 no grupo OVA (Gráfico 1).

Ao comparar o título de IgE-OVA específica dos animais sensibilizados com OVA e tratados com o MHTP em relação ao grupo OVA, o MHTP na menor dose utilizada (2,5 mg/kg i.n.) não foi capaz de diminuir de forma significativa o título de IgE-OVA específica, entretanto a dose de 5 mg/kg promoveu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) (Gráfico 1). O tratamento com a droga padrão Dexametasona (2 mg/kg i.n.) promoveu uma diminuição significativa ($p < 0,001$) do título de IgE –OVA específica (Gráfico 1).

Gráfico 1. Efeito do tratamento com MHTP no título de IgE-OVA específica pelo método de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA) na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via instilação nasal (i.n.) com MHTP (2,5 ou 5 mg/kg) ou com Dexametasona (Dexa 2 mg/kg) 1 hora antes de cada desafio. Os soros dos animais foram coletados 24h após o último desafio para obtenção do título de IgE OVA-específica, determinado pelo teste de PCA. Os resultados foram expressos como média do log₁₀ do título de IgE ± e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Dunnett. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ comparado ao grupo OVA.

4.2 Efeito do MHTP no número de Células Totais e Diferenciais no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) na inflamação pulmonar alérgica experimental

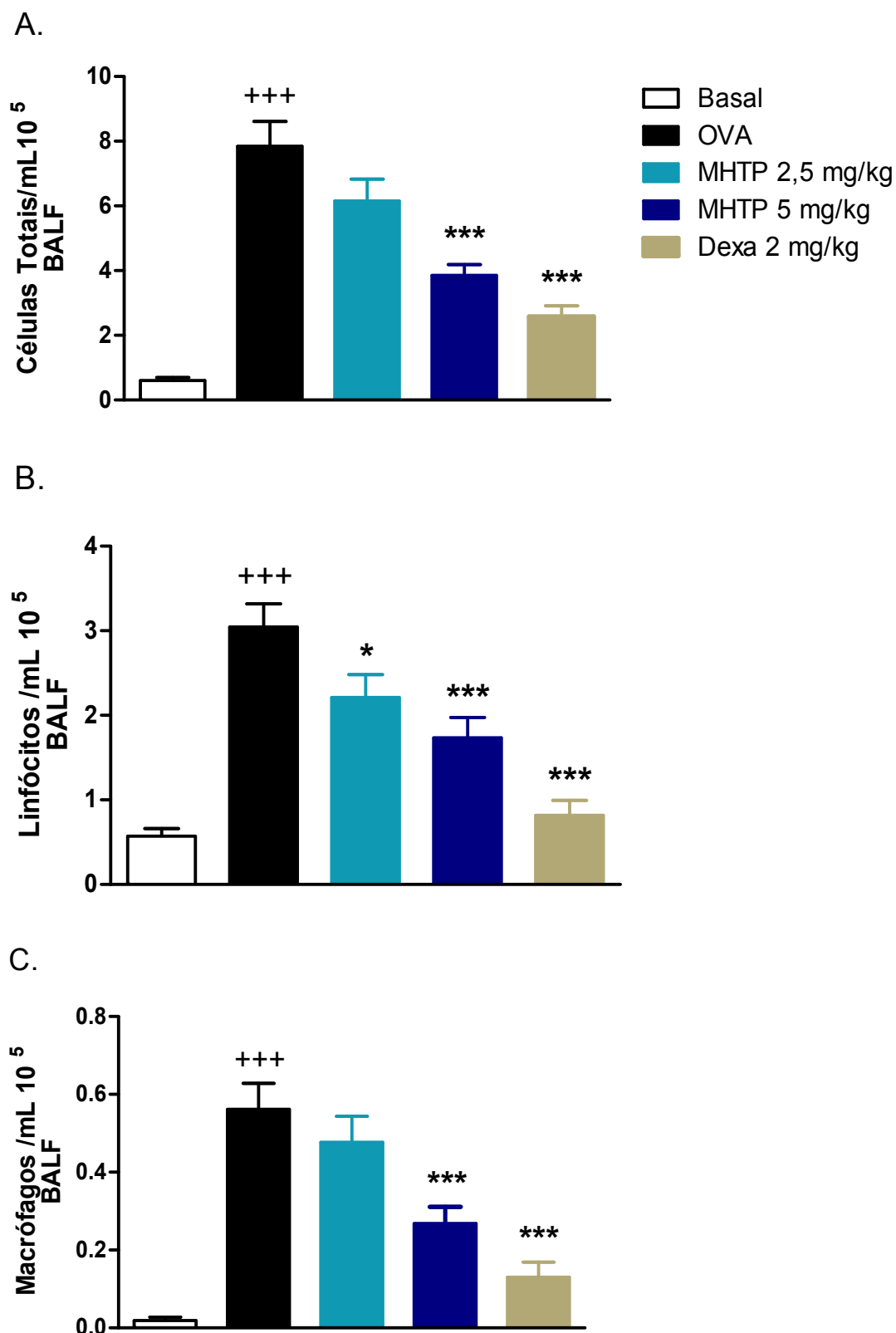
O grupo OVA apresentou aumento significativo ($p < 0,0001$) na migração de células para o espaço broncoalveolar em relação ao grupo Basal (Gráfico 2A).

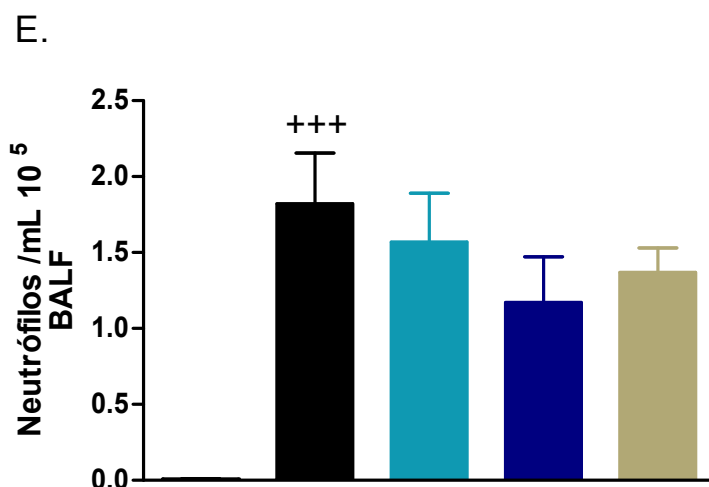
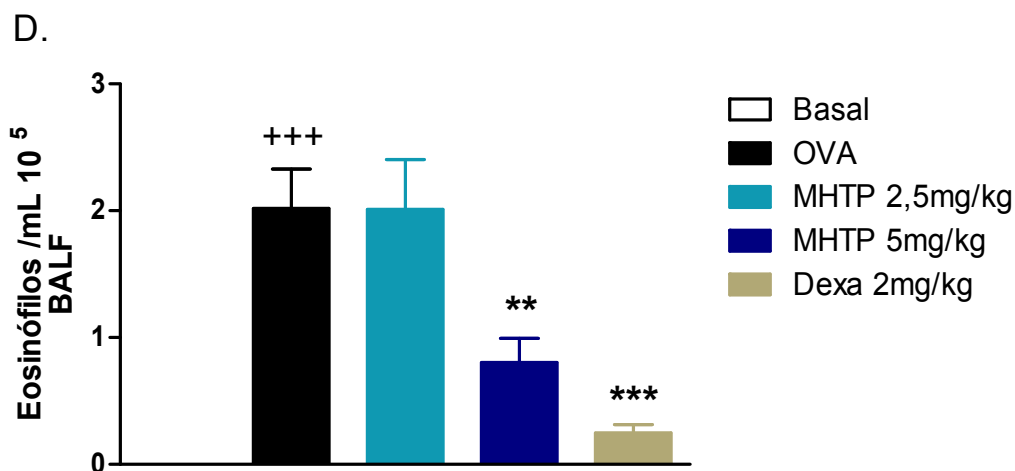
Na comparação da migração celular ocorrida nos grupos tratados com o MHTP em relação à ocorrida no grupo OVA, observou-se que a menor dose do MHTP (2,5 mg/kg i.n.) não foi eficaz quanto a redução da migração celular para o espaço broncoalveolar (Gráfico 2A) no entanto, o MHTP em sua maior dose (5 mg/kg i.n.) assim como a droga padrão Dexametasona (Dexa 2 mg/kg i.n.) promoveram uma redução significativa ($p < 0,0001$) (Gráfico 2A).

Na análise dos leucócitos diferenciais, observou-se que o grupo OVA apresentou um aumento significante no número de linfócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos ($p < 0,0001$) no BALF em comparação com o grupo Basal (Gráfico 2B, C, D e E).

Em relação a migração de leucócitos diferenciais entre os grupos tratados com MHTP e o grupo OVA, o MHTP na dose de 2,5 mg/kg (i.n.) foi capaz de diminuir de forma significativa a migração de linfócitos no BALF ($p < 0,05$) (Gráfico 2B), entretanto não alterou a migração de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (Gráfico 2C, D e E) para o espaço broncoalveolar. A maior dose do MHTP (5 mg/kg i.n.) foi capaz de promover uma redução significativa na migração de linfócitos ($p < 0,0001$), macrófagos ($p < 0,0001$) e eosinófilos ($p < 0,001$) no BALF (Gráfico 2B, C e D). O tratamento com a droga padrão Dexametasona (2 mg/kg i.n.) foi capaz de diminuir a migração de linfócitos, macrófagos e eosinófilos ($p < 0,0001$) para o espaço broncoalveolar (Gráfico 2B, C e D). Todavia, foi observado que o MHTP em suas duas doses administradas (2,5 e 5 mg/kg) bem como a Dexametasona (2 mg/kg) não foram capazes de diminuir a migração de neutrófilos no BALF (Gráfico 2E).

Gráfico 2. Efeito do tratamento com MHTP na migração de leucócitos totais e diferenciais (linfócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos) para o espaço broncoalveolar na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.





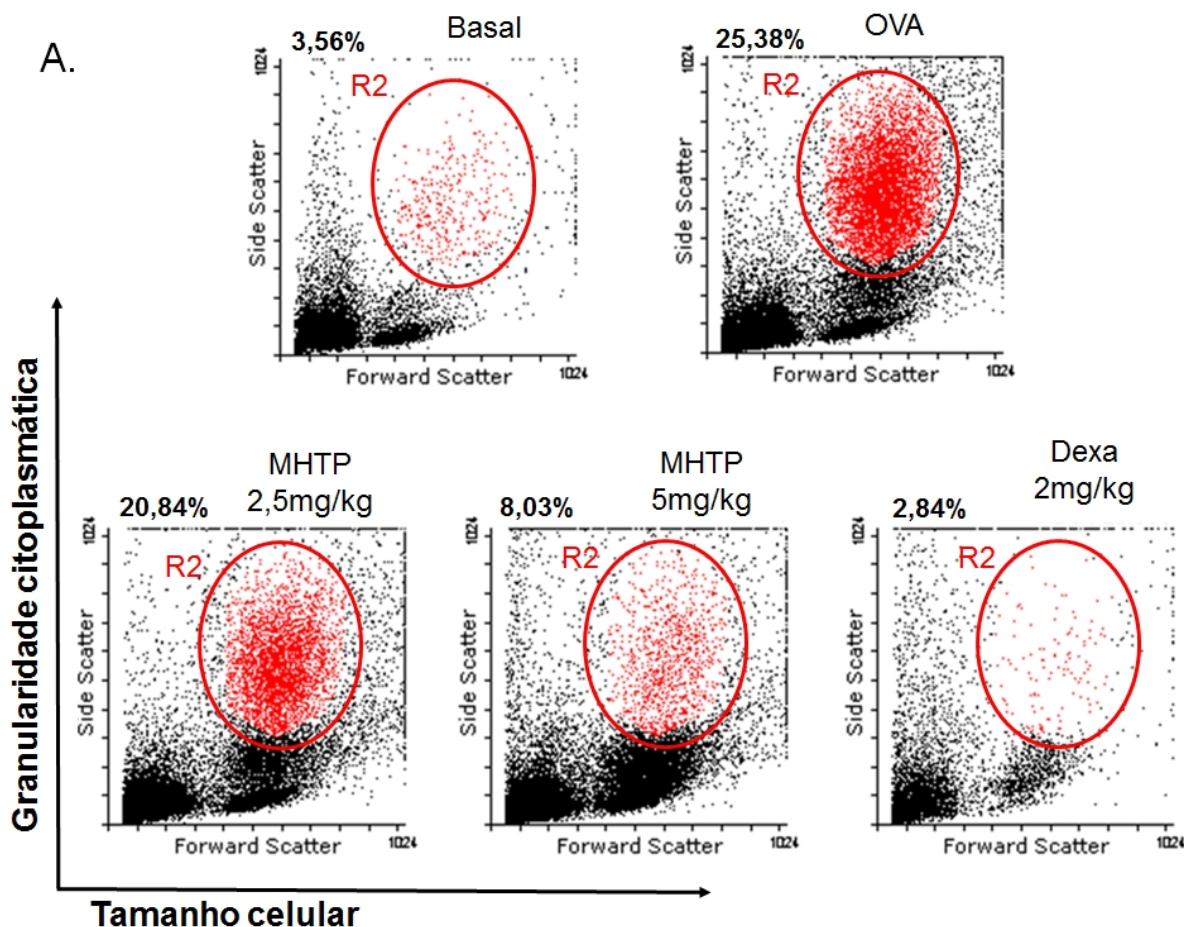
Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via instilação nasal (i.n.) com MHTP (2,5 ou 5 mg/kg) ou Dexametasona (Dexa 2 mg/kg) 1 hora antes de cada desafio. O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 24h após o último desafio e a migração de leucócitos foi quantificada em microscopia óptica comum. **A.)** Células Totais; **B.)** Linfócitos; **C.)** Macrófagos; **D.)** Eosinófilos e **E.)** Neutrófilos. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Dunnett. +++p < 0,0001, comparado ao grupo Basal; *p < 0,05, **p < 0,001 e ***p < 0,0001 comparado ao grupo OVA.

