**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

ANDIAMIRA CAGNONI BALESTRA

**Estudo da administração de dois extratos da planta *Pyrostegia venusta* no
tratamento da asma em um modelo animal**

RIBEIRÃO PRETO

2016

ANDIAMIRA CAGNONI BALESTRA

**Estudo da administração de dois extratos da planta
Pyrostegia venusta no tratamento da asma em um modelo
animal**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos de Carvalho Borges.

RIBEIRÃO PRETO

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

BALESTRA, ANDIAMIRA CAGNONI

Estudo da administração de dois extratos da planta *P. venusta* no tratamento da asma em um modelo animal. Ribeirão Preto, 2016.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Marcos de Carvalho Borges

1. Asma. 2. Fitoterápico

Esta dissertação recebeu fomento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2014/07616-0.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANDIAMIRA CAGNONI BALESTRA

Estudo da administração de dois extratos da planta *Pyrostegia venusta* no tratamento da asma em um modelo animal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências
Área de Concentração: Clínica Médica

Aprovado em ____/____/____

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*À minha família que não mediram esforços ao longo de
mais uma caminhada, me dando base e incentivo para
sempre continuar, o meu agradecimento infinito.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus por me permitir ter conquistado mais um passo. Sem ele, nada seria.

Aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado, me dando apoio e oportunidades para voar!

Ao meu orientador, Professor Marcos de Carvalho Borges, agradeço por ter confiado em meu trabalho. Agradeço por toda presença ao longo da minha jornada, pelas ajudas, sugestões, paciência, pelo aprendizado e pela amizade. Muito obrigada pelas lições de humildade e pela preocupação com o próximo. Você se tornou o meu exemplo e espelho como Professor! Meu sinceros e eterno agradecimento.

À minha família, por sempre estar torcendo por mim!

Ao meu namorado, por todo apoio e incentivo em mais uma caminhada!

Ao Professor Fábio Carmona por ter me dado essa oportunidade, pelo carinho e todo apoio!

À Prof. Ana Maria e ao laboratório de Biotecnologia da UNAERP por todo apoio e carinho.

Às minhas amigas do laboratório, agradeço pelo companheirismo, pela disponibilidade em ajudar, pelas conversas e risadas, por todo apoio nos momentos difíceis.

Aos meus colegas do laboratório, agradeço por todo aprendizado passado.

Aos animais que cederam suas vidas para que esse trabalho pudesse ocorrer, muito obrigada..

Agradeço à Ceci por não medir esforços em me ajudar, obrigada pelo apoio e pelas palavras ao longo de minha caminhada!

Ao Adalberto do biotério e à Paula, por toda ajuda!

Ao Emerson da pós-graduação, obrigada pelo apoio.

Agradeço a Fundação de Amparo e Pesquisa-FAPESP pelo apoio na pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que diretamente e indiretamente contribuíram por mais essa formação. Essa etapa concluída só reforça que não chegamos a lugar nenhum sozinhos. À todos, minha infinita gratidão.

“O amor é a força mais sutil do mundo”.
Mahatma Gandhi

RESUMO

BALESTRA, A.C. **Estudo da administração de dois extratos da planta *Pyrostegia venusta* no tratamento da asma em um modelo animal.** 2016. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Ribeirão Preto, 2016.

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas responsável por considerável morbimortalidade em todo o mundo. O tratamento atualmente disponível que inclui broncodilatadores e corticosteróides, apresenta respostas variáveis e alguns pacientes não atingem o controle preconizado. Além disso, esses medicamentos apresentam efeitos colaterais indesejáveis. Assim, é necessário o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da asma. A *Pyrostegia venusta* (KerGahl.) Miers (“cipó-de-são-jão”, Bignoniaceae), uma trepadeira amplamente distribuída no mundo inteiro e no Brasil principalmente no cerrado brasileiro, apresenta atividade anti-inflamatória e antioxidativa. Até o momento, não há descrição de estudos de *P. venusta* no tratamento da asma. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da administração de dois extratos de *P. venusta* nas doses de 100 e 300mg/kg no tratamento da asma em um modelo animal e os mecanismos envolvidos. Foram realizados dois protocolos com períodos de tratamento e doses diferentes. No protocolo 1, camundongos Balb/c foram sensibilizados duas vezes com ovalbumina (OVA) intraperitoneal (ip), com uma semana cada de intervalo; após uma semana, foram desafiados com OVA intranasal (in) por três dias consecutivos, os camundongos receberam tratamento com extrato aquoso ou extrato hidroetanólico de *P. venusta* (100 mg/kg) por via ip, também por três dias consecutivos, durante os desafios com OVA. No protocolo 2, camundongos Balb/c foram sensibilizados duas vezes com OVA ip, com uma semana de intervalo e, após uma semana, desafiados com OVA in por quatro dias alternados. Os animais foram tratados com os extratos aquoso ou extrato hidroetanólico de *P. venusta* (300 mg/kg), ip, por sete dias consecutivos. Camundongos controles receberam salina nos mesmos dias. Após a sensibilização e desafios, os animais foram ventilados e foram realizadas medidas *in vivo* da hiper-responsividade brônquica com concentrações crescentes de metacolina. Após, foi coletado lavado broncoalveolar para contagem total e diferencial de células. O sangue foi coletado para dosagem de IgE específica para OVA e os pulmões foram retirados para dosagem de citocinas e capacidade antioxidante no homogenato pulmonar e análise histológica. No protocolo 1, houve redução de células totais, eosinófilos e da hiper-

responsividade brônquica no grupo tratado com extrato aquoso quando comparado ao grupo controle. O extrato hidroetanólico não reduziu a inflamação das vias aéreas. Em relação ao protocolo 2, o grupo asmático que recebeu tratamento com extrato aquoso apresentou diminuição de células inflamatórias totais, eosinofílicas e no tecido pulmonar, além de diminuição da hiper-responsividade brônquica e aumento da capacidade antioxidante. O grupo tratado com extrato hidroetanólico apresentou redução apenas de células totais e de eosinófilos. Os extratos aquoso e hidroetanólico da *P. venusta* não reduziram os níveis de citocinas inflamatórias. Conclui-se que a administração do extrato aquoso de *P. venusta* na dose de 300mg/kg atenuou as principais características da asma em um modelo animal, provavelmente por um mecanismo antioxidante.

Palavras-chave: Asma. Fitoterápicos. Inflamação das vias aéreas.

ABSTRACT

BALESTRA, A.C. Study of the administration of two plant extracts *P. venusta* in the treatment of asthma in an animal model. 2016. Dissertation (Master) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways responsible for considerable morbidity and mortality worldwide. With the currently available treatment, including bronchodilators and corticosteroids, some patients do not reach the recommended control. Furthermore, these drugs have undesirable side effects. Thus, the development of new drugs for the treatment of asthma is needed. *P. venusta* (KerGahl.) Miers ("liana-of St. John," Bignoniaceae), a widely distributed climbing worldwide and in Brazil mainly in the Brazilian cerrado, has anti-inflammatory and antioxidative activity. To date, there is no study of *P. venusta* in the treatment of asthma. The aim of the study was to evaluate the effects of administration of two extracts of *P. venusta* with different doses (100 and 300 mg/kg) in the treatment of asthma in an animal model and the mechanisms involved. Two protocols were conducted with different period of treatment. In protocol 1, Balb/c mice were sensitized twice with ovalbumin (OVA) intraperitoneally (ip) one week apart. After one week, mice were challenged with intranasal OVA for three consecutive days and treated with aqueous extract or hydroethanolic extract of *P. venusta* (100mg/kg) ip for three consecutive days, during OVA challenges. In protocol 2, Balb/c mice were sensitized ip with OVA twice with an interval of one week and after one week challenged four times with OVA intranasally in alternate days. The animals were treated with the aqueous extract or hydroethanolic extract of *P. venusta* (300 mg/kg) ip for seven consecutive days. Control mice received saline on the same days. After sensitization and challenge, the animals were ventilated and *in vivo* measurement of bronchial hyperresponsiveness was performed with increasing concentrations of methacholine. After, bronchoalveolar lavage was collected for total and differential cell count. The blood was collected to measure OVA specific IgE and lungs were removed for cytokines quantification in the pulmonary homogenates and histological analysis. In protocol 1, aqueous extract administration significantly reduced total and differential cells number, and bronchial hyperresponsiveness compared to the group that received no treatment. Hydroethanolic extract did not significant reduce airway inflammation. In relation to Protocol 2, the asthmatic group treated with aqueous extract had a significant decrease in total and differential inflammatory cells, lung inflammation, and bronchial hyperresponsiveness. Moreover,

aqueous extract administration increased significantly antioxidant capacity. The hydroethanol extract decreased significantly only total cells and eosinophils. The aqueous and hydroethanolic extracts of *P. venusta* did not reduce the levels of inflammatory cytokines. We conclude that the administration *P. venusta* aqueous extract at a dose of 300mg/kg attenuated the main features of asthma in an animal model, probably via an antioxidant mechanism.