4.3 Efeito do MHTP no percentual de granulócitos (eosinófilos e neutrófilos) no BALF na inflamação pulmonar alérgica experimental

O grupo OVA apresentou aumento significativo de 21,82% ($p < 0,0001$) na migração celular de granulócitos, estes são representados por eosinófilos e neutrófilos, para o espaço broncoalveolar, em relação ao grupo Basal (Figura 10 e Gráfico 3, respectivamente).

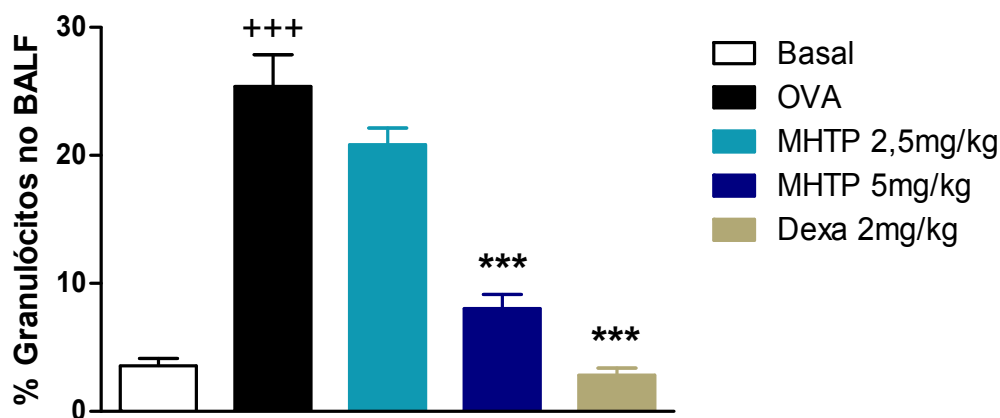
Na comparação da migração celular de granulócitos ocorrida nos grupos tratados com MHTP em relação à ocorrida no grupo OVA, a menor dose do MHTP (2,5 mg/kg i.n.) não foi eficaz quanto a redução da migração celular de granulócitos para o espaço broncoalveolar, no entanto, o MHTP em sua maior dose (5 mg/kg i.n.) assim como a droga padrão utilizada Dexametasona (2 mg/kg i.n.) promoveram uma redução significativa de 17,35% e 22,54%, respectivamente ($p < 0,0001$) na migração de granulócitos para espaço broncoalveolar (Figura 10 e Gráfico 3). Esses dados corroboram com a diminuição da migração de eosinófilos acima mencionados.

Figura 10. Efeito do tratamento com MHTP na porcentagem de granulócitos (eosinófilos e neutrófilos) no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via instilação nasal (i.n.) com 2,5 ou 5 mg/kg de MHTP ou com 2 mg/kg de Dexametasona 1 hora antes de cada desafio. O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 24h após o último desafio e após sua centrifugação, o *pellet* foi utilizado para classificação dos leucócitos pela análise do tamanho celular (FSC- *Forward Scatter*, por difração de luz) e granularidade ou complexidade citoplasmática (SSC- *Side Scatter*, por difusão de luz) na citometria de fluxo. A região demarcada R2 é referente ao tamanho celular e complexidade intracelular característica dos granulócitos eosinófilos e neutrófilos. As figuras foram analisadas pelo programa Flowing 2.5.1. Os resultados são representativos de 1 experimento.

Gráfico 3. Percentual de granulócitos (eosinófilos e neutrófilos) no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) após o tratamento com MHTP na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.



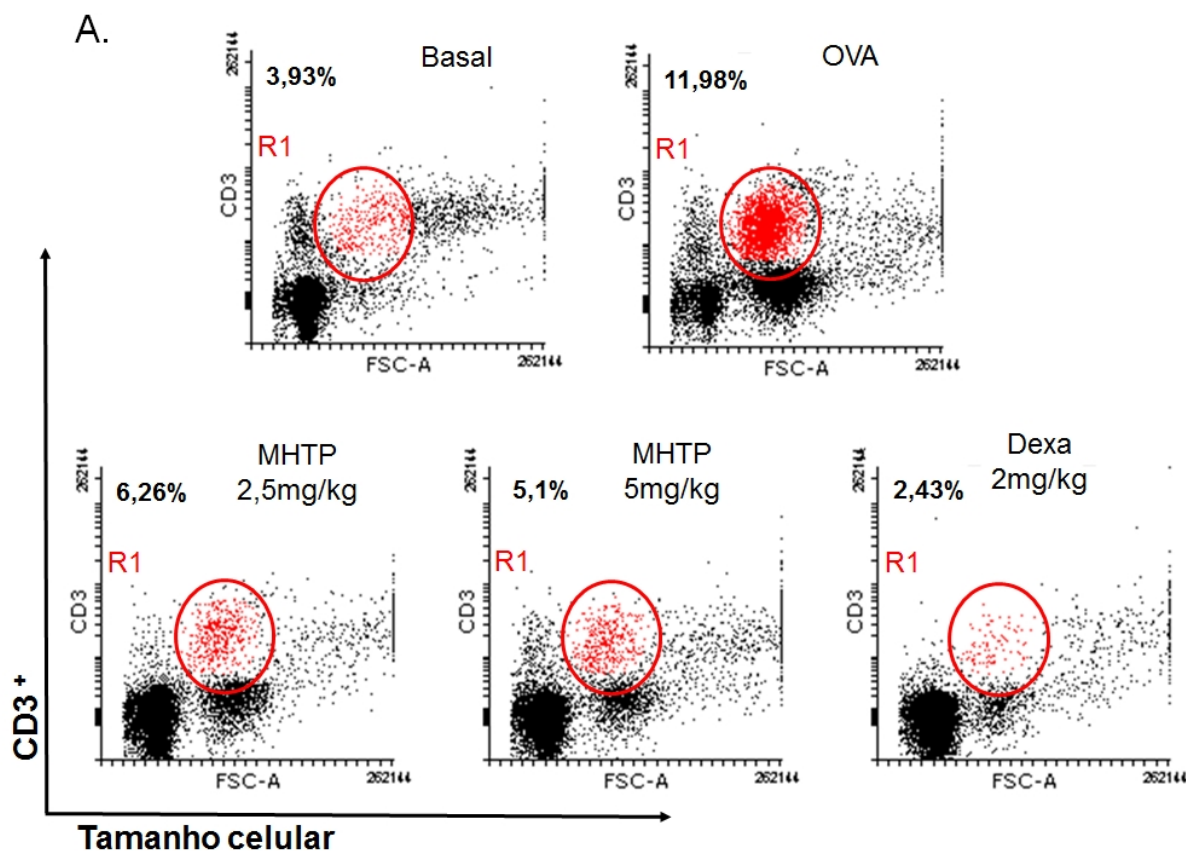
Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via instilação nasal (i.n.) com 2,5 ou 5 mg/kg de MHTP ou com 2 mg/kg de Dexametasona 1 hora antes de cada desafio. O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 24h após o último desafio e após sua centrifugação, o *pellet* foi utilizado para classificação dos leucócitos pela análise do tamanho celular (FSC- *Forward Scatter*, por difração de luz) e granularidade ou complexidade citoplasmática (SSC- *Side Scatter*, por difusão de luz) na citometria de fluxo. O resultado da porcentagem dos granulócitos no BALF foi expresso como média \pm e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Dunnett. ***p < 0.0001, comparado ao grupo basal; ***p < 0.0001 comparado ao grupo OVA.

4.4 Efeito do MHTP nas subpopulações de linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ no BALF na inflamação pulmonar alérgica experimental

O grupo OVA apresentou aumento significativo de 8,05% (p<0,05) na migração celular de Linfócitos T CD3⁺ para o espaço broncoalveolar, em relação ao grupo Basal (Figura 11 e Gráfico 4, respectivamente).

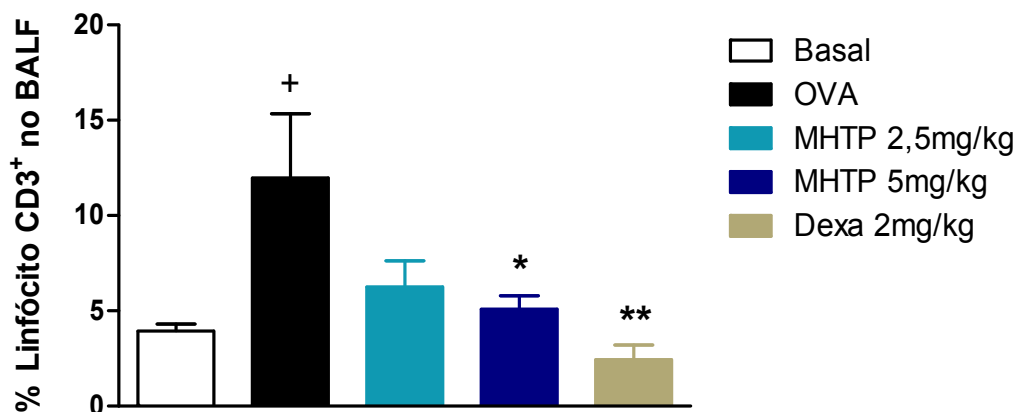
Ao ser comparada a migração celular de Linfócitos T CD3⁺ ocorrida nos grupos tratados em relação à ocorrida no grupo OVA, a menor dose do MHTP (2,5 mg/kg i.n.) não foi eficaz quanto a redução da migração celular de Linfócitos T CD3⁺ para o espaço broncoalveolar, no entanto, o MHTP em sua maior dose (5 mg/kg i.n.) assim como a droga padrão utilizada Dexametasona (2 mg/kg i.n.) promoveram uma redução significativa de 6,88% (p<0,05) e 9,55% (p<0,001), respectivamente, na migração de Linfócitos T CD3⁺ para espaço broncoalveolar (Figura 11 e Gráfico 4).

Figura 11. Efeito do tratamento com MHTP na porcentagem de Linfócitos T CD3⁺ no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via instilação nasal (i.n.) com 2,5 ou 5 mg/kg de MHTP ou com 2 mg/kg de Dexametasona 1 hora antes de cada desafio. O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 24h após o último desafio e após sua centrifugação, o *pellet* foi utilizado para quantificar os Linfócitos T CD3⁺ através da intensidade de fluorescência, captada pela marcação de antígenos de superfície com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos pela técnica de citometria de fluxo. A região R1 demarcada é referente a população de Linfócitos T CD3⁺. As figuras foram analisadas pelo programa Flowing 2.5.1. Os resultados são representativos de 1 experimento.

Gráfico 4. Percentual de Linfócitos T CD3⁺ no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) após o tratamento com MHTP na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via instilação nasal (i.n.) com 2,5 ou 5 mg/kg de MHTP ou com 2 mg/kg de Dexametasona 1 hora antes de cada desafio. O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 24h após o último desafio e após sua centrifugação, o *pellet* foi utilizado para quantificar os Linfócitos T CD3⁺ através da intensidade de fluorescência, captada pela marcação de antígenos de superfície com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos pela técnica de citometria de fluxo. O resultado da porcentagem de Linfócitos T CD3⁺ foi expresso como média ± e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Dunnet. *p < 0.05, comparado ao grupo basal; *p < 0.05 e **p < 0.001 comparado ao grupo OVA.

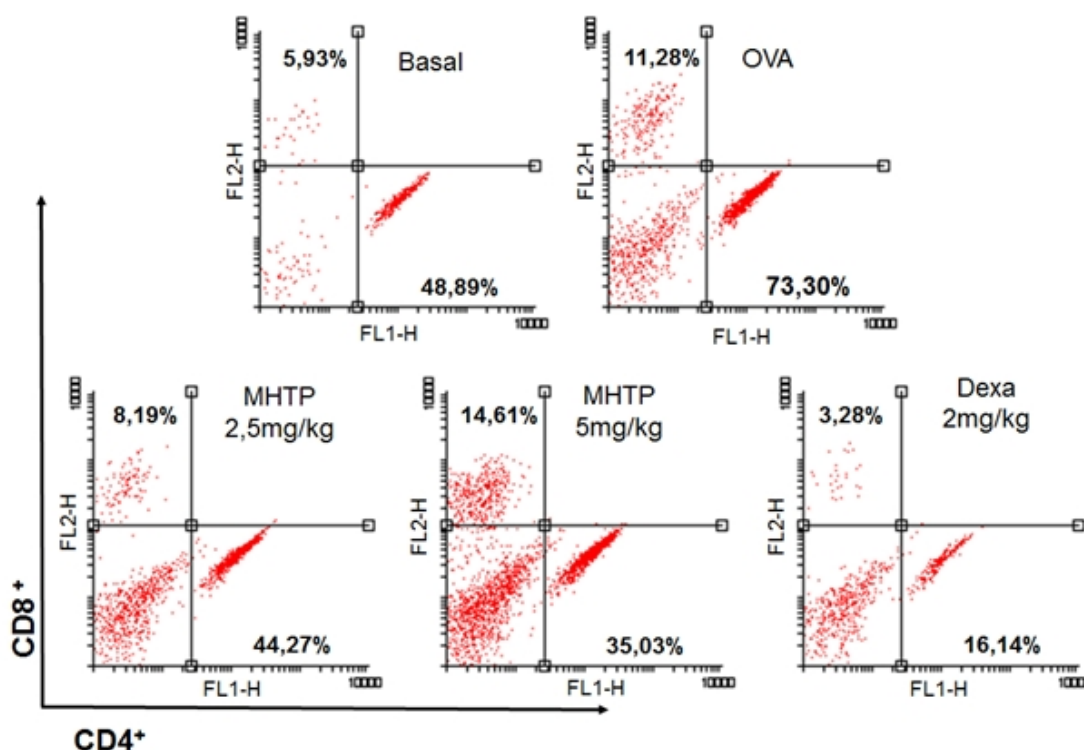
Na análise das subpopulações de Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, o grupo OVA apresentou aumento significativo de 24,41% (p<0,0001) na migração celular de Linfócitos T CD4⁺ (Figura 12 e Gráfico 5A) e de 5,35% (p<0,001) na migração de Linfócitos T CD8⁺ (Figura 12 e Gráfico 5B), para o espaço broncoalveolar, em relação ao grupo Basal.

Na comparação entre a migração celular de Linfócitos T CD4⁺ ocorrida nos grupos tratados em relação à ocorrida no grupo OVA, as duas doses do MHTP (2,5 ou 5 mg/kg i.n.) assim como a droga padrão utilizada Dexametasona (2 mg/kg i.n.) foram eficazes em reduzir a migração celular de Linfócitos T CD4⁺ para o espaço broncoalveolar. Promoveram uma redução significativa de 29,03; espaço broncoalveolar (Figura 12 e Gráfico 5A).

A migração de Linfócitos T CD8⁺ para o espaço broncoalveolar não foi alterada com o tratamento com o MHTP (2,5 e 5 mg/kg i.n.) no entanto, a droga padrão Dexametasona (2 mg/kg i.n.) foi capaz de diminuir de forma significativa em 8%

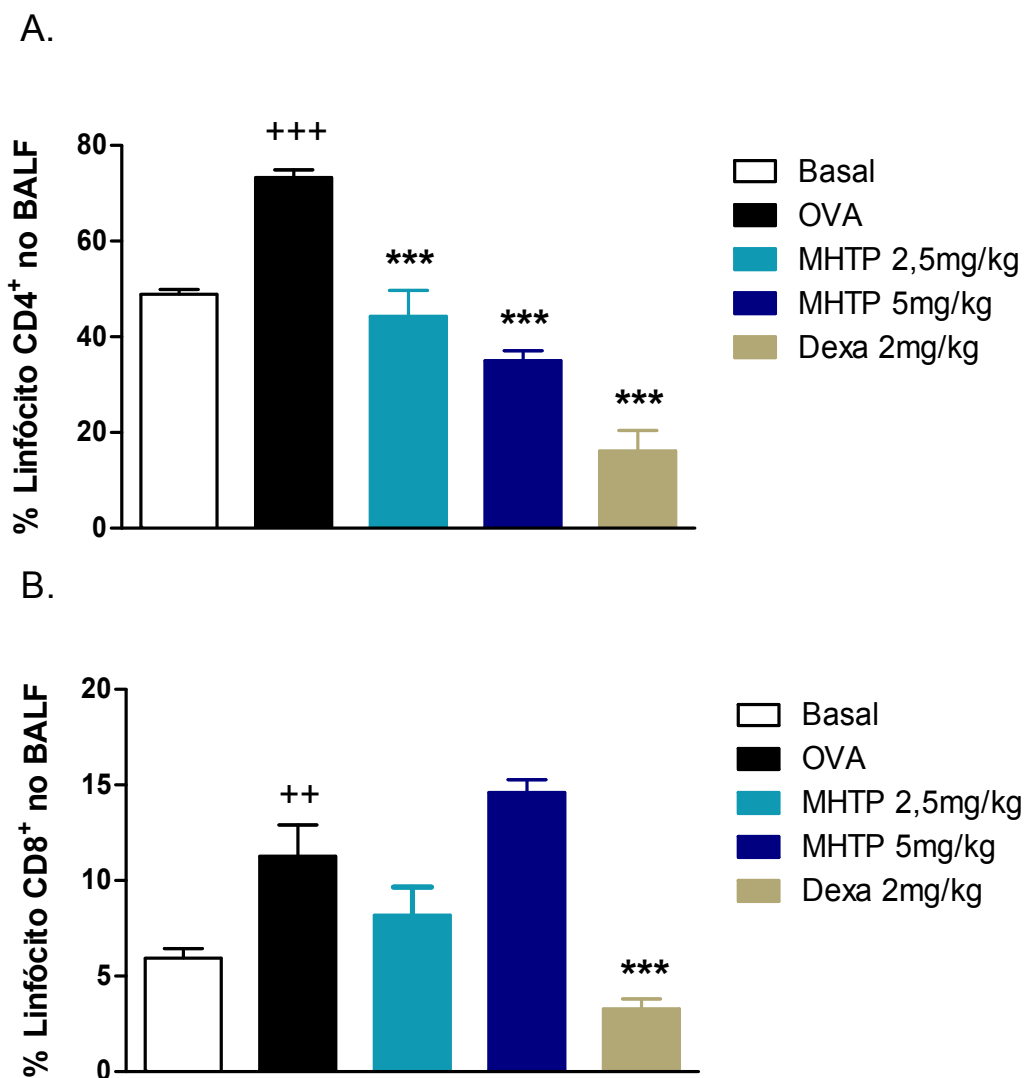
($p < 0.0001$) a migração da subpopulação de Linfócitos T CD8⁺ para o espaço broncoalveolar (Figura 12 e Gráfico 5B).

Figura 12. Efeito do tratamento com MHTP na porcentagem de Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via instilação nasal (i.n.) com 2,5 ou 5 mg/kg de MHTP ou com 2 mg/kg de Dexametasona 1 hora antes de cada desafio. O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 24h após o último desafio. Após a centrifugação do BALF, o *pellet* foi utilizado para quantificar os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ através da intensidade de fluorescência, captada pela marcação de antígenos de superfície com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos pela técnica de citometria de fluxo. A região FL2-H demarcada é referente a população de linfócitos T CD8⁺ e a região FL1-H é referente a população de linfócitos T CD4⁺. As figuras foram analisadas pelo programa Flowing 2.5.1. Os resultados são representativos de 1 experimento.

Gráfico 5. Percentual de Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) após o tratamento com MHTP na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.



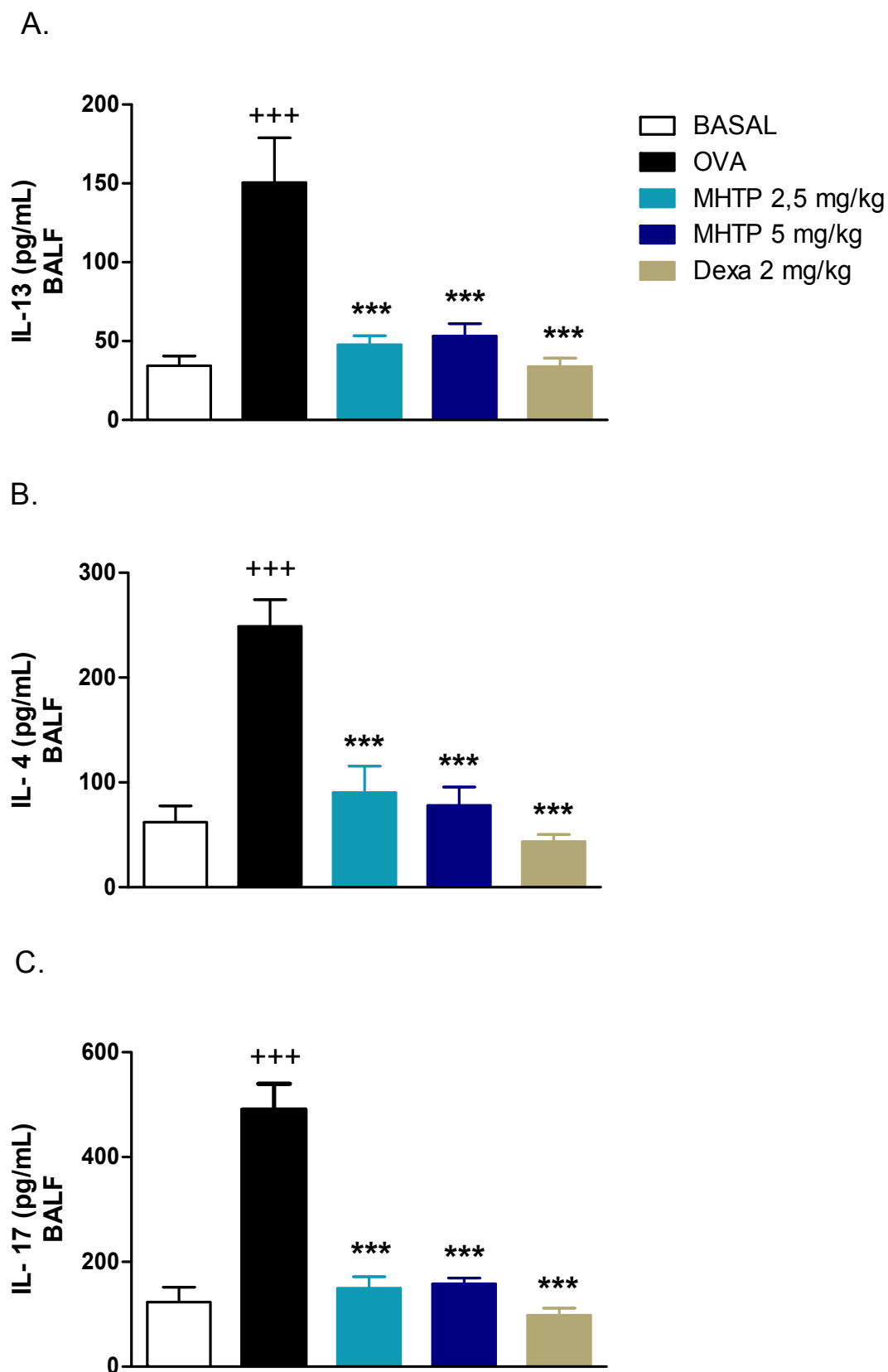
Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via instilação nasal (i.n.) com 2,5 ou 5 mg/kg de MHTP ou com 2 mg/kg de Dexametasona 1 hora antes de cada desafio. O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 24h após o último desafio. Após a centrifugação do BALF, a *pellet* foi utilizado para quantificar os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ através da intensidade de fluorescência, captada pela marcação de antígenos de superfície com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos pela técnica de citometria de fluxo. **A.)** % de Linfócitos T CD4⁺ no BALF **B.)** % de Linfócitos T CD8⁺ no BALF. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Dunnett. **p < 0.001 e ***p < 0.0001, comparado ao grupo basal; ***p < 0.0001 comparado ao grupo OVA.

4.5 Quantificação das citocinas IL-4, IL-13, IL-17, IFN- γ e IL-10 no BALF na inflamação pulmonar alérgica experimental

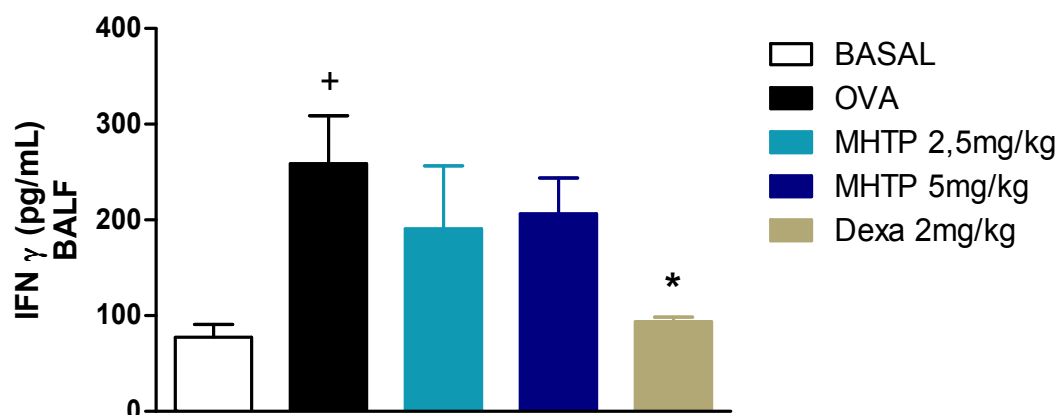
O grupo OVA apresentou aumento significativo ($p < 0,0001$) na produção das citocinas clássicas do perfil Th2, IL-4 e IL-13 (Gráfico 6A e B), do perfil Th17, IL-17 (Gráfico 6C) bem como apresentou aumento significativo ($p < 0,001$) nas citocinas clássicas do perfil do perfil Th1, IFN- γ (Gráfico 6D) e de *Treg*, IL-10 (Gráfico 6E) em comparação ao grupo Basal.

Ao ser comparada a produção das citocinas dos perfis Th2, Th17, Th1 e *Treg* no BALF produzidas nos grupos tratados com MHTP em relação as produzidas no grupo OVA, o MHTP nas duas doses administradas (2,5 ou 5 mg/kg i.n.) promoveu uma diminuição significativa da produção das citocinas IL-13 ($p < 0,001$) (Gráfico 6A), IL-4, IL-17 e IL-10 ($p < 0,0001$) (Gráfico 6B, C e E). Entretanto, o MHTP não foi capaz de alterar a produção do IFN- γ no BALF (Gráfico 6D). A droga padrão utilizada Dexametasona (Dexa 2mg/kg i.n.) foi capaz de diminuir significativamente a produção das citocinas IL-13, IL-4, IL-17 e IL-10 ($p < 0,0001$) (Gráfico 6A, B, C e E), bem como reduziu de forma significante ($p < 0,05$) a produção de IFN- γ no BALF (Gráfico 6D).