Keywords: Asthma. Fitoterapic. Airway inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resumo da fisiopatologia da asma.	18
Figura 2 - Fontes e respostas celulares às espécies reativas	19
Figura 3 - Protocolo de sensibilização, desafios e tratamento estudados na dose de 100mg/kg	30
Figura 4 - Protocolo de sensibilização, desafios e tratamento na dose 300mg/kg.	32
Figura 5 - Moléculas detectadas nos extratos de <i>P. venusta</i>	37
Figura 6 - Avaliação da hiper-responsividade brônquica com a administração do extrato aquoso na dose de 100mg/kg (Protocolo 1).....	39
Figura 7 - Avaliação da hiper-responsividade brônquica com a administração do extrato aquoso na dose de 300mg/kg (Protocolo 2).....	40
Figura 8 - Avaliação da hiper-responsividade brônquica com a administração do extrato hidroetanólico na dose de 300mg/kg.	41
Figura 9 - Contagem de células totais e diferenciais no LBA com a administração do extrato aquoso na dose de 100mg/kg - Protocolo 1	42
Figura 10 - Contagem de células totais e diferenciais no LBA com a administração do extrato aquoso na dose de 300mg/kg - Protocolo 2	43
Figura 11 - Contagem de células totais e diferenciais no LBA com a administração do extrato hidroetanólico na dose de 100mg/kg - Protocolo 1.	44
Figura 12 - Contagem de células diferenciais no LBA com a administração do extrato hidroetanólico na dose de 300mg/kg - Protocolo 2	45
Figura 13 - Níveis de IgE OVA específica no soro.....	46
Figura 14 - Níveis de citocinas no homogenato pulmonar.....	47
Figura 15 - Quantificação das células inflamatórias do tecido pulmonar.	48
Figura 16 - Dosagem da capacidade antioxidante total (CAT) no tecido pulmonar.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Transições de íons, configurações do instrumento e tempos de retenção para cada composto quantificado.....	28
Tabela 2 - Quantificação dos componentes isolados a partir dos extratos aquoso e hidroetanólico de <i>P. venusta</i>	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Definição e Epidemiologia da Asma	16
1.2 Fisiopatologia da Asma	16
1.3 Estresse Oxidativo e Asma.....	18
1.4 Tratamento da asma	20
1.5 Fitoterápicos.....	21
1.6 <i>Pyrostegia venusta</i>.....	23
1.7 Hipótese	24
2 OBJETIVO GERAL	25
2.1 Objetivos específicos.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Animais.....	26
3.2 Obtenção e preparo da droga vegetal.....	26
3.3 Extratos	26
3.4 Análise dos constituintes químicos dos extratos aquoso e hidroetanólico de <i>P. venusta</i>	27
3.5 Quantificação do extrato aquoso e hidroetanólico de <i>P. venusta</i> por HPLC-MS	27
3.6 Controle de qualidade	28
3.7 Preparo da solução administrada aos camundongos durante o tratamento	28
3.8 Delineamento do estudo	29
3.9 Avaliação dos parâmetros in vivo da função pulmonar	33
3.10 Coleta do lavado broncoalveolar, sangue e pulmões.....	34
3.11 Contagem total e diferencial de células no LBA.....	34
3.12 Preparo do homogenato e dosagem de citocinas inflamatórias no pulmão	35
3.13 Dosagem sérica de anticorpos específicos para IgE anti-ovalbumina	35
3.14 Análise histológica do pulmão	35
3.15 Análise capacidade antioxidante total (CAT)	36
3.16 Análise estatística	36
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Identificação e quantificação dos componentes isolados a partir dos extratos aquoso e hidroetanólico de <i>P. venusta</i>	37

4.2 Avaliação in vivo da mecânica respiratória com a administração do extrato aquoso nas doses de 100mg/kg e 300mg/kg	38
4.3 Avaliação in vivo da mecânica respiratória com a administração do extrato hidroetanólico na dose de 300mg/Kg	40
4.4 Contagem celular total e diferencial no lavado broncoalveolar (LBA) com a administração do extrato aquoso nas doses de 100mg/Kg (protocolo 1) e 300mg/kg (protocolo 2)	41
4.5 Contagem celular total e diferencial no lavado broncoalveolar (LBA) com a administração do extrato aquoso nas doses de 100mg/Kg (protocolo 1) e 300mg/kg (protocolo 2)	43
4.6 Níveis de IgE específica para ovalbumina com administração dos extratos aquoso e hidroetanólico na dose 300mg/kg	45
4.7 Dosagem de citocinas com administração dos extratos aquoso e hidroetanólico na dose 300mg/kg	47
4.8 Quantificação das células inflamatórias no tecido pulmonar com a administração do extrato aquoso na dose de 300mg/kg	48
4.9 Análise da capacidade antioxidante no homogenato pulmonar com administração dos extratos aquoso e hidroetanólico na dose 300mg/kg.....	48
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	63
APÊNDICES	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição e Epidemiologia da Asma

A asma é definida como uma inflamação crônica das vias aéreas, heterogênea, caracterizada por hiper-responsividade das vias aéreas, limitação variável ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com o tratamento; e remodelamento brônquico (1). Manifesta-se clinicamente por episódios recorrentes de sibilância, dispneia, desconforto torácico e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao despertar (2).

Considerada uma das doenças crônicas mais comuns, a asma acomete crianças e adultos em todos os países, independentemente do nível de desenvolvimento (3). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), há cerca de 300 milhões de pessoas no mundo que sofrem com asma e estima-se 250 mil mortes por ano decorrentes dessa doença (4). Apesar dos novos conhecimentos sobre a fisiopatologia da asma e os avanços na terapêutica, a taxa de prevalência de asma e os índices de mortalidade tem aumentado nos últimos 20 anos (1, 5, 6).

No Brasil, cerca de 6,4 milhões sofrem com a doença. Além disso, a asma foi responsável por aproximadamente 105 mil casos de internações hospitalares no Sistema Único de Saúde (SUS) em 2014 (7), representando 38% das internações hospitalares por doença respiratória crônica (8). Apesar dos altos custos diretos, os custos indiretos são incalculáveis, considerando que o paciente asmático, quando em crise, pode ir a óbito, ter absenteísmo escolar e no trabalho, perda da produtividade, restrição física, emocional e social, o que gera impacto negativo na família e sociedade (1, 2, 9).

1.2 Fisiopatologia da Asma

O desenvolvimento da asma sofre influência de fatores genéticos e ambientais (1). Dentre os fatores genéticos, a atopia é um importante fator de risco, além do sexo e obesidade. Como fatores ambientais, a exposição a alérgenos como poeira, animais, tabagismo, poluição do ar, infecções de vias aéreas superiores, medicamentos, refluxo gastroesofágico, entre outros, podem estar relacionados com o desenvolvimento da asma (9).

A inflamação das vias aéreas é considerada o mecanismo fisiopatológico mais importante e está presente mesmo em asmáticos assintomáticos (10, 11). A inflamação, que resulta de uma interação complexa entre diversas células, é caracterizada por um aumento de

eosinófilos, mastócitos, macrófagos e linfócitos T na mucosa das vias aéreas e está relacionada com o desenvolvimento de obstrução ao fluxo aéreo, hiper-responsividade brônquica e gravidade clínica (1, 12).

A hiper-responsividade brônquica é uma das manifestações clínicas da asma e resulta do estreitamento anormal das vias aéreas em resposta a um estímulo broncoconstritor, em comparação a uma pessoa não asmática. A hiper-responsividade pode variar ao longo do tempo, podendo aumentar durante as exacerbações e diminuir com o tratamento anti-inflamatório (1). A hiper-responsividade brônquica pode ser avaliada pelo teste de broncoprovocação que consiste na inalação de uma substância broncoconstritora, como a metacolina, em doses ou concentrações crescentes (1).

A asma tem sido considerada não somente uma doença inflamatória com aumento da responsividade brônquica, mas também uma doença caracterizada pela presença de alterações estruturais nas paredes das vias aéreas, conhecidas como remodelamento brônquico. O remodelamento é caracterizado por um espessamento da lâmina basal subepitelial, aumento no número de miofibroblastos, hiperplasia e hipertrofia de músculo liso, aumento de glândulas mucosas, aumento da área vascular e alteração da deposição e composição das proteínas e proteoglicanas da matriz extracelular (13).

Uma das possíveis explicações da patogênese é um desequilíbrio da resposta imune Th1/Th2 com um desvio para a resposta do tipo Th2 (14). A presença de linfócitos T CD4⁺, do subtipo Th2 ativado, e de suas citocinas e quimiocinas, como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-16, induzem um padrão de resposta denominado Th2, onde ocorre ativação de células B, produção de IgE, supressão de células Th1, crescimento e diferenciação de eosinófilos e aumento na atividade de mastócito (14). Esse desequilíbrio altera a homeostase do organismo levando a um quadro alérgico, como a asma. Um resumo da fisiopatologia da asma encontra-se na figura 1.

Figura 1 - Resumo da fisiopatologia da asma. O contato com alérgeno induz uma resposta de padrão Th2, com a liberação de citocinas, tais como IL-4, IL-5 e IL-13, que estimulam a produção de eosinófilos, IgE e degranulação de mastócitos. Adaptado de *Olin* (4).

1.3 Estresse Oxidativo e Asma

Diversos estudos demonstraram que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na inflamação de vias aéreas e na gravidade da asma, podendo assim tanto induzi-la como agravá-la (15). O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesas antioxidantes. Os produtos do estresse oxidativo são chamados de radicais livres e/ou espécies reativas, que possuem a ação deletéria ao organismo (16).

A formação de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico. Porém, a produção em excesso pode conduzir a danos oxidativos. Sendo assim, para combater essa produção excessiva, existe o sistema de defesa antioxidante. Este tem por objetivo de limitar

os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes. A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Esse desequilíbrio conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (16).

Os mecanismos de defesa antioxidantes podem ser através de mecanismos enzimático e não enzimático. O sistema de defesa não enzimático, inclui compostos antioxidantes de origem endógena (como por exemplo citocinas inflamatórias, mitocôndrias, entre outros) ou dietética, tais como vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas, sendo as principais: Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione Peroxidase. Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-reativas, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, consequentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (16). Além disso, fontes exógenas como radiação ultravioleta, quimioterápicos entre outros podem levar ao processo de oxidação (17). (Figura 2).

Figura 2 - Fontes e respostas celulares às espécies reativas. Oxidantes são gerados do metabolismo normal. Os sistemas de defesa antioxidantes e a produção das espécies reativas quando eficientes, mantêm a homeostase fisiológica e quando descontrolados permitem a instalação do estresse oxidativo, representado pelo dano celular podendo se expressar em doença. Adaptado de Vasconcelos, et al. (17).

Em indivíduos asmáticos, a exposição a fatores predisponentes/agravantes à asma, como alérgenos, gases poluentes, químicos, drogas, bactérias e vírus leva ao recrutamento e ativação das células inflamatórias nas vias aéreas, incluindo mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, macrófagos e plaquetas (18). Essas células inflamatórias, além das células epiteliais e da musculatura lisa, podem gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam danos ao sistema respiratório (16). Além disso, os indivíduos asmáticos possuem células inflamatórias com capacidade aumentada de gerarem radicais livres quando comparados com pessoas saudáveis, os quais posteriormente contribuem para a produção de altas concentrações de ROS (16, 18).

O estresse oxidativo pode levar a muitos efeitos prejudiciais na função das vias aéreas, incluindo a contração da musculatura lisa, hiper-responsividade das vias aéreas, hipersecreção brônquica, lesão epitelial e o aumento da permeabilidade vascular. Além disso, ROS podem induzir a produção citocinas e quimiocinas via aumento da transcrição do fator nuclear NF-KB em células epiteliais bronquiais (16, 18).

Sendo assim, terapêuticas que reduzem o estresse oxidativo ou aumentem a produção de substâncias antioxidantes podem, potencialmente, ser de grande importância para doenças como a asma.

1.4 Tratamento da asma

O tratamento da asma inclui medidas educacionais sobre a exposição a fatores desencadeantes, aderência ao tratamento, técnica de inalação adequada e terapia medicamentosa, como os broncodilatadores e corticosteroides. Objetiva-se desta forma, minimizar os sintomas que limitam as atividades diárias, prevenir exacerbações, diminuir visitas a emergências e hospitalizações, além de manter a função pulmonar o mais próximo do normal, utilizando a menor quantidade possível de medicamentos (1, 9, 19).

Resumidamente, como tratamento de primeira escolha, os corticosteroides inalatórios são usados como terapia de controle. Os broncodilatadores de ação curta, também chamados de β agonistas de ação curta, são usados para o alívio imediato de sintomas agudos e constituem a primeira opção broncodilatadora nas exacerbações. Os β 2-agonistas de ação prolongada (LABA) são efetivos quando usados em combinação com corticosteroides inalatórios, geralmente em pacientes que não atingem o controle adequado somente com os corticosteroides inalatórios. Outras opções terapêuticas são os antagonistas de leucotrienos,

antagonistas muscarínicos de ação prolongada, *Omalizumabe*, um anticorpo monoclonal anti-IgE, termoplastia brônquica, entre outros (4).

Os medicamentos atualmente disponíveis têm boa ação no controle dos sintomas da asma e suas exacerbações. Estima-se que 90-95% dos pacientes atingem o controle preconizado por meio de cessação do tabagismo, prescrição adequada dos medicamentos, otimização da disponibilidade de medicamentos (produção de medicamentos genéricos), além da adesão e técnica de administração. No entanto, apesar da eficácia dos medicamentos disponíveis ainda existem várias razões para prosseguir na busca de novos medicamentos. Como elucidado anteriormente, a prevalência da asma está aumentando e o seu custo continua elevado; até o momento, não existe uma estratégia preventiva efetiva ou uma cura conhecida; os efeitos dos corticosteroides inalatórios em asma desaparecem rapidamente quando a droga é interrompida; e os medicamentos não revertem ou retardam a maior parte do remodelamento brônquico (4).

Apesar da maioria dos pacientes atingir o controle da asma, ainda existem pacientes com sintomas e exacerbações. Além disso, a resposta ao tratamento é variável entre eles e, apesar da eficácia do tratamento medicamentoso disponível, cerca de 10% dos pacientes não atingem o controle preconizado, sendo, portanto, necessário a busca por novas drogas. Outra razão para o desenvolvimento de novas drogas está relacionada com os efeitos colaterais de medicamentos para a asma. Corticosteroides inalatórios, especialmente quando utilizados em altas doses e por longos períodos, têm efeitos deletérios sobre o crescimento linear, densidade óssea, função adrenal, catarata, e glaucoma, entre outros. Além disso, um estudo levantou preocupações de potenciais riscos de mortalidade associados com beta agonistas de longa ação (4). Desta forma, se faz necessário a busca por novas drogas para o tratamento da asma, como os fitoterápicos.

1.5 Fitoterápicos

A utilização de plantas como medicamentos remonta às origens da humanidade, com registros mais antigos datando da era paleolítica, e é extensamente difundida em diversos países como, por exemplo, China, Índia, Alemanha e Estados Unidos (20, 21). Sua principal vantagem em relação à terapia convencional é o sinergismo do fitocomplexo. Apesar do isolamento de um único princípio ativo poder ser vantajoso em algumas situações, o fitocomplexo pode ter efeito superior ao de qualquer componente isoladamente (20). Além disso, fitomedicamentos com associação de mais de uma planta permitem a obtenção de

maiores efeitos sinérgicos, com utilização de quantidades mais baixas de cada um dos componentes individuais. Estima-se que cerca de 80% da população mundial faça uso de plantas ou de suas preparações na atenção primária à saúde (22).

A utilização de medicamentos fitoterápicos vem sendo estimulada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1978 (Declaração de Alma-Ata), e também pelo governo brasileiro (Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – Portaria GM nº 971, de 02/05/2006, e Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – Decreto Presidencial 5.813 de 22 de junho de 2006). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define os fitoterápicos como sendo medicamentos de plantas medicinais, obtidos empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal, tais como extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, entre outros.

A eficácia e a segurança dos fitoterápicos devem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em bibliografia e/ou publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos (23-25). Adicionalmente, o Ministério da Saúde dispensa o registro de produtos cujas fórmulas estejam inscritas na Farmacopeia Brasileira, no códex ou nos formulários aceitos pelo Ministério da Saúde (Alemã, Americana, Argentina, Britânica, Europeia, Francesa e OMS) (26, 27), ou ainda aqueles constantes na Lista de Registro Simplificado do Ministério da Saúde (28).

Na atualidade, o número de espécies vegetais investigadas quanto aos seus efeitos terapêuticos vem crescendo em função do elevado custo de desenvolvimento de novas drogas sintéticas, que pode ultrapassar a cifra de 800 milhões de dólares, dos efeitos colaterais de medicamentos sintéticos e do aprofundamento de estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com espécies vegetais, os quais têm confirmado os efeitos terapêuticos divulgados por pesquisas etnofarmacológicas (29).

Dentre as terapias existentes para a asma, os medicamentos fitoterápicos podem assumir grande importância como medidas alternativas ou adjuvantes (30). É importante ressaltar que muitos medicamentos utilizados para tratar a asma, como B2-agonistas, anticolinérgicos, metilxantinas e cromona vêm a partir de fontes de plantas medicinais (31). Além disso, inúmeros estudos têm sido publicados sobre o efeito de extratos vegetais com propriedades anti-inflamatórias e broncodilatadores (32, 33)

Em um estudo animal, foi avaliado o uso da curcumina, um polifenol presente no rizoma da espécie *Curcuma longa* L. (“açafrão-da-terra,” Zingiberaceae), no tratamento da asma. Neste trabalho, a curcumina atenuou a hiper-responsividade brônquica e a inflamação

das vias aéreas, provavelmente pela inibição do NF-kB (34). Outros estudos realizados com *Mikania glomerata* Spreng. (“guaco,” Asteraceae) e *Mikania evigata* Sch. Bip. ex Baker (“guaco,” Asteraceae) demonstraram que estas plantas também apresentam ação anti-inflamatória nas vias aéreas (35, 36).

Atualmente no Brasil a ANVISA regulamentou o uso de algumas espécies vegetais como anti-inflamatórias (24, 25, 37) e outras como broncodilatadoras (24, 25, 37). Porém, ainda existem outras espécies que necessitam de investigação quanto a sua eficácia no tratamento da asma.

1.6 *Pyrostegia venusta*

A espécie *Pyrostegia venusta* (KerGahl.) Miers (“cipó-de-são-joão”, Bignoniaceae) é uma trepadeira invasora perene com flores alaranjadas, presente no mundo todo. No Brasil, é amplamente distribuída no cerrado. Na medicina popular, suas partes são usadas para o tratamento de diarreias, vitiligo, tosse e doenças infecciosas e inflamatórias do aparelho respiratório, como bronquites e resfriados (38).

A *P. venusta* possui ação anti-inflamatória e, conseqüentemente, potencial para o tratamento da asma. Estudos prévios documentaram a atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico das flores de *P. venusta*, sendo o β -sitosterol e o acacetin-7-*O*- β -glucopiranosídeo os principais compostos (39-41).

Em um estudo que utilizou um modelo de edema em patas e peritonite induzida por lipopolissacarídeo em camundongos, o extrato hidroetanólico de *P. venusta* reduziu o edema induzido por carragenina e inibiu o recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal, confirmando a sua ação anti-inflamatória e antinociceptiva (39).

Veloso et al., em um modelo de obesidade induzida por dieta rica em carboidratos refinados, observaram que a *P. venusta* teve um efeito anti-inflamatório e metabólico, demonstrado pela melhora na intolerância à glicose, redução de células inflamatórias sistêmicas e nos níveis de mediadores inflamatórios no tecido adiposo e no fígado. Além disso, o extrato apresentou um efeito dose-dependente sendo que a melhor resposta obtida foi com a dose de 300mg/kg (42).