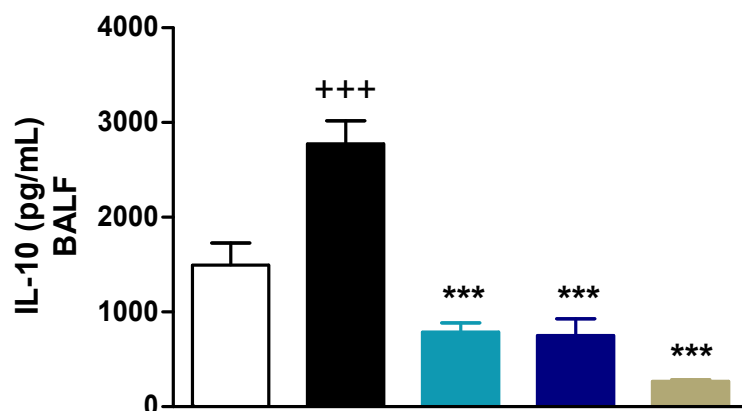
Gráfico 6. Efeito do tratamento com MHTP na produção das citocinas IL-13, IL-4, IL-17, IFN- γ e IL-10 no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) na inflamação pulmonar alérgica experimental induzida por Ovalbumina.



D.



E.

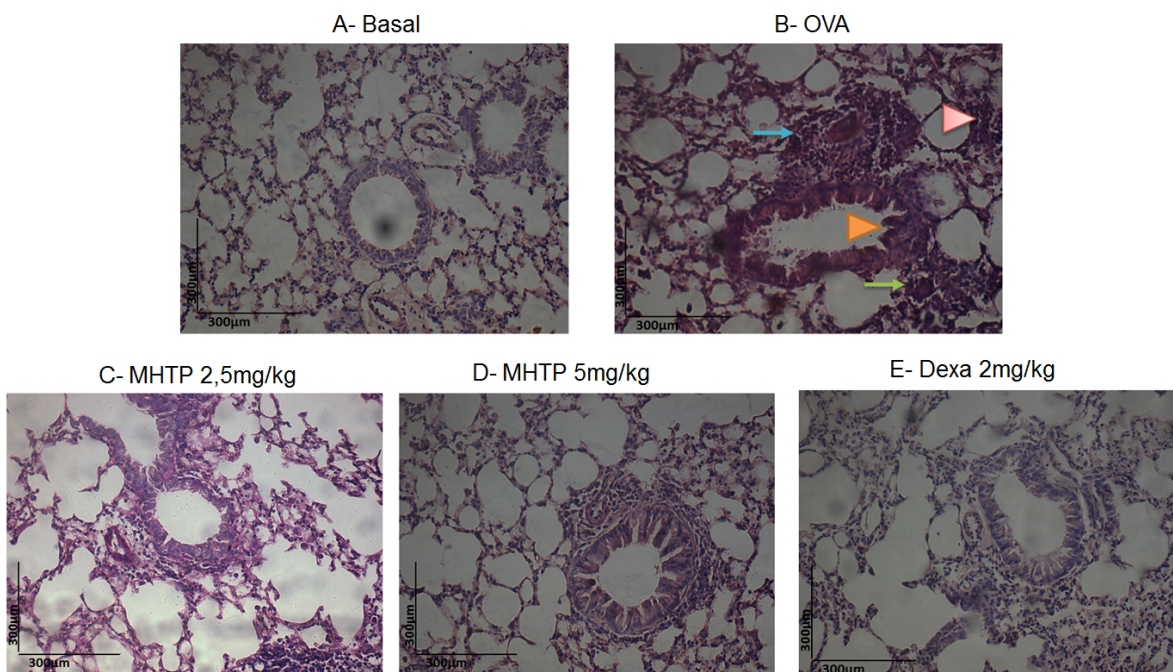


Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via instilação nasal (i.n.) com MHTP (2,5 ou 5 mg/kg) ou Dexametasona (Dexa 2 mg/kg) 1 hora antes de cada desafio. O Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF) dos animais foi coletado 24h após o último desafio e centrifugado. O sobrenadante foi coletado e utilizado o Ensaio Imunoenzimático, ELISA sanduiche, para quantificação das concentrações das citocinas dos perfis Th2 **A.)** IL-13 e **B.)** IL-4. Th17 **C.)** IL-17. Th1 **D.)** IFN- γ e *Treg* **E.)** IL-10. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Tukey. $^{**}p < 0,001$ e $^{+++}p < 0,0001$, comparado ao grupo basal; $^{*}p < 0,05$, $^{**}p < 0,001$ e $^{***}p < 0,0001$ comparado ao grupo OVA.

4.6 Efeito do MHTP na análise histopatológica do tecido pulmonar na inflamação pulmonar alérgica experimental corados pela coloração Hematoxilina-Eosina (HE)

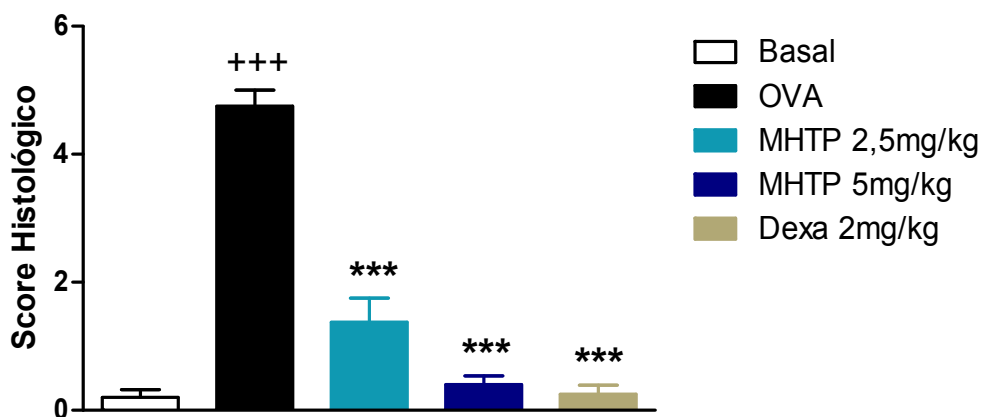
A figura 13 (A – E) mostra a morfologia pulmonar dos animais com a MHTP (2,5 ou 5 mg/Kg) ou Dexametasona (2 mg/kg) em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica. Nas imagens coradas pela Hematoxilina-Eosina, observadas em aumento de 40X nota-se que o animal saudável, Basal (A), não apresentou alterações morfológicas na constituição do parênquima pulmonar. Entretanto, no animal doente, OVA (B), observou-se evidências de parâmetros inflamatórios como migração de células com formação de anéis (seta azul), vasodilatação de vasos de pequeno calibre (seta verde), perda da integridade epitelial bronquiolar (cabeça da seta laranja), seguido de obstrução alveolar (cabeça da seta vermelha). A alteração histológica é demonstrada no *score* histológico no Gráfico 7, onde o animal OVA evidenciou uma inflamação tecidual ($p < 0,0001$) em relação ao animal Basal. Nos animais tratados com MHTP na dose de 2,5 mg/Kg (C) observou-se migração de células inflamatórias (seta azul) como padrão inflamatório. O tratamento com MHTP na dose de 5 mg/kg (D), assim como a Dexametasona (2 mg/kg) foi capaz de reduzir todos os parâmetros inflamatórios analisados, apresentando morfologia semelhante aos animais do grupo Basal. A redução do processo inflamatório tecidual ($p < 0,0001$) característico da inflamação pulmonar alérgica induzida por Ovalbumina após o tratamento por instilação nasal com MHTP na dose 5 mg/kg ou Dexametasona na dose de 2 mg/kg foi demonstrada no *score* histológico (Gráfico 7).

Figura 13. Análise histopatológica inflamatória do MHTP em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica corados pela coloração Hematoxilina-Eosina (HE).



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via instilação nasal (i.n.) com 2,5 ou 5 mg/kg de MHTP ou com 2 mg/kg de Dexametasona 1 hora antes de cada desafio. O tecido pulmonar dos animais foi coletado 24h após o último desafio e realização da perfusão cardíaca. O pulmão foi submetido a técnica histológica e coloração por Hematoxilina-Eosina. Os parâmetros inflamatórios observados foram: a migração de células no espaço perivascular e peribronquiolar (seta azul), vasodilatação (seta verde), perda da integridade epitelial bronquiolar (cabeça da seta laranja) e entupimento alveolar (cabeça da seta vermelha). Tecidos corados por Hematoxilina e Eosina, vistos em microscópio óptico comum em aumento total de 20X. Este resultado foi realizado duplo cego.

Gráfico 7. Score inflamatório do tratamento com MHTP em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica.

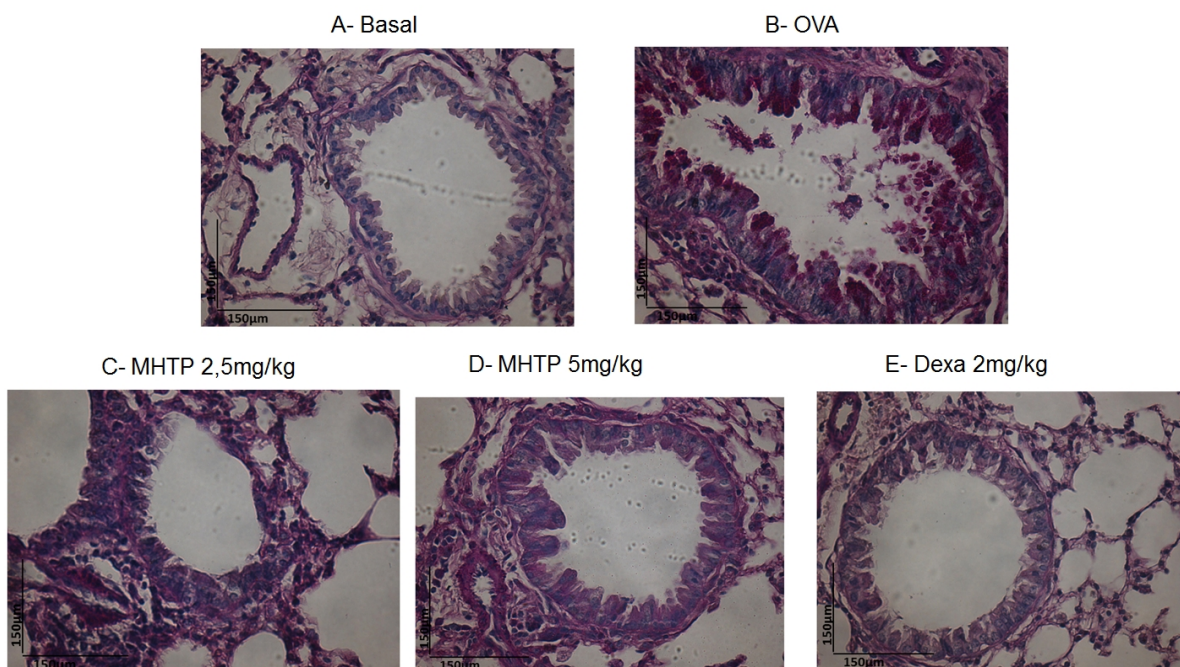


Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via instilação nasal (i.n.) com 2,5 ou 5 mg/kg de MHTP ou com 2 mg/kg de Dexametasona 1 hora antes de cada desafio. O tecido pulmonar dos animais foi coletado 24h após o último desafio e realização da perfusão cardíaca. O pulmão foi submetido a técnica histológica e coloração por Hematoxilina e Eosina. Os parâmetros inflamatórios observados foram a migração de células no espaço perivascular e peribronquiolar, vasodilatação, manutenção da integridade epitelial bronquiolar e entupimento alveolar. Tecidos corados por Hematoxilina e Eosina, vistos em microscópio óptico comum em aumento total de 40X. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. A diferença entre os grupos foi analisada por ANOVA *one-way*, seguida do teste de Dunnett. +++p < 0.0001, comparado ao grupo basal; ***p < 0.0001 comparado ao grupo OVA.

4.7 Efeito do MHTP na análise histopatológica do tecido pulmonar na inflamação pulmonar alérgica experimental corados pela coloração P.A.S. (Ácido Periódico de Schiff)

A figura 14 (A – E) mostra a análise histopatológica do tratamento, por instilação nasal, dos animais com a MHTP (2,5 ou 5 mg/Kg) ou Dexametasona (2mg/kg) em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica. Nas imagens de tecidos coradas pelo P.A.S., observadas em um aumento total de 40X nota-se que o animal Basal, saudável (A), não apresenta alterações morfológicas na constituição do parênquima pulmonar como a hipertrofia ou hiperplasia de células caliciformes. Entretanto, o animal OVA, doente (B), apresenta evidências do aumento dessas células (seta). O tratamento por instilação nasal com MHTP nas doses de 2,5 (C) ou 5mg/kg (D) ou Dexametasona na dose de 2mg/kg (E) apresentaram parâmetros morfológicos semelhantes aos animais do grupo Basal, resultando na diminuição da hiperplasia e hipertrofia das células caliciformes e hiperprodução de muco em comparação com o grupo OVA.

Figura 14. Análise histopatológica inflamatória do MHTP em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica corados pela coloração P.A.S. (Ácido Periódico de Schiff).



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) foram sensibilizados e desafiados com Ovalbumina (OVA) e tratados via instilação nasal (i.n.) com 2,5 ou 5 mg/kg de MHTP ou com 2 mg/kg de Dexametasona 1 hora antes de cada desafio. O tecido pulmonar dos animais foi coletado 24h após o último desafio e realização da perfusão cardíaca. O pulmão foi submetido a técnica histológica e coloração por P.A.S. (Ácido Periódico de Schiff). O parâmetro observado é a hipertrofia ou hiperplasia de células caliciformes, evidenciadas pela coloração de PAS. Tecidos corados por P.A.S., vistos em microscópio óptico comum em aumento total de 40X.

5 DISCUSSÃO

A síntese do alcaloide tetrahydroisoquinolínico, codificado como MHTP [2-methoxy-4-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl) phenol], aplicando a reação de *Pictet-Spengler*, proporcionou rendimento de 93,45% do alcaloide. A produção em larga escala de compostos sintéticos biologicamente ativos é de grande valia, em detrimento a extração de compostos naturais, uma vez que, para se obter quantidades significativas de moléculas naturais, afim de realizar os ensaios toxicológicos e farmacológicos necessários para respaldar a molécula, demanda uma significativa extração vegetal. Em estudos anteriores foi demonstrado que o MHTP é um análogo estrutural da criptostilina II que possui atividade anti-inflamatória (AWUAH, CAPRETTA, 2010).

Estudos preliminares demonstraram a atividade anti-inflamatória aguda do MHTP no modelo experimental de peritonite induzida por zimosan. O pré-tratamento com o MHTP (2,5 ou 5mg/kg) por via oral, reduziu a migração de leucócitos bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) no peritônio desafiado com zimosan. Em adição, a administração endovenosa do MHTP promoveu um efeito hipotensor em ratos normotensos, induzindo o vasorrelaxamento, mediado pela via do NO e enzima guanilil ciclase (CORDEIRO, 2012).

A toxicidade aguda pré clínica do MHTP foi avaliada por Paiva-Ferreira e col. (2014), os resultados demonstraram baixa toxicidade aguda, com DL 50 maior que 1.000 mg/kg. A toxicidade aguda sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Autônomo (SNA) não foi observada. Em adição, não foi detectada alteração genotóxica, parâmetro esse, indicado para avaliação da presença crônica da molécula na corrente sanguínea e seu possível efeito mutagênico. Esses dados toxicológicos asseguram os estudos farmacológicos do MHTP (PAIVA-FERREIRA, 2014).

A atividade anti-inflamatória do MHTP foi estabelecida pela diminuição *in vitro* da produção de óxido nítrico (NO) e a produção/liberação de citocinas pró-inflamatórias em culturas de macrófagos peritoneais. Nos modelos experimentais de peritonite e de Lesão Pulmonar Aguda (LPA), o tratamento com MHTP foi capaz de

inibir a migração de leucócitos, principalmente das células polimorfonucleares e reduzir do exsudato proteico no pulmão. A atividade anti-edematogênica do MHTP foi avaliada em modelos experimentais de inflamação aguda induzidas por agentes flogísticos e relacionou-se a inibição da atividade da PGE₂, resultado esse, independente da desgranulação de mastócitos ou atividade da histamina (PACHECO DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Diante dos resultados expostos acima, sobre as atividades farmacológicas do MHTP, o presente estudo teve por objetivo, avaliar o efeito imunomodulador, por instilação nasal (i.n.), do alcaloide sintético tetrahydroisoquinolínico MHTP, no processo inflamatório pulmonar alérgico experimental induzido por Ovalbumina (OVA) semelhante a asma humana. Os parâmetros avaliados foram, migração de células inflamatórias e produção de citocinas no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF); quantificação sérica de IgE-OVA-específica e alterações histológicas pulmonares.

A farmacoterapia atual da asma é realizada, majoritariamente, pela administração, por via oral ou inalatória, de broncodilatadores associados a anti-inflamatórios esteroidais (SEUNG-HYUNG, *et al.*, 2012). A escolha da via de administração de um medicamento é de fundamental importância, na qual contribui, principalmente, para adesão do paciente ao tratamento. A utilização da via nasal para administração medicamentosa é uma técnica promissora devido à alta vascularização na região da superfície do nariz, eliminação do metabolismo de primeira passagem (porta-hepático), rápido início de ação farmacológica e fácil acessibilidade do paciente (NICOLINI *et al.*, 2010). Em adição, a instilação nasal (i.n.) é classificada como uma via eficiente, prática e fácil para administração medicamentosa e apresenta as características: muco-adesiva das partículas de muco do epitélio respiratório, promovendo um maior tempo de biodisponibilidade e maior absorção do fármaco na mucosa das vias respiratórias e diminuição dos efeitos sistêmicos secundários e toxicidade, observados no uso de corticoides (LEE *et al.*, 2006; DUGAS *et al.*, 2013).

Como descrito anteriormente o efeito anti-inflamatório do MHTP, por via oral, estabelecendo as doses efetivas em modelo de inflamação aguda o nosso trabalho objetivou avaliar o efeito do MHTP, por instilação nasal, em modelo de inflamação

pulmonar alérgica crônica, característica da asma alérgica, sendo essa uma resposta imune adaptativa tipo 2 (Th2).

A Imunoglobulina E (IgE) é classificada como o marcador biológico do fenótipo da asma alérgica mediada pela resposta imune tipo 2, devido ao seu papel imunológico nos processos alérgicos em geral. A produção de IgE é realizada pelos linfócitos B em decorrência da ativação via interação com os linfócitos T e suas citocinas IL- 4 e/ou IL-13 (GALLI *et al.*, 2012; AKDISM *et al.*, 2012). A função essencial da IgE é mediar as reações de hipersensibilidade imediata tipo 1. A ligação cruzada (alérgeno–IgE–receptor FcεRI) em mastócitos, leva sua desgranulação e liberação de mediadores inflamatórios locais, responsáveis pela resposta aguda na asma, também chamada de crise asmática (HOFMANN *et al.*, 2010). A IgE participa dos mecanismos de sobrevivência, proliferação, migração e ativação de mastócitos, os quais produzem uma variedade de citocinas e quimiocinas que atraem outras células associadas a imunomodulação nas afecções alérgicas (KASHIWAKURA *et al.*, 2011).

Nesse estudo demonstramos que o grupo basal (animal saudável), por não ser sensibilizado com o OVA, não apresentou IgE OVA-específica sérica. Entretanto, o grupo OVA apresentou a média do título sérico de IgE OVA-específica de 1:8.192, demonstrando, assim, que o protocolo de sensibilização experimental foi efetivo. O tratamento por via i.n. com o MHTP na dose de 5 mg/kg reduziu significativamente o título de IgE, sugerindo seu efeito imunomodulador na diminuição do processo de sensibilização alérgica.

Embora a administração de fármacos pela via nasal seja promissora, poucos grupos de pesquisa a utilizam em suas investigações. A pesquisa na literatura atual não apresenta trabalhos que demonstrem a utilização de moléculas com o núcleo isoquinólico e/ou tetrahydroisoquinolínico administrado por via instilação nasal no tratamento de modelos experimentais de doenças inflamatórias do trato respiratório.

Vieira e col. (2013) estudaram alcaloides isoquinolínicos da classe bisbenzilisoquinolínicos (warifteína e metilwarifteína) e morfínico (milonina) administrados por via instilação nasal no modelo experimental de asma alérgica. Foi observado que esses alcaloides não foram capazes de inibir a produção de IgE OVA-específica, portanto esses resultados sugerem que, devido a diversidade de núcleos

estruturais e tamanho da molécula, com adição de radicais no núcleo isoquinolinico desses alcaloides naturais (warifteina, metil warifteina e milonina), e sua administração por instilação nasal interferem na especificidade do sitio de ação do núcleo isoquinolinico e o acesso dessas moléculas aos seus alvos moleculares. Afetando assim a ação imunomoduladora desses compostos no quadro de asma alérgica.

Entretanto Bezerra-Santos e col. (2004) e Costa e col. (2008) demonstraram que a warifteina quando administrada por via oral no modelo experimental de asma alérgica induzida por OVA, promoveu inibição da produção de IgE – OVA específica bem como o edema de para induzido por OVA e retardou o choque anafilático. Esses dados sugerem que a via de administração de uma molécula como o alcaloide interfere na sua atividade biológica e sitio de ação, tendo em vista a complexidade metabólica e mecanística de absorção dos compostos químicos pelo organismo.

Um dos tratamentos de asma alérgica atualmente preconizado é a administração subcutânea do anticorpo monoclonal específico para IgE, Omalizumab (Xolair; Genentech / Roche e Novartis). Esse anticorpo tem a função de impedir a ligação da IgE aos mastócitos e basófilos e assim, diminuindo o processo de sensibilização (FAHY *et al.*, 1997; DJUKANOVIC *et al.*, 2004), de participar dos mecanismos de melhoria do controle da asma diminuindo as taxas de exacerbação das crises e permitindo a redução da dose de manutenção dos corticoides administrados por via oral (BUSSE *et al.*, 2001).

Um dos parâmetros característicos do processo inflamatório crônico da asma alérgica é o recrutamento de leucócitos para as vias aéreas. Afim de avaliar a migração celular, os leucócitos totais e diferenciais (agranulócitos: linfócitos e macrófagos; granulócitos: eosinófilos e neutrófilos) foram quantificados no Fluido do Lavado Broncoalveolar (BALF). O tratamento com o MHTP na dose de 2,5 mg/kg reduziu a migração de linfócitos no BALF. A dose de 5 mg/kg promoveu a redução da migração de leucócitos totais, linfócitos e macrófagos semelhante ao tratamento com a dexametasona. A maior dose de MHTP promoveu ainda a redução de forma significativa da migração de eosinófilos para as vias aéreas. A redução da migração de leucócitos promovida pelos tratamentos com o MHTP e dexametasona foi independente da migração de neutrófilos.

Uma das características essenciais da asma alérgica é uma migração significativa dos eosinófilos para os pulmões (DECKERS *et al.*, 2013). A ativação eosinofílica libera mediadores pró inflamatórios importantes para manutenção do processo inflamatório crônico das vias aéreas, como a proteína básica principal (MBP), proteína catiônica, LTC₄, PGE₂, tromboxanos e PAF. Os eosinófilos ainda tem a capacidade de sintetizar diversas citocinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13), quimiocinas (CCL5/RANTES e CCL11/ eotaxina – 1), TNF- α e TGF- β , onde todas essas moléculas atuam na patogênese do processo inflamatório crônico as vias aéreas (BANDEIRA-MELO *et al.*, 2002).

Estudos anteriores conduzidos por Vieira e col. (2013), demonstraram que o tratamento por i.n. com alcaloides bisbenzilisquinolinicos (warifteína e metilwarifteína) e morfínico (milonina) inibiram a migração de eosinófilos para as vias aéreas. Já o tratamento por via oral com a warifteína foi capaz de inibir a migração de eosinófilos para a cavidade pleural ou broncoalveolar, reduzindo os níveis de eotaxina, o número de corpúsculos lipídicos citoplasmáticos e da liberação de cistenil leucotrienos na asma alérgica experimental (BEZERRA-SANTOS *et al.*, 2006; CERQUEIRA-LIMA *et al.*, 2010). Esses dados inferem que o núcleo isoquinolinico presente em todas as classes dos alcaloides aqui apresentados, promove uma ação imunomoduladora na migração de eosinófilos para as vias aéreas, independente da via de administração pela qual está sendo realizada.

Para confirmar os resultados descritos acima utilizamos a técnica de citometria de fluxo, tendo em vista que essa técnica avalia as células pelo tamanho e granulosidade citoplasmática. A avaliação do percentual de granulócitos no BALF demonstrou um aumento da migração de granulócitos nos animais do grupo OVA em relação aos do grupo Basal e o tratamento com o MHTP na sua maior dose, assim como o tratamento com dexametasona promoveram uma redução do percentual de granulócitos no BALF.

Esses dados corroboram com a quantificação da migração celular de eosinófilos, uma vez que, embora os eosinófilos e neutrófilos pertençam a classe dos granulócitos, a população de eosinófilos em relação a de neutrófilos está em maior quantidade no processo inflamatório pulmonar característico da asma alérgica Th2.

Estes resultados sugerem uma ação imunomoduladora do MHTP sobre a migração de eosinófilos para as vias aéreas.

Os linfócitos T CD4⁺ auxiliares (LT *helper*) tem um papel fundamental na patogênese da asma e, o desenvolvimento do perfil Th2 que modula o processo inflamatório alérgico crônico das vias aéreas. As citocinas produzidas pelas células Th2 (IL-4, IL-13 e IL-5) promovem a produção de IgE, eosinofilia sérica e tecidual e hiper-reatividade das vias aéreas, uma vez que, os níveis destas citocinas estão aumentados no BALF de pacientes asmáticos (BLOEMEN *et al.*, 2007; FINKELMAN *et al.*, 2010). Um dos papéis imunológicos dos linfócitos T CD8⁺ é a produção da citocina IFN- γ , associado ao perfil Th1. Essa população celular promove um efeito antagônico do perfil Th2, e assim polarizando a resposta imunológica para o perfil Th1, participando de um dos mecanismos de supressão da inflamação crônica alérgica das vias aéreas (STOCK *et al.*, 2004).

Ao avaliar as subpopulações de linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ ou CD8⁺ no BALF, os animais do grupo OVA apresentaram um aumento na migração de linfócitos CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ em relação ao grupo Basal, corroborando assim com a quantificação de linfócitos, e demonstrando a presença e atuação desses leucócitos na imunomodulação do processo inflamatório crônico das vias aéreas característico da asma alérgica. O tratamento com o MHTP na dose de 5 mg/kg reduziu a migração de linfócitos CD3⁺, bem como a dexametosona. Em relação as subpopulações CD4⁺ ou CD8⁺ o tratamento com o MHTP promoveu a diminuição da subpopulação CD4⁺. No entanto, o MHTP não interferiu na migração de linfócitos T CD8⁺.