Adicionalmente, em um estudo que avaliou a cicatrização de feridas, atividade antimicrobiana e antioxidativa, o extrato de *P. venusta* mostrou efeitos inibitórios sobre o crescimento de todos os micro-organismos estudados, potencializou a cicatrização das feridas

e modulou a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, como IL-10, que aumentou nos grupos tratados com o extrato (43).

Além dos compostos citados, a planta contém vários componentes, tais como alcalóides, flavanóides, triterpenos, taninos, entre outros (44). Esses compostos têm efeitos antioxidantes importantes, servindo como inibidores de radicais livres, sendo, portanto, fontes promissoras de antioxidantes naturais (44). Em nosso conhecimento, não existem estudos que avaliaram o uso da *P. venusta* no tratamento da asma.

1.7 Hipótese

Considerando os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da *P. venusta*, hipotetizamos que a administração de *P. venusta* pode apresentar um efeito benéfico no tratamento da asma brônquica em um modelo animal, reduzindo a inflamação e a hiper-responsividade brônquica, e que os mecanismos envolvidos podem ser pelo desvio da resposta imune para o tipo Th1, aumento da capacidade antioxidante e/ou produção de IL-10.

2 OBJETIVO GERAL

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da administração de *P. venusta* no tratamento da asma em um modelo experimental, e os mecanismos envolvidos.

2.1 Objetivos específicos

Foram avaliados os efeitos da administração de duas doses (100 e 300mg/kg) dos extratos aquoso e hidroetanólico de *P. venusta* na:

- Hiper-responsividade brônquica;
- Contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA);
- Dosagem sérica de anticorpos IgE específicos para ovalbumina;
- Produção de citocinas Th1 e Th2 no tecido pulmonar;
- Quantificação da inflamação pulmonar;
- Capacidade antioxidante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos Balb/c, com idade entre 6 e 8 semanas. Os animais foram obtidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e mantidos em isoladores no Biotério do Departamento de Clínica Médica, com livre acesso à água e alimento. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (nº 072/2013).

3.2 Obtenção e preparo da droga vegetal

A *P. venusta* foi cultivada na instituição Casa Espírita Terra de Ismael (Farmacêutico Responsável: Anne Cristina Ferreira, CRF-SP 34.696, CNPJ: 01.824.056/0001-23, localização: latitude 21°4'33'' sul, longitude 47°44'48'' oeste) com autorização do governo brasileiro.

A planta foi coletada às 9 horas da manhã, e uma exsicata da espécie (nº exsicata: HPMU-1458) foi depositada no Herbário da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). As flores da planta foram lavadas e o excesso de água foi removido com folhas de papel. A seguir, as flores foram secas em estufa de ar circulante a 45 °C por 24 horas. Depois, foram trituradas em moinho de facas até a granulometria de 40 mesh. O pó resultante foi chamado de droga vegetal.

3.3 Extratos

Foram preparados extratos aquoso e hidroetanólico das flores de *P. venusta*, conforme descrito abaixo:

- **Extrato aquoso:** em 1 L de água fervente foram adicionados 100 g de droga vegetal, deixando em infusão por 1 hora. Depois, o extrato foi filtrado em papel de filtro e, em seguida, liofilizado.

- **Extrato hidroetanólico:** em 1 L de álcool 70% foram adicionados 100 g da droga vegetal, que foi deixada em maceração por 10 dias. Depois, o extrato foi filtrado em papel de filtro e, em seguida, rotaevaporado.

Os extratos foram preparados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UNAERP, sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Ana Maria Soares Pereira.

3.4 Análise dos constituintes químicos dos extratos aquoso e hidroetanólico de *P. venusta*

As identidades dos constituintes químicos presentes nos extratos de *P. venusta* foram confirmados por análise de cromatografia líquida de alto desempenho acoplado a espectrometria de massa (HPLC-MS) usando um Waters (Milford, MA, EUA) sistema Acquity UPLC H-Class equipado com um detector PDA e um Waters Xevo TQ-S conjunto quádruplo espectrômetro de massa com uma fonte de Z-pulverizador operando no modo positivo. O volume de injeção dos extratos aquoso e hidroetanólico foi de 5 µl em uma coluna de Sigma-Aldrich Ascentis expresso C18 (100 x 4,6 mm I.D.; 2,7 µm de tamanho de partícula) de Supelco analítica. A fase móvel utilizada consistiu de um gradiente de eluição de 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e metanol com ácido fórmico a 0,1% (solvente B) a uma taxa de fluxo de 0,5 mL min⁻¹. O programa de gradiente de eluição começou com 3% de B entre 0 e 4 min, seguido por 3-60% de B, 4-15 min e entre 60-90% de B entre 15-19 min. Em seguida, ele voltou para a condição inicial (3% B) dentro dos 5 minutos seguintes. Os parâmetros de origem e de funcionamento foram otimizados como se segue: tensão capilar = 3,4 kV; temperatura da fonte Z-pulverizador = 150 ° C, temperatura de dessolvatação (N₂) = 300 ° C, fluxo de gás de dessolvatação = 600 L h⁻¹, e a gama de massa a partir de m / z 100 a 700 no modo de varrimento total.

3.5 Quantificação do extrato aquoso e hidroetanólico de *P. venusta* por HPLC-MS-MS

Os experimentos para quantificação de ácido quínico (1), ácido clorogénico (2), verbascosídeo (3), e isoverbascosídeo (4) foram realizados por meio de HPLC-MS / MS no modo reação múltipla de monitorização (MRM) (Tabela 1), com os extratos aquoso e hidroetanólico de *P. venusta*. O Ácido quínico (catálogo n.º. 46944-U, Supelco) foi adquirido da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil); o ácido clorogênico (catálogo n. 00.500.590, HWI

Analytik GmbH) foi adquirido da Pharma Solutions, enquanto padrões de referência de verbascosídeo e isoverbascosídeo foram fornecidas pela Profa. Dra. Silvia H. Taleb-Contini (45). As soluções padrão de trabalho foram preparadas por diluição das soluções estoque (1,0 mg / ml) dos compostos-alvo em concentrações seguintes: 5, 10, 50, 250, 1.250, 2.500, e 5.000 ng / mL, durante 1 e 2, e 5, 25, 50, 125, 250, e 500 ng / mL para 3 e 4.

Tabela 1 - Transições de íons, configurações do instrumento e tempos de retenção para cada composto quantificado.

Composto	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Produto ion (<i>m/z</i>)	DP ^a (V)	CE ^b (eV)	RT ^c (min)
1	191,1	85,2	40	25	1,92
2	353,2	191,3	40	25	2,11
3	623,1	161,1	40	35	4,08
4	623,2	133,1	40	53	4,45

^a DP = Declustering Potential

^b CE = Energia de colisão (Ar foi utilizado como gás de colisão)

^c RT = Tempo de retenção

3.6 Controle de qualidade

As drogas vegetais e os extratos foram submetidos a controle de qualidade de acordo com a legislação brasileira vigente (46). Foi realizada a quantificação dos marcadores biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O controle de qualidade dos extratos foi feito no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UNAERP, sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Ana Maria Soares Pereira.

3.7 Preparo da solução administrada aos camundongos durante o tratamento

- **Extrato aquoso:** esse extrato foi diluído em solução salina isotônica estéril na concentração de 500mg/ml e armazenado a -80°C /ml (solução estoque). Após, a solução estoque foi diluída e doses de 100mg/kg/dia e de 300mg/kg/dia foram administradas diariamente, conforme descrito abaixo.
- **Extrato hidroetanólico:** O extrato hidroetanólico foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a 2,5%. A solução estoque desse extrato foi armazenado na concentração de

250mg/ml em freezer a -80°. Após, a solução estoque foi diluída e doses de 100mg/kg/dia e de 300mg/kg/dia foram administradas diariamente, conforme descrito abaixo.

3.8 Delineamento do estudo

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiopatologia Pulmonar Experimental da FMRP-USP.

- **Protocolo 1: protocolo de sensibilização, desafios e tratamento na dose 100mg/kg**

O protocolo de sensibilização e desafios encontra-se na Figura 3. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes, com uma semana de intervalo, com injeção intra-peritoneal (i.p.) de 10µg de ovalbumina (OVA) (Sigma-Aldrich, grau de purificação V, EUA) diluídos em 0,2 mL de solução salina isotônica estéril. Uma semana após a última sensibilização, os camundongos foram submetidos a três desafios em dias consecutivos com instilação intranasal de 10 µg de OVA diluídos em 50 µL de solução salina isotônica estéril, sob leve anestesia (100 µL de uma solução de ketamina, 2 mg/mL, e xilasina, 2 mg/mL). O grupo controle foi submetido aos mesmos procedimentos, nos mesmos dias, porém foram sensibilizados e desafiados somente com solução salina isotônica. Nos mesmos dias dos desafios, os animais também receberam via i.p. o tratamento com os extratos aquoso ou hidroetanólico da *P. venusta* na dose de 100 mg/kg por três dias consecutivos. O grupo controle recebeu solução salina isotônica estéril, nos mesmos dias. Desta forma, seis grupos com 8 a 10 camundongos por grupo foram estudados, conforme descritos abaixo e na Figura 3.