Esses dados sugerem a atividade imunomoduladora do MHTP sobre o perfil de células T CD4⁺, sendo esta população de células responsável por se diferenciar no perfil Th2, maestro da patogênese do quadro de asma alérgica experimental. Interessantemente não houve alteração na população de células CD8⁺ que em determinadas situações, regula negativamente o perfil Th2 por produzir a citocina IFN- γ , que antagoniza a polarização do perfil Th2.

A redução do influxo da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ para a cavidade pulmonar foi observada pelo tratamento via i.n. com os alcaloides bisbenzilisquinolinicos (metilwarifteina e warifteina) e com o alcaloide morfínico (milonina), no modelo de asma alérgica (VIEIRA, 2013). Esses dados em adição ao

demonstrado pelo tratamento com o MHTP inferem que a via de administração por instilação nasal propicia a ação imunoreguladora desses compostos sobre a migração das células responsáveis pela iniciação e manutenção de todo o quadro fisiopatológico observado na inflamação pulmonar crônica alérgica característico da asma alérgica Th2. Inibindo assim, a migração das células T CD4⁺ para o sítio inflamatório pulmonar.

A citocina responsável por promover a polarização dos linfócitos T CD4⁺ auxiliares em Th2 é a IL-4, que, por via da sua ligação ao receptor IL-4R presente nos linfócitos Th0 (virgens), promove a ativação da Janus tirosina-quinase (JAK) e transdução de sinal por STAT6 (MAIER *et al.*, 2012) e assim ativação da transcrição de genes alvo (WALFORD *et al.*, 2013; AGGARWAL *et al.*, 2014) tais como genes para IL-4, IL-13 e IL-5. A IL-4 participa do processo de remodelamento das vias aéreas por estimulação de fibroblastos; indução dos linfócitos B a produzir e secretar IgE e regulação positiva de moléculas de adesão que permitem a migração de leucócitos para as vias aéreas (STEINKE *et al.*, 2001). A IL-13 atua semelhante a IL-4, em parte, devido ao compartilhamento do receptor de IL-4, no qual a IL-13 se liga a cadeia α do IL-4R (KIPS, 2001). A imunomodulação pela IL-13 promove a migração e regulação positiva de moléculas de adesão, hiperplasia e metaplasia das células caliciformes, hiperprodução de muco, fibrose tecidual e contribui para a hiperreatividade das vias respiratórias (BRIGHTLING *et al.*, 2010), sendo esta citocina um dos mecanismos que mantém a inflamação crônica das vias aéreas (TOMLINSON *et al.*, 2010).

Nesse estudo, ao se quantificar as citocinas do perfil Th2, IL-4 e IL-13, observou-se um aumento dessas citocinas no grupo OVA em relação ao grupo Basal, confirmando a modulação positiva para o perfil celular Th2 no modelo de inflamação pulmonar estudado. O tratamento com o MHTP ou dexametasona diminuiu a produção dessas citocinas. Esses resultados comprovam o efeito imunomodulador do MHTP sobre o perfil Th2.

Vieira e col. (2013) demonstraram que o alcaloide bisbenzilisquinolinico metilwarifteina, administrado por via instilação nasal, foi capaz de inibir a produção da citocina IL-13, resultado não visto com o tratamento pelo mesma via de administração com a warifteina, onde ambos alcaloides são da mesma classe e se

diferenciam apenas pela metilação e formação de um grupo metoxila, na metilwarifteina. Como o MHTP, possui grupos metoxilas em sua estrutura, e ambos alcaloides metoxilados (MHTP e metilwarifteina) apresentaram atividade imunorreguladora sobre a produção de IL-13, sugerimos a interação do grupo metoxila com os alvos moleculares relacionados a produção de IL-13.

Devido ao compartilhamento de receptores entre a IL-4 e IL-13 e a função da IL-13 estar voltada a manutenção do processo inflamatório crônico das vias aéreas, anticorpos monoclonais para o tratamento da asma estão na fase 2 dos estudos clínicos. O Lebrikizumab (Genentech / Roche), impede a interação da IL-13 com seu receptor IL-4R α inibindo a ação e produção de IL-13 e de seus receptores IL-13R α 1 e IL-4R α . O dupilumab (Regeneron Pharmaceuticals) se liga ao receptor IL-4R α e bloqueia ambas as vias de IL-4 e IL-13 (NOONAN *et al.*, 2013). O tratamento por via sub cutânea com esses anticorpos promove a melhora da função pulmonar e diminui as taxas de exacerbações da asma (HANANIA *et al.*, 2014).

Atualmente estudos revelam que outras subpopulações de linfócitos T estão envolvidas na patogênese do asma. Dentre essas, as células Th17. O perfil Th17 produz majoritariamente a citocina IL-17, a qual participa da hiper-reatividade e do processo inflamatório das vias aéreas (MCGEE *et al.*, 2010). A IL-17 atua em células epiteliais e endoteliais levando a indução de citocinas pró-inflamatórias (TAN *et al.*, 2013); do recrutamento de neutrófilos (FOGLI *et al.*, 2013), bem como a hiperplasia das células caliciformes das vias aéreas (HERBERT *et al.*, 2013), atuando na manutenção do processo inflamatório crônico na asma (BAJORIUNIENE *et al.*, 2013).

Nesse trabalho observamos que houve um aumento da IL-17 no grupo OVA em comparação ao grupo Basal. O tratamento com o MHTP ou dexametasona diminuiu a produção dessa citocina, sugerindo o efeito imunodulador sobre o perfil Th17. Entretanto estudos adicionais deverão ser realizados para comprovar tal hipótese.

Um dos mecanismos reguladores fisiológicos do perfil Th2 é o desenvolvimento do perfil Th1. Essa população de células é responsável, pela produção da citocina IFN- γ que antagoniza o desenvolvimento do perfil Th2 (ROBINSON, 2010).

Com o objetivo de determinar o mecanismo imunodulador do MHTP frente a regulação dos perfis Th2/Th1, mensuramos a produção de IFN- γ no BALF e observamos que o tratamento com o MHTP não alterou os níveis dessa citocina. Esse resultado sugere que o efeito imunomodulador do MHTP não está diretamente relacionado com o desenvolvimento do perfil Th1 e supressão do perfil Th2, mas sim modula as moléculas relacionadas ao perfil Th2.

Outro mecanismo regulador do perfil Th2 está diretamente relacionado a produção da citocina IL-10 produzida majoritariamente por células denominadas T reguladoras (Treg) (UMETSU *et al.*, 2006; ROBINSON, 2010). Essas células fazem parte da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ que expressam o fator de transcrição Foxp3 e são responsáveis pela indução e manutenção da tolerância imunológica (LANGIER *et al.*, 2012).

A IL-10 é classificada como uma citocina anti-inflamatória devido a ligação ao seu receptor (IL-10R) expresso em células mielóides e linfóides (URRY *et al.*, 2006), induz anergia celular via inibição da molécula co-estimulatória CD28, além de inibir a ativação de basófilos, neutrófilos, mastócitos e eosinófilos (CHUNG, 2001).

Nesse trabalho observou-se que o tratamento com o MHTP por instilação nasal nos animais sensibilizados e desafiados com OVA promoveu a diminuição da IL-10. Dado este não esperado, pois o MHTP foi capaz de reduzir os diversos parâmetros inflamatórios característicos do processo de inflamação crônica alérgica pulmonar experimental anteriormente apresentados. Diante do exposto, a diminuição de IL-10, como parâmetro anti-inflamatório mensurado, sugere que a atividade imunoduladora do MHTP é independente da ativação das células Treg.

Com o objetivo de visualizar no tecido pulmonar a migração de células inflamatórias e as características histopatológicas, além da produção de muco utilizamos as análises histológicas pela coloração com hematoxilina-eosina (HE) e pela coloração PAS (Ácido Periódico de Schiff) respectivamente. Nos tecidos pulmonares oriundos dos animais sensibilizados e desafios com OVA e/ou tratados foram quantificados os parâmetros inflamatórios como migração celular e formação de anéis de células no espaço perivascular e peribroncoalveolar, vasodilatação, perda da integridade epitelial bronquiolar e entupimento alveolar. No grupo OVA evidenciou-se uma intensa migração de células com formação de anéis celulares e

perda da integridade epitelial com vasodilatação e entupimento alveolar quando comparado com o tecido pulmonar de animais do grupo Basal (animais saudáveis). O tratamento com o MHTP na dose de 5 mg/kg reestabeleceu os parâmetros avaliados isto é, diminuição da migração de células inflamatórias e manutenção da integridade da camada epitelial semelhante ao resultado observado com a administração via instilação nasal com dexametasona,

Na avaliação da produção de muco e hiperplasia das células caliciformes o grupo OVA evidenciou um aumento destes parâmetros quando comparado com o grupo Basal. Entretanto, o tratamento com o MHTP ou dexametasona induziu a redução destes parâmetros resgatando a integridade do tecido pulmonar. Estes resultados corroboram com os dados anteriormente discutidos, uma vez que, a partir da imunomodulação do perfil Th2 e do perfil Th17, ocorre uma diminuição na produção de citocinas responsáveis pelo estabelecimento e manutenção do processo inflamatório tipo 2 (Th2), resgatando portanto a homeostasia do tecido

A instilação nasal de warifteina ou metilwarifteina promoveu a diminuição dos parâmetros histopatológicos (migração de células inflamatórias para a cavidade pulmonar e hiperprodução de muco) (VIEIRA,2013) de forma semelhante aos descritos no presente trabalho no modelo experimental de asma.

Portanto, tendo como base os resultados demonstrados nesse trabalho e sua correlação com a literatura, podemos sugerir que os alcaloides contendo o núcleo isoquinolínico, administrados pela via de instilação nasal, frente a um quadro de inflamação crônica alérgica das vias aéreas e asma alérgica, modulam o perfil Th2 e assim amenizam a maioria dos parâmetros associados as complicações dessa doença.

6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo, demonstram o efeito imunomodulador do alcaloide sintético tetrahidroisoquinolínico, MHTP, administrado via instilação nasal, no modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica.

Sua atividade imunomoduladora está associada à inibição da migração de células inflamatórias bem como a produção de citocinas e muco, as quais ocasionam dano tecidual pulmonar. O MHTP promove uma restauração do equilíbrio fisiológico diante um processo inflamatório pulmonar crônico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A plea to abandon asthma as a disease concept. **Lancet**. v.368, p.705, 2006.

AGGARWAL, A.; AGRAWAL, D.K. Importins and exportins regulating allergic immune responses. **Mediators Inflammation**. v.2014, 14 pages, 2014.

AKDISM, M.; AKDIS, C.A. IgE class switching and cellular memory. **Nature Immunology**. v.13, p.312–314, 2012.

ANDERSON, G.P. Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. **Lancet**. v.372, p.1107–1119, 2008.

AWUAH, E, CAPRETTA, A. Strategies and Synthetic Methods Directed Toward the Preparation of Libraries of Substituted Isoquinolines. **The Journal of Organic Chemistry**. v.75, p.5627-5634, 2010.

BAJORIUNIENE, I.; MALAKAUSKAS, K.; LAVINSKIENE, S.; JEROCH, J.; SAKALAIUSKAS, R. Th17 response to dermatophagoides pteronyssinus is related to late-phase airway and systemic inflammation in allergic asthma. **International Immunopharmacology**. v.17, p.1020–1207, 2013.

BANDEIRA-MELO, C.; BOZZA, P.T.; WELLER, P.F. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.109, p.393–400, 2002.

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

BARNES, P. J; ADCOCK, I.M. How do corticosteroids work in asthma? **Annual International Medicine**. v.139, p.359-370, 2003.

BARNES, P. J. Molecular mechanisms of antiasthma therapy. **Annales of Medicine**. v.27, n.5, p.531-535, 1995.

BEZERRA-SANTOS, C.; R., BALESTIERI, F.M.P.; ROSSI – BERGMANN, B.; PEÇANHA, L.M.T.; PIUVEZAM, M.R. Cissampelos sympodialis Eich. (Menispermaceae): oral treatment decreases IgE levels and induces a Th-1 skewed cytokine production in ovalbumin – sensitized mice. **Journal of Ethnopharmacology** . v. 95, p.1991–1997, 2004.

BEZERRA-SANTOS, C.; R., VIEIRA-DE-ABREU, A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BANDEIRA-MELO, C.; PIUVEZAM, M.R.; BOZZA, P.T. Anti-allergic properties of Cissampelos sympodialis and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**. v. 6, p.1152–1160, 2006.

BLOEMEN, K.; VERSTRAELEN, S.; VAN DEN HEUVEL, R.; WITTERS, H.; NELISSEN, I.; SCHOETERS, G. The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung. **Immunology Letters Journal**. v.113, p.6–18, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Informações de saúde. [Citado em 23 de janeiro de 2015. Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/570-perguntas-e-respostas/35040-asma-atinge-6-4-milhoes-de-brasileiros>, 2015.

BRIGHTLING, C.E.; SAHA, S.; HOLLINS, F. Interleukin-13: Prospects for new treatments. **Clinical and Experimental Allergy**. v.40, p.42–49, 2010.

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

BORISH, L.C.; HAROLD, S. N.; LANZ, M.J.; CLAUSSEN, L.; WHITMORE, J.B.; AGOSTI, J.M.; GARRISON, L. Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II randomized, placebo-controlled trial. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.160, p.1816–1823, 1999.

BUSSE, W.; CORREN, J.; LANIER, B.Q.; MCALARY, M.; FOWLER-TAYLOR, A.; CIOPPA, G.D.; VAN AS, A.; GUPTA, N. Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.108, p.184–190, 2001.

CERQUEIRA – LIMA, A.T.; ALCÂNTARA – NEVES, N. M.; DE CARVALHO, L.C.; COSTA, R. S.; BARBOSA – FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M.; MOMTCHILLO, R.; BARBOZA, R.; DE JESUS OLIVEIRA, E.; MARINHO, A.; FIGUEIREDO, C. A. Effects of Cissampelos sympodialis Eichl. and it is alkaloid, warifteine, in an experimental modelo of respiratory allergy to Blomia tropicalis. **Current Drug Targets**. v.11, n.11, p.1458 – 1467, 2010.

CHENG, D.; XUE, Z.; YI, L.; ZHANG, H.S.K.; HUO, X.; BONSER, L.R.; ZHAO, J.; XU, Y.; ERLE,D.J.; ZHEN, G. Epithelial interleukin-25 is a key mediator in TH2-high, corticosteroid-responsive asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.190, p.639–648, 2014.

CHUNG, F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: Interleukin-10, interleukin-12, interferon-gamma. **Mediators of Inflammation**. v.10, p.51–59, 2001.

CORDEIRO, M. B. **Aplicação da reação de Pictet-Spengler na síntese de alcaloides fenil tetra hidroisoquinolínicos inéditos**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2012.

CORRY, D.B.; FOLKESSON, H.G.; WARNOCK, M.L.; ERLE, D.J.; MATTHAY, M.A.; WIENER-KRONISH, J.P.; LOCKSLEYET, R.M. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. **The Journal of Experimental Medicine**. v.183, p.109–117, 1996.

COSTA, H.F.; BEZERRA-SANTOS, C.R.; BARBOSA FILHO, J.M.; MARTINS, M.A.; PIUVEZAM, M.R. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. **International Immunopharmacology**. v.8, p.519–525, 2008.

COYLE, A.J., PERRETTI, F., MANZINI, S., IRVIN, C.G. Cationic protein-induced sensory nerve activation: role of substance P in airway hyperresponsiveness and plasma protein extravasation. **The Journal of Clinical Investigation**. v.94, p.2301–2306, 1994.

COYLE, A.J., ACKERMAN, S.J., BURCH, R., PROUD, D., IRVIN, C.G. Human eosinophil-granule major basic protein and synthetic polycations induce airway hyperresponsiveness in vivo dependent on bradykinin generation. **The Journal of Clinical Investigation**. v.95, p.1735–1740, 1995.

DECKERS, J.; BRANCO-MADEIRA, F.; HAMMAD, H. Innate immune cells in asthma. **Trends in Immunology Journal**. v.34, p.540–547, 2013.

DEL, C. A.; MULLOL, J.; BARTRA, J.; DAVILA, I.; JÁUREGUI, I.; MONTORO, J.; SASTRE, J.; VALERO, A. L. Comparative pharmacology of the H1 anti-histamines. **Journal of Investigation in Allergology and Clinical Immunology**. v.16, p.3-12, 2016.

DJUKANOVIC, R.; WILSON, S.J.; KRAFT, M.; JARJOUR, N.N.; STEEL, M.; CHUNG, K.F.; BAO, W.; FOWLER-TAYLOR, A.; MATTHEWS, J.; BUSSE, W.W.; HOLGATE, S.T.; FAHY, J.V. Effects of treatment with antiimmunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.170, p.583–593, 2004.

DOE, C.; BAFADHEL, M.; SIDDIQUI, S.; DESAI, D.; MISTRY, V.; RUGMAN, P.; MCCORMICK, M.; WOODS, J.; MAY, R.; SLEEMAN, M.A.; ANDERSON, I.K.; BRIGHTLING, C.E. Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. **Chest Journal**. v.38, p.1140–1147, 2010.

DUGAS, H. L.; PETERS, J. I.; WILLIAMES, R. O. 3RD. Nebulization of mycophenolate mofetil inhalation suspension in rats. Comparison with oral and pulmonary administration of cellcept. **International Journal of Pharmaceutics**. v.441, p.19-29, 2013.

EDWARDS, M. R.; BARTLETT, N. W.; HUSSELL, T.; OPENSHAW, P.; JOHNSTON, S. L. The microbiology of asthma. **Nature Reviews Microbiology**. v.10, p.459-471, 2012.

FAHY, J.V.; FLEMING, H.E.; WONG, H.H.; LIU, J.T.; SU, J.Q.; REIMANN, J.; FICK, R.B.; BOUSHEY, H.A. The effect of an anti-IgE monoclonal antibody on the early- and late-phase responses to allergen inhalation in asthmatic subjects. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.155, p.1828–1834, 1997.

FINKELMAN, F.D.; HOGAN, S.P.; HERSHEY, G.K.; ROTHENBERG, M.E.; WILLS-KARP, M. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. **The Journal of Immunology**. v.184, p.1663–1674, 2010.

FITZPATRICK, A.M.; TEAGUE, G.W.; MEYERS, D.A.; PETERS, S.P.; LI, X.; LI, H.; WENZEL, S.E.; AUJLA, S.; CASTRO, M.; BACHARIER, L.B.; GASTON, B.M.; BLEECKER, E.R.; MOORE, W.C. Heterogeneity of severe asthma in childhood: confirmation by cluster analysis of children in the National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.127, p.382–389, 2011.

FLOOD-PAGE, P.; SWENSON, C.; FAIFERMAN, I.; MATTHEWS, J.; WILLIAMS, M.; BRANNICK, L.; ROBINSON, D.; WENZEL, S.; BUSSE, W.; HANSEL, T.T.; BARNES, N.C. A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.176, p.1062–1071, 2007.

FOGLI, L.K.; SUNDRUD, M.S.; GOEL, S.; BAJWA, S.; JENSEN, K.; DERUDDER, E.; SUN, A.; COFFRE, M.; UYTENHOVE, C.; SNICK, J.V.; SCHMIDT-SUPPRIAN, M.; RAO, A.; GRUNIG, G.; DURBIN, J.; CASOLA, S.S.; RAJEWSKY, K.; KORALOV, S.B. T cell-derived IL-17 mediates epithelial changes in the airway and drives pulmonary neutrophilia. **The Journal of Immunology**. v.191, p.3100–3111, 2013.

GALLI, S.J.; TSAI M. Ige and mast cells in allergic disease. **Nature Medicine**. v.18, p.693–704, 2012.

GAUVREAU, G.M.; BOULET, L.P.; COCKCROFT, D.W.; FITZGERALD, J.M.; CARLSTEN, C.; DAVIS, B.E.; DESCHESNES, F.; DUONG, M.; DURN, B.L.; HOWIE, K.J.; HUI, L.; KASAIAN, M.T.; KILLIAN, K.J.; STRINICH, T.X.; M. WATSON, R.M.; NATHALIE, Y.; ZHOU, S.; RAIBLE, D.; PAUL, M. O. Effects of interleukin-13 blockade on allergen-induced airway responses in mild atopic asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.183, p.1007–1014, 2011.

GAVETT, S.H.; O'HEARN, D.J.; LI, X.; HUANG, S.K.; FINKELMAN, F.D.; KARP, M.W. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and TH2 cytokine expression in mice. **The Journal of Experimental Medicine**. v.182, p.1527–1536, 1995.

GREEN, R.H.; BRIGHTLING, C.E.; MCKENNA, S.; HARGADON, B.; PARKER, D.; BRADDING, P.; WARDLAW, A.J.; PAVORD, I.D. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. **Lancet**. v.360, p.1715–1721, 2002.

HALLSTRAND, T.S.; MOODY, M.W.; AITKEN, M.L.; HENDERSON, W.R. JR. Airway immunopathology of asthma with exercise-induced bronchoconstriction. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.116, p.586–593, 2005.

HANANIA, N.A.; NOONAN, M.J.; CORREN, J.; KORENBLAT, P.; ZHENG, Y.; PUTNAM, W.; MURRAY, E.; ABELARDO, C.; SCHEERENS, H.; MACIUCA, R.; GRAY, S.; DOYLE, R.; MCCLINTOCK, D.; MATTHEWS, J.G.; YEN, K. Efficacy and safety of lebrikizumab in severe uncontrolled asthma: results from the Lute and Verse Phase II randomized, doubleblind, placebo-controlled trials. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.133, abstr. AB402, 2014.

HERBERT, C.; SHADIE, A.M.; KUMAR, R.K. Interleukin-17 signalling in a murine model of mild chronic asthma. **International Archives of Allergy and Immunology**. v.162, p.253–26, 2013.

HOFMANN, A.M.; ABRAHAM, S.N.; New roles for mast cells in pathogen defense and allergic disease. **Discovery Medicine**. v.9, p.79–83, 2010.

HOLGATE, S. T; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**. v.3, p.218-230, 2008.

HOTAMISLIGIL, G.S.; SHARGILL, N.S; SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**. v.259, p.87–91, 1993.

HUMBERT, M.; GRANT, J.A.; TABORDA-BARATA, L.; DURHAM, S.R.; PFISTER, R.; MENZ, G.; BARKANS, J.; YING, S.; KAY, A.B. High-affinity IgE receptor (Fc ϵ RI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.153, p.1931–1937, 1996.

KATO, T.; TAKEDA, Y.; NAKADA, T.; SENDO, F. Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis in vitro. **Nature Immunology**. v.14, p.198–208, 1995.

KASHIWAKURA, J.; OTANI, I.M.; KAWAKAMI, T. Monomeric IgE and mast cell development, survival and function. **Advances in Experimental Medicine and Biology Journal**. v.716, p.29–46, 2011.

KIPS, J.C. Cytokines in asthma. **European Respiratory Journal**. v.34, p.24s–33s, 2001.

LAJOIE, S.; LEWKOWICH, I.P.; SUZUKI, Y.; CLARK, J.R.; SPROLES, A.A.; DIENGER, K.; BUDELSKY, A.L.; KARP, M.W. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. **Nature Immunology**. v.11, p.928–935, 2010.

LANGIER, S.; SADE, K.; KIVITY, S. Regulatory T cells in allergic asthma. **The Israel Medical Association Journal**. v.14, p.180–183, 2012.

LEANDER, K.; LUNING, B.; RUUSA, E. Studies on Orchidaceae Alkaloids XI.* Three 1-Phenyl-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinolines from *Crypstostylis fulva* Schltr. **Acta Chénica Scandinavica**. v.23, p.244-248, 1969.

LECKIE, M.J.; BRINKE, A.T.; 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.; STERK, P.J.; 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, D. W.; SHIRLEY, S. A.; LOCKEY, R. F.; MOHAPATRA, S. S. Thiolated chitosan nanoparticles enhance anti-inflammatory effects of intranasally delivered theophylline. **Respiratory Research**. v.24, p.1-10, 2006.

LLOYD, C.M.; GONZALO, J.; NGUYEN, T.; DELANEY, T.; TIAN, J.; OETTGEN, H.; COYLE, A.J.; GUTIERREZ-RAMOS, J.C. Resolution of bronchial hyperresponsiveness and pulmonary inflammation is associated with IL-13 and tissue leukocyte apoptosis. **Journal of Immunology**. v.166, p.2033-2040, 2000.

LLOYD, C. M.; HESSEL, E. M. Functions of T cells in asthma: more than Just Th2 cells. **Nature**. v.10, p.838-848, 2010.

LÖTVALL, J.; AKDIS, C.A.; BACHARIER, L.B.; BJERMER, L.; CASALE, T.B.; CUSTOVIC, A.; LEMANSKE, R.F.J.; WARDLAW, A.J.; WENZEL, S.E.; GREENBERGER, P.A. Asthma endotypes: a new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.127, p.355–360, 2011.

MAIER, E.; DUSCHL, A.; HOREJS-HOECK, J. STAT6-dependent and -independent mechanisms in Th2 polarization. **European Journal of Immunology**. v.42, p.2827–2833, 2012.

MANEECHOTESUWAN, K.; YAO, X.; ITO, K.; JAZRAWI, E.; USMANI, O.S.; ADCOCK, I.M.; BARNES, P.J. Suppression of GATA-3 nuclear import and phosphorylation: a novel mechanism of corticosteroid action in allergic disease. **PLoS Med**. v.6 (5), e1000076, 2009.

MATHEW, J.; ARONOW, W. S.; CHANDY, D. Therapeutic options for severe asthma. **Archives of Medical Science**. v.8, n.4, p.589-597, 2012.

MCGEE, H.S.; STALLWORTH, A.L.; AGRAWAL, T.; SHAO, Z.; LORENCE, L.; AGRAWAL, D.K. Fms-like tyrosine kinase 3 ligand decreases T helper type 17 cells and suppressors of cytokine signaling proteins in the lung of house dust mite-sensitized and -challenged mice. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v.43, p.520–529, 2010.

MCKINLEY, L.; ALCORN, J.F.; PETERSON, A.; DUPONT, R.B.; KAPADIA, S.; LOGAR, A.; HENRY, A.; IRVIN, C.G.; PIGANELLI, J.D.; RAY, A.; KOLLS, J.K. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. **The Journal of Immunology**. v.181, p.4089–4097, 2008.

MIRANDA, C.; BUSACKER, A.; BALZAR, S.; TRUDEAU, J.; WENZEL, S.E. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.113, p.101–108, 2004.

MINOR, D.L.; WYRICK, S.D.; CHARIFSON, P.S.; WATTS, V.J.; NICHOLS, D.E.; MAILMA, R.B. Synthesis and Molecular Modeling of 1-Phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines and Related 5,6,8,9 Tetrahydro-13bHdibenzo[a,h]quinolizines as D1 Dopamine Antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**. v.37 (25), p.4317–4328, 1994.