- Grupo 1 - SAL/SAL: Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com solução salina. Os camundongos receberam solução salina durante o período de tratamento;
- Grupo 2 - OVA/SAL: Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos receberam solução salina durante o período de tratamento;
- Grupo 3 - SAL/PVA: os camundongos foram sensibilizados e desafiados com solução salina. Os camundongos receberam o extrato aquoso de *P. venusta* (PVA) durante o período de tratamento;
- Grupo 4 - OVA/PVA: os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos receberam o extrato aquoso de *P. venusta*- (PVHA) durante o período de tratamento;

- Grupo 5 - SAL/PVHA: os camundongos foram sensibilizados e desafiados com solução salina. Os camundongos receberam o extrato hidroetanólico de *P. venusta*- (PVHA) durante o período de tratamento;
- Grupo 6 - OVA/PVHA: os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos receberam o extrato hidroetanólico de *P. venusta*- (PVHA) durante o período de tratamento.

Figura 3 - Protocolo de sensibilização, desafios e tratamento com a dose de 100mg/kg.

- **Protocolo 2: protocolo de sensibilização, desafios e tratamento na dose de 300mg/kg**

O protocolo de sensibilização, desafios e tratamento encontra-se na Figura 4. Camundongos Balb/c foram sensibilizados duas vezes com 10 µg de OVA diluídos em 0,2 mL de solução salina isotônica estéril via i.p., com uma semana de intervalo. Uma semana após a segunda sensibilização, os animais foram desafiados com 10 µg de OVA diluídos em 50 µL de solução salina isotônica estéril via intra-nasal por quatro vezes em dias alternados, sob leve anestesia via i.p. (ketamina 100 mg/Kg e xilazina 10 mg/kg). Os animais foram tratados com 300mg/kg dos extratos aquoso ou hidroetanólico da *P. venusta*, via i.p., por setes dias consecutivos, a partir do primeiro dia de desafio. Os animais do grupo controle receberam salina nos respectivos dias. Assim, seis grupos (8 a 10 animais por grupo) foram estudados conforme descritos acima e na Figura 4.

Figura 4 - Protocolo de sensibilização, desafios e tratamento com a dose 300mg/kg.

3.9 Avaliação dos parâmetros *in vivo* da função pulmonar

Vinte e quatro horas após o último desafio, os animais foram anestesiados via i.p. com xilazina (10 mg/kg) e pentobarbital (30 mg/kg), uma cânula traqueal foi inserida e eles foram ventilados com um pequeno ventilador para animais FlexiVent® (Scireq, Montreal, QC, Canadá) com uma frequência respiratória de 150 respirações/minuto e pressão expiratória final positiva (PEEP) de 3 cmH₂O. Os animais foram paralisados com brometo de pancurônio via i.p. (1,2 mg/kg) e somente após completamente anestesiados e paralisados, as medidas respiratórias foram realizadas.

Esse ventilador permite a realização de medidas *in vivo* de diversos parâmetros fisiológicos através da técnica de oscilação forçada, com o modelo de compartimento simples e o modelo de impedância complexo. Esses dois modelos permitem a separação das alterações nos diferentes compartimentos pulmonares, como vias aéreas e parênquima. Para isso, antes da coleta dos dados de mecânica respiratória, os pulmões são insuflados até uma pressão de 27 cmH₂O para homogeneização pulmonar. Após, durante a técnica de oscilação forçada, o pistão, controlado por um computador, aplica 13 componentes senóides com frequências primas que vão de 1 a 20,5 Hz, durante um período de 3 s (quick prime-3 perturbation). Regressão linear múltipla foi então utilizada para ajustar os dados no modelo de fase constante do pulmão, descrito por Hantos et al. (47) usando a seguinte equação: $Z_{RS}(f) = R_{aw} + j2\pi fI + (G_{ti} - jH_{ti})/(2\pi f)^\alpha$, onde Z_{RS} é a impedância do sistema respiratório, R_{aw} é a resistência das vias aéreas, j representa a unidade imaginária, I é a inertância das vias aéreas, G_{ti} reflete a dissipação de energia e está intimamente relacionado com a resistência das vias aéreas periféricas, H_{ti} reflete a energia acumulada no tecido do pulmão e está intimamente relacionado com a elastância tecidual, $\alpha = (2/\pi)\tan^{-1}(H/G)$, e f a frequência respiratória.

Para analisar a hiper-responsividade brônquica foram feitas medidas na condição basal e após a provocação com a administração de concentrações crescentes de aerossóis com metacolina (6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL) por 10 segundos cada através de um nebulizador ultrassônico (Hudson RCI, Teleflex Medical, Temecula, CA, USA). Os parâmetros respiratórios foram selecionados das curvas que apresentarem um coeficiente de determinação maior ou igual a 0,90 ($COD \geq 0,90$). Foram avaliados e comparados os seguintes parâmetros: resistência total (RRS), elastância total (ERS), resistência tecidual (G) e elastância tecidual (H).

Ao final desse procedimento, os animais foram desconectados do ventilador para as análises descritas abaixo.

3.10 Coleta do lavado broncoalveolar, sangue e pulmões

Foi coletado lavado broncoalveolar (LBA) para quantificar a inflamação. Após a desconexão da ventilação, o LBA foi coletado duas vezes pela infusão e aspiração de 1 mL de solução salina pela cânula traqueal. As duas amostras do LBA foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos, os precipitados da primeira e segunda amostra foram ressuspensos para contagem celular.

Após a coleta do LBA, foi feita a coleta de sangue através do ventrículo direito. Foi coletado 1ml de sangue, que foi centrifugado, e o plasma separado e armazenado a -80°C para dosagem de IgE anti-ovalbumina. Após, a caixa torácica foi aberta e foram infundidos 5 mL de solução salina no ventrículo direito para retirada do sangue residual dos pulmões. O pulmão direito foi retirado e armazenado em RNAlater (Qiagen, Austin, Texas, USA) em um freezer a -80°C para posterior preparação do homogenato pulmonar para dosagem de citocinas. O pulmão esquerdo foi retirado e insuflado com formalina tamponada a 10% sob uma pressão de 25 cm H₂O por 25 minutos. Após, foi fixado em formalina tamponada a 10% por 24 horas, incluídos em blocos de parafina e cortados em micrótomo convencional com espessura de 5 µm. Os cortes foram utilizados para análise histológica.

3.11 Contagem total e diferencial de células no LBA

Foi realizada a contagem de células totais a partir dos precipitados da primeira e segunda amostra do LBA sendo coradas com o azul de trypan e contadas em uma câmara de Neubauer. Após, 100 µl de cada amostra foram centrifugadas a 1.000 rpm por 4 minutos em centrífuga tipo Cytospin (Cytospin IV, Thermo Scientific, Runcorn, Cheshire, EUA), e as lâminas foram coradas com o kit Panótico Rápido (Labroclin, Pinhais, PR, Brasil) para contagem e diferenciação das células inflamatórias. Foram contadas 300 células inflamatórias de cada amostra.

3.12 Preparo do homogenato e dosagem de citocinas inflamatórias no pulmão

O homogenato foi preparado a partir do pulmão armazenado em RNAlater (Qiagen, Austin, Texas, EUA) a -80°C . Para isso, 50 mg de pulmão de cada amostra foram pesados numa balança de precisão e foram adicionados em 1 ml de uma solução contendo inibidor de proteases (Complete EDTA-free, ROCHE). O órgão foi processado utilizando um homogeneizador de tecido (OMNI(TH)-International-Kennesaw, GA, EUA) e após foi centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -70°C para dosagem de citocinas.

Foram dosadas as citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IFN- γ e TGF- β no sobrenadante do homogenato do pulmão pelo método ELISA (EnzymeLinkedImmunsorbentAssay), de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences BD OptEIA™, San Diego, CA e eBioscience, San Diego, CA, EUA).

3.13 Dosagem sérica de anticorpos (IgE) específicos para ovalbumina

Brevemente, em cada poço de uma placa de 96 poços foi adsorvido 100 μL de OVA (10 $\mu\text{g/mL}$) e a placa foi incubada em duplicata por 12 horas a 4°C . Após, os poços foram lavados com PBS contendo 0,05% de Tween 20. As reações inespecíficas foram bloqueadas com a incubação por 1 hora a 37°C com PBS contendo 10% de soro fetal bovino. Os poços foram lavados e 100 μL das amostras de soro foram adicionadas. Após 2 horas a 37°C , os poços foram lavados e 100 μL dos anticorpos biotinilados foram adicionados. Decorrido 1 hora a 37° , os poços foram lavados e 100 μL de estreptavidina HRP (diluída 1:10.000; BD Bioscience, EUA) foram adicionados e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Os poços foram então lavados e a reação foi revelada decorrida 30 minutos da incubação com 100 μL de TMB (BD Bioscience, EUA). A reação foi interrompida com adição de 50 μL de ácido sulfúrico (16%). A leitura da absorbância foi lida com auxílio do espectrofotômetro Versa Max (Molecular Devices, EUA), no comprimento de onda de 450nm e os resultados foram expressos como unidades de densidade óptica.

3.14 Análise histológica do pulmão

Foram realizados cortes histológicos no pulmão com espessura de 5 μm e realizada coloração de Hematoxilina-Eosina (H&E). Para análise morfológica, foram selecionadas 4 a 5

vias aéreas de cada camundongo que apresentavam epitélio íntegro e relação do maior diâmetro/menor diâmetro maior ou igual a 0,5. Antes de serem analisadas, as lâminas foram visualizadas no microscópio LeicaDM500 (Leica, Alemanha) e as imagens foram fotografadas com um aumento de 200 vezes, transferidas para um computador e analisadas pelo software ImageJ - 1.45 (*Research of Services Branch, National Institute of Health- NIH*) (48).