MOORE, W.C.; MEYERS, D.A.; WENZEL, S.E.; TEAGUE, W.G.; LI, H.; LI, X.; D'AGOSTINO, R.; CASTRO, M.; EVERETT, D.C.; FITZPATRICK, A.M.; GASTON, B.; JARJOUR, N.N.; SORKNESS, R.; CALHOUN, W.J.; CHUNG, K.F.; COMHAIR, S.A.A.; DWEIK, R.A.; ISRAEL, E.; PETERS, S.P.; BUSSE, W.W.; ERZURUM, S.C.; BLEECKER, E.R. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.181, p.315–323, 2010.

MUNCHHOF, M.J.; MEYERS, A.I. A Novel Route to Chiral, Nonracemic 1-Alkyl- and 1-Aryl-Substituted Tetrahydroisoquinolines. Synthesis of (-)-Salsolidine and (+)-Cryptostyline II. **Journal of Organic Chemistry**. v.60 (22), p.7086–7087, 1995.

NICOLINI, G.; CREMONESI, G.; MELANI, A. S. Inhaled corticosteroid therapy with nebulized beclometasone dipropionate. **Pulmonary Pharmacology e Therapeutics**. v.23, p.145-155, 2010.

NILSSON, M.; JOHNSEN, R.; YE, W.; HVEEM, K.; LAGERGREN, J. Obesity and estrogen as risk factors for gastroesophageal reflux symptoms. **Journal of the American Medical Association**. v.290, p.66–72, 2003.

NOONAN, M.; KORENBLAT, P.; MOSESOVA, S.; SCHEERENS, H.; ARRON, J.R.; ZHENG, Y.; PUTNAM, W.S.; PARSEY, M.V.; BOHEN, S.P.; MATTHEWS, J.G. Dose-ranging study of lebrikizumab in asthmatic patients not receiving inhaled steroids. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.132, p.567–574 e.12, 2013.

PACHECO DE OLIVEIRA, M.T.; DE OLIVEIRA RAMALHO, T.R.; PAIVA FERREIRA, L.K.; ARAÚJO LIMA, A.L.; BARBOSA CORDEIRO, M.; FERREIRA COSTA, H.; RODRIGUES, L.C.; PIUVEZAM, M.R. Synthesis, toxicity study and anti-inflammatory effect of MHTP, a new tetrahydroisoquinoline alkaloid. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**. v.37 (4) p.400-412, 2015.

PAIVA FERREIRA, L.K.D. **Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica e genotoxicidade do alcaloide sintético MHTP [1-(3- metoxi- 4-hidroxifenil)-7- metoxi-1,2,3,4,- tetrahidroisoquinolina]**. Trabalho de conclusão de graduação: Farmácia. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2014.

PAKHALE, S.; DOUCETTE, S.; VANDEMHEEN, K.; BOULET, L.P.; MCIVOR, R.A.; FITZGERALD, J.M.; HERNANDEZ, P.; LEMIERE, C.; SHARMA, S.; FIELD, S.K.; ALVAREZ, G.G.; DALES, R.R.; AARON, S.D. A comparison of obese and nonobese people with asthma: exploring an asthma-obesity interaction. **Chest**. v.137, p.1316–1323, 2010.

PELLATON-LONGARETTI, C.; BOUDOUSQUIE, C.; BARBIER, N.; BARNEY, C.; ARGIROFFO, C. B.; DONATI, Y.; SAUTY, A.; SPERTINI, F. CD4+CD25-mTGFβ+ T cells induced by nasal application of ovalbumin transfer tolerance in a therapeutic model of asthma. **International Immunology**. v.23, p.17-27, 2010.

ROBINSON, D.S.; HAMID, Q.; YING, S.; TSICOPOULOS, A.; BARKANS, J.; BENTLEY, A.M.; CORRIGAN, C.; DURHAM, S.R.; KAY, A.B. Predominant Th2-like

bronchoalveolar T lymphocyte population in atopic asthma. **New England Journal of Medicine**. v.326, p.298–304, 1992.

ROBINSON, D.S. The role of the T cell in asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.126, p.1081–1093, 2010.

RODRIGUES-PALMERO, M.; HARA, T.; THUMBS, A.; HUNIG, T. Triggering of T cell proliferation through CD28 induces GATA3 and promotes T helper type 2 differentiation in vitro and in vivo. **European Journal of Immunology**. v.29, p.3914–3924, 1999.

SEUNG-HYUNG, K.; BOK-KYU, K.; YOUNG-CHEOL, L. Effects of Corni fructus on ovalbumin-induced airway inflammation and airway hyperresponsiveness in a mouse model of allergic asthma. **Journal of Inflammation**. v.9, p.2-12, 2012.

SIMPSON, A.; TAN, V.Y.F.; WINN, J.; SVENSÉN, M.; BISHOP, C.M.; HECKERMAN, D.E.; BUCHAN, I.; CUSTOVIC, A. Beyond atopy: multiple patterns of sensitization in relation to asthma in a birth cohort study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.181, p.1200–1206, 2010.

SIMPSON, J.L.; SCOTT, R.J.; BOYLE, M.J.; GIBSON, P.G. Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.172, p.559–565, 2005.

SLAGER, R.E.; LI, H.; MOORE, W.; HAWKINS, G.; PETERS, S.P.; BUSSE, W.W.; CASTRO, M.; CHUNG, K.F.; ERZURUM, S.C.; FITZPATRICK, A.M.; GASTON, B.; TEAGUE, W.G.; ISRAEL, E.; JARJOUR, N.N.; WENZEL, S.E.; CALHOUN, W.J.; MEYERS, D.A.; BLEECKER E.R. Predictive model of severe atopic asthma phenotypes using interleukin-4/13 pathway polymorphisms. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.183, A1332, 2011.

SOLÈR, M.; MATZ, J.; TOWNLEY, R.; BUHL, R.; O'BRIEN, J.; FOX, H.; THIRLWELL, J.; GUPTA, N.; CIOPPA, G.D. The anti-IgE antibody omalizumab reduces exacerbations and steroid requirement in allergic asthmatics. **European Respiratory Journal**. v.18, p.254–261, 2001.

STEINKE, J.W.; BORISH, L. Th2 cytokines and asthma. interleukin-4: Its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. **Respiratory Research**. v.2, p.66–70, 2001.

STOCK, P.; KALLINICH, T.; AKBARI, O.; QUARCOO, D.; GERHOLD, K.; WAHN, U.; UMETSU, D.T.; HAMELMANN, E. CD8(+) T cells regulate immune responses in a murine model of allergen-induced sensitization and airway inflammation. **European Journal of Immunology**. v.34, p.1817–1827, 2004.

TAN, H.L.; ROSENTHAL, M. IL-17 in lung disease: Friend or foe? **Thorax**. v.68, p.788–790, 2013.

TANG, Y.; GUAN, S. P.; CHUA, B.Y.; ZHOU, Q.; HO, A.W.; WONG, K.H.; WONG, K.L.; WONG, W.S.; KEMENDY, D.M. Antigen-specific effector CD8 T cells regulate

allergic responses via IFN- γ and dendritic cell function. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.129, p.1611-1620, 2012.

TOMLINSON, K.L.; DAVIES, G.C.; SUTTON, D.J.; PALFRAMAN, R.T. Neutralisation of interleukin-13 in mice prevents airway pathology caused by chronic exposure to house dust mite. **PLoS One**. v.10 (5), e13136, 2010.

TSUCHIYA, K.; ISOGAI, S.; TAMAOKA, M.; INASE, N.; AKASHI, T.; MARTIN, J.G.; YOSHIZAWA, Y. Depletion of CD8⁺ T cells enhances airway remodelling in a rodent model of asthma. **Immunology**. v.126, p.45–54, 2009.

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

URRY, Z.; XYSTRAKIS, E.; HAWRYLOWICZ, C.M. Interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Current Allergy and Asthma Reports**. v.6, p.363–371, 2006.

VAN RIJT, L.S.; VOS, N.; HIJDRA, D.; DE VRIES, V.C.; HOOGSTEDEN, H.C.; LAMBRECHT, B.N. Airway eosinophils accumulate in the mediastinal lymph nodes but lack antigen-presenting potential for naive T cells. **The Journal of Immunology**. v.171, p.3372–3378, 2003.

VAN RIJT, L.S.; KUIPERS, H.; VOS, N.; HIJDRA, D.; HOOGSTEDEN, H.C.; LAMBRECHT, B.N. A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. **Journal of Immunology Methods**. v.288, p.111–121, 2004.

VIEIRA, G.C.; FEITOSA - DE - LIMA, J.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; MASCARENHAS, S.R.; BEZERRA - SANTOS, C.R.; PIUVEZAM, M.R. Inhaled *Cissampelos sympodialis* down-regulates airway allergic reaction by reducing CD3⁺ T cells. **Phytotherapy Research**. v.13, p.1-10, 2012.

VIEIRA, G. C. **Análise celular e molecular do efeito da instilação nasal do extrato das folhas de *Cissampelos sympodialis* EICHL (*Menispermaceae*) e seus alcaloides no processo alérgico experimental**. Tese (Doutorado em Produtos Naturais Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2013.

WALFORD, H.H.; DOHERTY, T.A. STAT6 and lung inflammation. **JAK STAT**. v.2 (4), e25301, 2013.

WENZEL, S.; WILBRAHAM, D.; FULLER, R.; GETZ, E.B.; LONGPHRE, M. Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies. **Lancet**. v.370, p.1422–1431, 2007.

WENZEL, S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nature Medicine**. v.18, p.716–725, 2012.

WILLIAMS, C. M.; GALLI, S. J. They diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.105, n.5, p.847-859, 2000.

WILLS-KARP, M.; LUYIMBAZI, J.; XU, X.; SCHOFIELD, B.; NEBEN, T.Y.; KARP, C.L.; DONALDSON, D.D. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. **Science**. v.282, p.2258–2261, 1998.

WOODRUFF, P.G.; MODREK, B.; CHOY, D.F.; JIA, G.; ABBAS, A.R.; ELLWANGER, A.; ARRON, J.R.; KOTH, L.L.; FAHY, J.V. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.180, p.388–395, 2009.

WOOLLEY, K.L.; GIBSON, P.G.; CARTY, K.; WILSON, A.J.; TWADDELL, S.H.; WOOLLEY, M.J. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.154, p.237–243, 1996.

WU, W.; BLEECKER, E.; MOORE, W.; BUSSE, W.W.; CASTRO, M.; CHUNG, K.F.; CALHOUN, W.J.; ERZURUM, S.; GASTON, B.; ISRAEL, E.; CURRAN-EVERETT, D.; WENZEL, S.E. Unsupervised phenotyping of Severe Asthma Research Program participants using expanded lung data. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.133, p.1280–1288, 2014.

YOUSEFI, S.; SIMON, D.; SIMON, H.U. Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease. **Current Opinion in Immunology**. v.24, p.736–739, 2012.

ZOU, Y.; DONG, C.; YUAN, M.; GAO, G.; WANG, S.; LIU, X.; HAN, H.; LI, B. Instilled air promotes lipopolysaccharide induced acute lung injury. **Experimental and Therapeutic Medicine**. v.7, p.816-820, 2014.

APÊNDICE A - Substâncias e sais

Ácido acético glacial (C₂H₄O₂) – VETEC
Ácido clorídrico (HCl) – VETEC
Ácido fosfotungstíco (H₃PO₄) – VETEC
Ácido periódico (HIO₄) – VETEC
Álcool metílico (CH₃OH) – VETEC
Aldeído fórmico (CH₂O) – MERCK
Alúmen de potássio (KAl(SO₄)₂) – MERCK
Bissulfito de sódio (NaHSO₃) – MERCK
Carvão ativado – VETEC
Cloral hidratado – VETEC
Cloreto de potássio (KCl) – MERCK
Cloreto de sódio (NaCl) – SIGMA
Cloridrato de ketamina – VETBRANDS
Clorofórmio (CHCl₃) – LTF
Corante azul de evans – VETEC
Corante cromotrope 2R – VETEC
Corante eosina azul de metileno segundo Giemsa – VETEC
Corante eosina azul de metileno segundo May-Grünwald – VETEC
Corante eosina Y – VETEC
Corante floxina-β – VETEC
Corante fucsina básica – VETEC
Corante hematoxilina – VETEC
Corante Panótico – NEWPROV
Corante test-green F.C.F. – VETEC
Corante violeta de genciana – VETEC
Dexametasona – Achê®
D-glucose (C₆H₁₂O₆) – SIGMA
Etanol (C₂H₅OH) – LTF
Fosfato de potássio (KH₂PO₄) – REAGEN
Fosfato de sódio anidro (Na₂HPO₄) – MERCK 111

Formaldeído – MERCK

Glicerina ($C_3H_3(OH)_3$) – VETEC

Hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$) – VETEC

Hidróxido de sódio (NaOH) – REAGEN

Metabissulfito de sódio ($Na_2S_2O_5$) – MERCK

OVA grade II – SIGMA

OVA grade V – SIGMA

Óxido de mercúrio amarelo (Hg_2O) – LAFAN

Parafina para Histologia – COAL

Timol ($C_{10}H_{14}O$) – VETEC

Xilol ($C_6H_4(CH_3)_2$) – VETEC 112

APÊNDICE B – Aparelhos e equipamentos

Aagitador Vortex – VWR – ScientificProducts

Autoinclusor – Leica EG 120

Balança analítica – Sartorius

Banho histológico – ANCAP

Centrífuga refrigerada - Centra MP4R – InternationalEquipmentCompany (IEC)

Citômetro – FACS Callibur

Estufa – ICAMO – modelo 3

Histotécnico processador automático de tecidos – OMA – DM – 40

Microscópio óptico – Nikon

Micrótomo – Leica RM 2125 – RT

Nebulizador – Pulmosonic Star – Soniclear