Para quantificar a inflamação do tecido, primeiro foi delimitado a área entre a membrana da via aérea (membrana basal) e a área peribrônquica; após foi realizado a contagem de número de células totais dentro da área delimitada. A inflamação foi expressa pelo número de células inflamatórias dividido pela área da parede delimitada (49)

3.15 Análise capacidade antioxidante total (CAT)

A CAT foi avaliada a partir do método descrito por *Ozcan Erel* (50) em que foi analisado a oxidação de 2,2V-azinobis(3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonate) (ABTS +). A molécula de ABTS é oxidada para ABTS⁺ usando peróxido de hidrogénio em meio ácido de tampão de acetato (pH 3,6 30mmol/l). Essa solução diluída em um tampão mais concentrado de acetato (0,4 mol/l, pH 5,8) faz com que ocorra mudança de cor durante a produção do cátion ABTS⁺. A adição desse radical a um meio contendo antioxidantes, permite avaliar, através do grau de descoloração, a capacidade antioxidante do mesmo a um grau proporcional à sua concentração. O percentual de oxidação de ABTS⁺ é determinado em função da concentração e do tempo, expressa pela reatividade do trolox, como padrão (mmol/L).

3.16 Análise estatística

As variáveis categóricas foram expressas como porcentagem e as variáveis contínuas, como média e erro padrão. Os resultados encontrados decorrentes da administração *P. venusta* foram avaliados com os testes One Way ANOVA e Two Way ANOVA. Após, foi utilizado o pós-teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. A análise estatística foi realizada utilizando o programa de software GraphPad Prism versão 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação e quantificação dos componentes isolados a partir dos extratos aquoso e hidroetanólico de *P. venusta*

Quatro substâncias, ácido quínico (1), ácido clorogênico (2), verbascosídeo (3) e isoverbascosídeo (4) foram identificadas (figura 5) e quantificadas nos extratos aquoso e hidroetanólico de *P. venusta* (Apêndices A, B, C, D, E, F, G, H e I). A quantidade de ácido quínico foi maior do que as outras substâncias no extrato aquoso ($69,5 \pm 4,7$ mg/mL) e no extrato hidroetanólico ($64,2 \pm 6,2$ mg/ml), enquanto que o ácido clorogênico estava presente numa quantidade menor ($1,9 \pm 0,1$ mg/mL), em ambos os extratos. O verbascosídeo estava presente nos extratos aquoso e hidroetanólico na concentração de $36,3 \pm 2,5$ mg/mL e $38,1 \pm 2,1$ mg/ml, respectivamente; e o isômero isoverbascosídeo foi encontrado em uma concentração de $45,2 \pm 5,9$ mg/mL no extrato aquoso, e $49,6 \pm 3,7$ mg/ml no extrato hidroetanólico. Na tabela 2 encontram-se a quantificação dos componentes isolados dos extratos aquoso e hidroetanólico de *P. venusta*.

Figura 5 - Moléculas detectadas nos extratos de *P. venusta*: Ácido quínico (1), ácido clorogênico (2), verbascosídeo (3) e isoverbascosídeo (4).

Tabela 2 - Quantificação dos componentes isolados a partir dos extratos aquoso e hidroetanólico de *P. venusta*.

	Extrato aquoso	Extrato hidroetanólico
Ácido quínico	69,5 ± 4,7 mg/mL	64,2 ± 6,2 mg/ml
Ácido clorogênico	1,9 ± 0,1 mg/mL	1,9 ± 0,1 mg/mL
Verbascosídeo	36,3 ± 2,5 mg/mL	38,1 ± 2,1 mg/ml
Isoverbascosídeo	45,2 ± 5,9 mg/mL	49,6 ± 3,7 mg/ml

4.2 Avaliação in vivo da mecânica respiratória com a administração do extrato aquoso nas doses de 100mg/kg e 300mg/kg

A avaliação da responsividade brônquica nas doses de 100mg/kg (protocolo 1) e 300mg/kg (protocolo 2) são mostradas na Figura 6 e 7, respectivamente. Não houve diferenças nos valores basais de RRS, ERS, G e H entre os grupos estudados, nas duas doses de tratamento. No protocolo 1, o grupo sensibilizado e desafiado com OVA, quando comparado ao grupo controle, apresentou aumento significativo em RRS, ERS, G e H ($p < 0,05$), confirmando a hiper-responsividade brônquica. A administração do extrato PVA dose 100mg/kg aos camundongos sensibilizados e desafiados com OVA, diminuiu significativamente a hiper-responsividade brônquica, demonstrada pela redução significativa nos parâmetros RRS, ERS e G, quando comparada ao grupo OVA/SAL ($p < 0,05$). Portanto a administração de *P. venusta* na dose de 100mg/kg reduziu significativamente a hiper-responsividade brônquica (Figura 6).

Em relação ao protocolo 2, o grupo OVA/SAL apresentou aumento da responsividade brônquica, quando comparado ao grupo SAL/SAL, demonstrada por aumento significativo nos parâmetros RRS, ERS, G e H ($p < 0,05$). A administração do extrato PVA na dose de 300mg/kg diminuiu a hiper-responsividade brônquica, demonstrada por redução significativa nos parâmetros RRS, ERS, G e H ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo OVA/SAL (Figura 7).

Figura 6 - Avaliação da hiper-responsividade brônquica com a administração do extrato aquoso na dose de 100mg/kg (Protocolo 1). A hiper-responsividade brônquica foi avaliada 24h após os camundongos terem sido sensibilizados duas vezes com OVA, com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA intranasal diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam via intraperitoneal o extrato aquoso de *P. venusta* por três dias consecutivos. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. Foram avaliadas a resistência total (RRS), elastância total (ERS), resistência tecidual (G) e elastância tecidual (H). (n=8 a 10) *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Figura 7 - Avaliação da hiper-responsividade brônquica com a administração do extrato aquoso na dose de 300mg/kg (Protocolo 2). A hiper-responsividade brônquica foi avaliada 24h após os camundongos terem sido sensibilizados duas vezes com OVA, com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n. por quatro dias intercalados. Os camundongos receberam via i.p. tratamento com extrato aquoso de *P. venusta* por sete dias consecutivos ao início do desafio. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. Foram avaliadas a resistência total (RRS), elastância total (ERS), resistência tecidual (G) e elastância tecidual (H). (n=8 a 10) *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.3 Avaliação in vivo da mecânica respiratória com a administração do extrato hidroetanólico na dose de 300mg/Kg

A avaliação da responsividade brônquica é mostrada na Figura 8. Não houve diferenças significativas nos valores basais entre os grupos estudados. O grupo OVA/SAL apresentou hiper-responsividade brônquica quando comparado ao grupo SAL/SAL, demonstrada por aumento significativo em RRS, ERS, G e H (p<0,05). A administração do extrato PVHA na dose de 300mg/kg não reduziu significativamente a hiper-responsividade brônquica (Figura 8). Não foi possível avaliar a hiper-responsividade brônquica do extrato hidroetanólico na dose 100mg/kg pois quando os experimentos desse extrato foram realizados, o Flexivent estava quebrado.

Figura 8 - Avaliação da hiper-responsividade brônquica com a administração do extrato hidroetanólico na dose de 300mg/kg. A hiper-responsividade brônquica foi avaliada 24h após os camundongos terem sido sensibilizados duas vezes com OVA, com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n. por quatro dias intercalados. Os camundongos receberam via i.p. tratamento com extrato hidroetanólico de *P. venusta* por sete dias consecutivos ao início do desafio. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. Foram avaliadas a resistência total (RRS), elastância total (ERS), resistência tecidual (G) e elastância tecidual (H). (n=8 a 10) *p<0,05; **p<0,01 e p<0,001.

4.4 Contagem celular total e diferencial no lavado broncoalveolar (LBA) com a administração do extrato aquoso nas doses de 100mg/Kg (protocolo 1) e 300mg/kg (protocolo 2)

A contagem total e diferencial das células do LBA na dose de 100mg/kg e 300mg/kg são mostradas nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Em relação ao protocolo 1, houve aumento significativo no número total de células no LBA no grupo OVA/SAL quando comparado ao grupo SAL/SAL ($p<0,05$). A administração do extrato PVA na dose de 100mg/kg reduziu significativamente o número total de células no LBA do grupo OVA/PVA quando comparado ao grupo OVA/SAL ($p<0,05$) (Figura 9). Em relação às células diferenciais, houve aumento significativo do número eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos no LBA do grupo OVA/SAL quando comparado aos grupos SAL/SAL ($p<0,05$). A

administração do extrato PVA na dose de 100mg/kg reduziu significativamente o número de eosinófilos no LBA do grupo OVA/PVA quando comparado ao grupo OVA/SAL ($p<0,05$) (Figura 9).

Figura 9 - Contagem de células totais e diferenciais no LBA com a administração do extrato aquoso na dose de 100mg/kg (Protocolo 1). Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA via i.p. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam via i.p. tratamento com extrato aquoso de *P. venusta* por três dias consecutivos aos desafios. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. (n=8 a 10). * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ e **** $p<0,0001$.

Em relação ao protocolo 2, houve aumento significativo no número total de células no LBA no grupo OVA/SAL quando comparado aos grupos SAL/SAL ($p<0,05$). A administração do extrato PVA dose de 300mg/kg reduziu significativamente o número total de células no LBA do grupo OVA/PVA quando comparado ao grupo OVA/SAL ($p<0,05$), (Figura 10). Em relação as células diferenciais, houve aumento significativo do número eosinófilos e macrófagos no LBA do grupo OVA/SAL quando comparado ao grupo SAL/SAL ($p<0,05$). A administração do extrato PVA na dose de 300mg/kg reduziu significativamente o número de eosinófilos no LBA do grupo OVA/PVA quando comparado ao grupo OVA/SAL ($p<0,05$), (Figura 10).

Figura 10 - Contagem de células totais e diferenciais no LBA com a administração do extrato aquoso na dose de 300mg/kg (Protocolo 2). Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA via i.p. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n. por quatro dias alternados. Os camundongos receberam via i.p. tratamento com extrato aquoso de *P. venusta* na dose de 300mg/kg por sete dias consecutivos ao início do desafio. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. (n=8 a 10). *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

4.5 Contagem celular total e diferencial no lavado broncoalveolar (LBA) com a administração do extrato hidroetanólico nas doses de 100mg/Kg (protocolo 1) e 300mg/kg (protocolo 2)

A contagem total e diferencial das células do LBA nas doses de 100mg/kg e 300mg/kg são mostradas nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

Em relação ao protocolo 1, houve aumento significativo no número total de células no LBA no grupo OVA/SAL quando comparado ao grupo SAL/SAL ($p<0,05$). A administração do extrato PVHA na dose de 100mg/kg não reduziu significativamente o número total de células no LBA do grupo OVA/PVHA quando comparado ao grupo OVA/SAL (Figura 11). Em relação as células diferenciais, houve aumento significativo do número eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos no LBA do grupo OVA/SAL quando comparado aos grupos SAL/SAL ($p<0,05$). A administração do extrato PVHA dose de 100mg/kg aumentou significativamente o número de eosinófilos e macrófagos no LBA do grupo OVA/PVHA quando comparado aos grupos OVA/SAL, (Figura 11).

Figura 11 - Contagem de células totais e diferenciais no LBA com a administração do extrato hidroetanólico na dose de 100mg/kg - Protocolo 1. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA via i.p. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam via i.p. tratamento com extrato hidroetanólico de *P. venusta* na dose de 100mg/kg por três dias consecutivos aos desafios. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. (n=8 a 10). **p<0,01 e ***p<0,001.

Em relação ao protocolo 2, houve aumento significativo no número total de células no LBA no grupo OVA/SAL quando comparado aos grupos SAL/SAL ($p<0,05$). A administração do extrato PVHA dose de 300mg/kg reduziu significativamente o número total de células no LBA quando comparado ao grupo OVA/SAL ($p<0,05$) (Figura 12). Em relação ao número de células diferenciais, houve aumento significativo do número eosinófilos e macrófagos no LBA do grupo OVA/SAL quando comparado aos grupos SAL/SAL ($p<0,05$). A administração do extrato PVHA dose 300mg/kg reduziu significativamente o número de eosinófilos e macrófagos no LBA do grupo OVA/PVHA quando comparado ao grupo OVA/SAL ($p<0,05$), (Figura 12).

Figura 12 - Contagem de células diferenciais no LBA com a administração do extrato hidroetanólico na dose de 300mg/kg - Protocolo 2. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA via i.p. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n. por quatro dias alternados. Os camundongos receberam via i.p. tratamento com extrato hidroetanólico de *P. venusta* na dose de 300mg/kg por sete dias ao início do desafio. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. (n=8 a 10). *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001.

4.6 Níveis de IgE específica para ovalbumina com administração dos extratos aquoso e hidroetanólico na dose 300mg/kg

Houve aumento significativo nos níveis de IgE específica para OVA no grupo OVA/SAL quando comparado com o grupo SAL/SAL (p<0,05). A administração dos extratos aquoso e hidroetanólico nas doses de 300mg/kg não alteraram significativamente os níveis de IgE anti-ovalbumina (Figura 13).

Figura 13 - Níveis de IgE específica para OVA no soro. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA via i.p. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n. por quatro dias alternados. Um grupo de camundongos recebeu via i.p. tratamento com extrato hidroetanólico de *P. venusta* na dose de 300mg/kg e um outro grupo recebeu tratamento com extrato aquoso, ambos os grupos com tratamento de sete dias ao início do desafio. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. (n=8 a 10).*** $p < 0,001$.

4.7 Dosagem de citocinas com administração dos extratos aquoso e hidroetanólico na dose 300mg/kg

Os níveis das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ e TGF- β encontram-se na Figura 14. Houve um aumento significativo nos níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e TGF- β no grupo OVA/SAL quando comparado ao grupo SAL/SAL ($p < 0,05$). A administração dos extratos *P. venusta* aquoso e hidroetanólico na dose de 300mg/kg não alteraram significativamente os níveis das citocinas inflamatórias, quando comparados com seus respectivos controles. Os níveis de IFN-gama não alteraram significativamente entre os grupos estudados.

Figura 14 - Níveis de citocinas no homogenato pulmonar. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA via i.p. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n. por quatro dias alternados. Um grupo de camundongos recebeu via i.p. tratamento com extrato hidroetanólico de *P. venusta* na dose de 300mg/kg e um outro grupo recebeu tratamento com extrato aquoso, ambos os grupos com tratamento de sete dias ao início do desafio. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. (n=8 a 10).

4.8 Quantificação das células inflamatórias no tecido pulmonar com a administração do extrato aquoso na dose de 300mg/kg

Os camundongos sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram aumento significativo no número de células inflamatórias no tecido pulmonar, em comparação ao grupo SAL/SAL ($p<0,05$). Adicionalmente, o número de células inflamatórias no tecido pulmonar reduziu significativamente no grupo tratado com *P. venusta* na dose de 300mg/kg (OVA/PVA) em comparação com o grupo OVA/SAL ($p<0,05$) (Figura 15).

Figura 15 - Quantificação das células inflamatórias do tecido pulmonar. A, B e C: fotomicrografia representativa dos grupos SAL/SAL (A), OVA/SAL (B), OVA/PVA dose 300mg/kg (C), respectivamente. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA via i.p. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n. por quatro dias alternados. Os camundongos receberam via i.p. tratamento com extrato aquoso de *P. venusta* na dose de 300mg/kg por sete dias consecutivos ao início do desafio. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. (n=6 a 8). * $p<0,05$; *** $p<0,001$.

4.9 Análise da capacidade antioxidante no homogenato pulmonar com administração dos extratos aquoso e hidroetanólico na dose 300mg/kg

A Figura 16 representa a avaliação da capacidade antioxidante total no homogenato pulmonar. Houve um aumento significativo na capacidade antioxidante do grupo tratado com

extrato aquoso de *P. venusta* (OVA/PVA) na dose de 300mg/kg quando comparado ao grupo OVA/SAL ($p<0,05$).

Figura 16 - Dosagem da capacidade antioxidante total (CAT) no tecido pulmonar. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA via i.p. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n. por quatro dias alternados. Um grupo de camundongos recebeu via i.p. tratamento com extrato hidroetanólico de *P. venusta* na dose de 300mg/kg e um outro grupo recebeu tratamento com extrato aquoso, ambos os grupos com tratamento de sete dias ao início do desafio. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. (n=8 a 10). * $p<0,05$.

5 DISCUSSÃO

Em nosso trabalho, avaliamos os efeitos de dois extratos, aquoso e hidroetanólico, de *P. Venusta*, em diferentes doses, no tratamento da asma em camundongos sensibilizados e desafiados com ovalbumina. Nossos dados demonstram que o extrato hidroetanólico não apresentou boa resposta no tratamento da asma. Porém, o extrato aquoso, na dose de 300 mg/kg, foi capaz de reduzir as principais características da asma, tais como a hiper-responsividade brônquica, inflamação das vias aéreas e pulmonar. Entretanto, a administração desse extrato não modulou a produção de citocinas inflamatórias ou anti-inflamatórias, e sim aumentou a capacidade antioxidante total. Assim, nós postulamos que extrato aquoso apresenta boa resposta antiasmática e atua aumentando a capacidade antioxidante.

A asma é uma doença complexa e heterogênea, com diversos mecanismos fisiopatológicos. As principais características da asma são obstrução reversível ao fluxo aéreo, hiper-responsividade brônquica e inflamação das vias aéreas (1).

A hiper-responsividade brônquica é uma característica central asma, caracterizada por estreitamento anormal das vias aéreas em resposta a um estímulo broncoconstritor. Os mecanismos envolvidos na hiper-responsividade brônquica ainda não foram totalmente estabelecidos, algumas possíveis explicações incluem redução do calibre da via aérea, espessamento da parede brônquica, aumento da permeabilidade da mucosa, aumento do número de células inflamatórias, liberação de mediadores químicos, mudanças estruturais e aumento da contratilidade muscular (1). Além disso, as citocinas envolvidas na patogênese da asma, estimulam a secreção de anticorpos IgE e de células eosinofílicas. Os eosinófilos quando aumentados em pacientes asmáticos, contribuem para a broncoconstrição, secreção de muco e dano no tecido das vias aéreas, contribuindo para a manutenção do processo inflamatório (51).

É conhecido que o desequilíbrio entre a produção de ROS e antioxidantes contribuem para a patogênese da asma (52). Quando as células inflamatórias, tais como eosinófilos, neutrófilos, monócitos e macrófagos, estão ativadas, elas podem produzir ROS que, pelo menos parcialmente, estão correlacionados com a hiper-responsividade das vias aéreas (53, 54). Por outro lado, os baixos níveis plasmáticos de antioxidantes estão associados com asma mais grave (55). Alguns estudos demonstraram que a suplementação com antioxidantes via oral melhorou a função pulmonar e diminuiu a inflamação nas vias aérea ou sistêmica (56).

Existem diversas maneiras para avaliar a capacidade antioxidante total, tais como “Poder antioxidante redutor total (FRAP)”, “Capacidade de absorção do radical oxigênio

(ORAC)” e “Capacidade antioxidante total equivalente ao trolox (CAT) (57). Como algumas medições são demoradas, a avaliação pela dosagem da CAT via formação ABTS⁺ (CAT) ganhou popularidade entre os pesquisadores e foi a que utilizamos em nosso estudo (58). Além disso, a CAT é um bom índice do potencial antioxidante não enzimático global e tem sido mostrado para ser positivamente correlacionado com a função pulmonar (58, 59). Em nosso estudo, apenas o extrato aquoso de *P. venusta* apresentou aumento significativo dos níveis de antioxidantes. Portanto, este resultado apoia que os efeitos antiasmáticos de *P. venusta* são pelo menos parcialmente mediadas pela sua atividade antioxidante.

Os tratamentos para a asma são feitos, majoritariamente, com medicamentos sintéticos, como broncodilatadores, corticóides, antagonistas de leucotrienos, anticorpo monoclonal (4). Porém, o custo para produzir essas drogas sintéticas é muito elevado (60), e apesar de serem eficazes no tratamento, cerca de dez por cento dos asmáticos não atingem o controle adequado da doença (61). Além disso, cerca de 5 a 10% dos pacientes com asma grave não respondem aos corticóides inalatórios ou orais (4). Sendo assim, uma alternativa, ou complementariedade, ao tratamento seria o uso de plantas medicinais (62). *Blanc et al.* mostraram em seu estudo que medicamentos à base de ervas têm sido terapia de escolha adicional para pacientes asmáticos (63).

Diversos estudos têm avaliado os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes de extratos vegetais no tratamento da asma, reforçando assim o grande potencial das drogas fitoterápicas (16). Apesar das propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes de *P. Venusta* (39, 43), não existe em nosso conhecimento, nenhum estudo que avaliou o seu uso no tratamento da asma.

A atenuação da hiper-responsividade brônquica decorrente da administração de extratos vegetais já havia sido descrito por outros autores, como utilização de *Curcuma longa* L (34). Entretanto, esse estudo avaliou a hiper-responsividade por pletismografia. Essa técnica avalia de forma indireta a mecânica respiratória e, conseqüentemente, estão sujeitas a intervenções do meio externo, como estresse do camundongo, o que pode fazer com que essas medidas não representem fidedignamente as alterações fisiológicas analisadas (64). Por outro lado, a avaliação *in vivo* da mecânica respiratória realizada por um ventilador mecânico, como utilizado em nosso estudo, é considerada uma medida direta, sendo um parâmetro mais fidedigno de alterações na função pulmonar.

A redução da hiper-responsividade brônquica pela administração de *P. venusta* aquosa na dose de 300mg/kg pode estar relacionada com a diminuição de células totais e de eosinófilos no LBA. Acreditamos que esses resultados ocorreram pelo aumento da capacidade antioxidante. A liberação de mediadores químicos estimula a contração da musculatura lisa

brônquica e a inflamação da mucosa, provocando edema e espasmo muscular, simultaneamente ocorre produção de ROS (65). Assim, o extrato aquoso de *P. venusta* pode ter atenuado a inflamação via aumento dos níveis antioxidantes.

Além disso, a redução do número eosinófilos bem como a hiper-responsividade brônquica são achados importantes, visto que eles desempenham um papel central na patogênese da asma. O número de células eosinofílicas está aumentado em indivíduos asmáticos, principalmente no pulmão e no trato respiratório superior, e contribuem para a broncoconstrição, secreção de muco e dano ao tecido das vias aéreas. Eles liberam diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, muitas consideradas como pró-inflamatórias, que contribuem para a manutenção do processo inflamatório (66). Portanto, a atenuação dessas principais características da asma em modelos animais é de suma importância, para que o mesmo possa ser considerado para futuros ensaios clínicos.

Inicialmente, nossa hipótese era que a *P. venusta* pudesse amenizar a asma, através de um aumento nos níveis de IL-10, visto que no estudo de Roy et al., sobre cicatrização de feridas em ratos da espécie wistar, houve aumento de IL-10 sérico no grupo tratado com extrato metanólico de flores de *P. Venusta* por via oral. Porém, em nosso estudo não houve aumento nos níveis de IL-10, o que se sugere que os efeitos benéficos não são dependentes da produção de IL-10. Vale ressaltar que o modelo animal usado Roy et al. é diferente do nosso, assim como a via de administração (via oral vs intraperitoneal), podendo esses fatores influenciarem nos mecanismos pró e anti-inflamatórios (43).

Nosso estudo mostrou que o extrato hidroetanólico não apresenta atividade anti-inflamatória na dose de 100 mg/kg e com uma dose maior (300mg/kg) foi capaz de reduzir somente as células inflamatórias das vias aéreas, não diminuindo a hiper-responsividade brônquica. A maioria dos estudos mostra que o extrato hidroetanólico possui ação anti-inflamatória (42, 44), o que foi confirmado em nosso estudo. Porém, a redução da inflamação não foi suficiente para reduzir também a hiper-responsividade brônquica. O que sugerimos a partir desses resultados é que como a asma é uma doença complexa, heterogênea e com diversos mecanismos envolvidos (1), em nosso modelo, a inflamação não estava diretamente ligada à hiper-responsividade (10, 11). Corroborando com nossos achados, atualmente existem modelos que demonstram que não existe uma correlação direta entre hiper-responsividade e inflamação, podendo estes estarem ligados ou não (67,68).

Adicionalmente, Veloso et al. analisaram os efeitos do extrato hidroetanólico nos sintomas induzidos por lipopolissacarídeos em camundongos nas doses de 30, 100 e 300mg/kg e demonstraram que na dose de 300 mg/kg ocorreu a melhor resposta (69). Apesar

de não termos realizado uma curva dose-resposta, utilizamos a maior dose descrita, que não foi capaz de reduzir as características de asma em um modelo animal. Outros estudos com doses e tempo de tratamento maiores são necessários para avaliar se extrato hidroetanólico pode também apresentar efeito benéfico no tratamento da asma.

Uma das possíveis explicações para a diminuição da inflamação e o aumento do poder antioxidante mostrados em nosso trabalho, deve-se aos compostos químicos presentes nessa planta. *P. venusta* é rica em terpenóides, alcalóides, taninos entre outros, e todos esses compostos têm potencial antioxidante. Além disso, ela contém grande quantidade de flavanóides que são conhecidos por serem fontes naturais de antioxidantes, contribuindo para prevenir os danos causados pelo estresse oxidativo (70), e também contém verbascosídeos, sendo grandes catalisadores de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibidores da peroxidação lipídica (45). Sendo assim, acreditamos que a via do estresse oxidativo foi a via responsável pela atenuação da inflamação, visto que muitos estudos mostram que as espécies reativas de oxigênios apresentam um papel fundamental na inflamação e nos danos teciduais (58).

Foram identificadas quatro substâncias em nosso estudo, o ácido quínico, o ácido clorogénico, verbascosídeo, e isoverbascosídeo, sendo esses dois últimos compostos majoritários. O ácido quínico está relacionado com a atenuação da asma, pois está ligado a um grupo de ácido cafeico, o que resulta em ácido clorogénico, que apresenta efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antiasmáticos (71). A quantidade de ácido quínico encontrada foi maior no extrato aquoso do que no extrato hidroetanólico, assim a sua concentração mais elevada no extrato aquoso pode ser o responsável pela melhor resposta antiasmática em nosso modelo animal, quando comparada com o extrato hidroetanólico.

O ácido clorogénico foi quantificado em nosso estudo e está presente numa quantidade menor em ambos os extratos. Os componentes verbascosídeo e isoverbascosídeo foram quantificados em concentrações semelhantes em ambos os extratos. Estudos anteriores mostraram que a atividade antioxidante dos compostos majoritários é devido a presença do grupo orto-di-hidroxifenil (72,73). Além disso, os derivados do ácido cafeico, tais como o ácido clorogénico, verbascosídeo e isoverbascosídeo têm demonstrado efeitos anti-inflamatórios e antiasmáticos (71,74). Dessa forma, pode-se sugerir que esses compostos podem ser os responsáveis pelo efeito antiasmático de *P. venusta*.

Como elucidado anteriormente, outros extratos vegetais já foram avaliados em modelos animais de asma e os estudos divergem nos protocolos de sensibilização e desafios e tratamento. Como, por exemplo, Machado et al. analisaram a atividade antialérgica do extrato

Cymbopogon citratus em um modelo animal de asma, tratando via oral seus animais por 7 dias e obtiveram que o extrato reduziu o número de eosinófilos no lavado broncoalveolar, número de leucócitos no tecido pulmonar, produção de muco no trato respiratório e o nível de IL-4 no LBA e inibiu a expressão de NF- Kb (75).

Woo-Young Jeon et al. avaliaram os efeitos de *Samsoeum*, um composto contendo doze diferentes ervas em um modelo animal de asma. Nesse estudo, foram realizadas duas sensibilizações com OVA num intervalo de 14 dias, e após uma semana da segunda sensibilização, os animais foram desafiados por três dias seguidos, via aerossol. Dois dias antes do início dos desafios, iniciou-se o tratamento via gavagem, por seis dias consecutivos. Como resultados, esse composto reduziu o número de células totais e de eosinófilos no LBA, reduziu os níveis de citocinas pró inflamatórias no LBA, reduziu os níveis de IgE no plasma e no LBA, e inibiu a infiltração de células inflamatórias e produção de muco no tecido pulmonar, além de inibir a formação de óxido nítrico no tecido pulmonar (76).

Se-Woong Oh et al. (34) avaliaram os efeitos da curcumina na inflamação de vias aéreas e na hiper-responsividade brônquica em um modelo animal de asma. Um grupo de animais recebeu tratamento via gavagem e um outro grupo recebeu via intraperitoneal, ambos por sete dias. Os autores analisaram a responsividade brônquica por pletismografia, e demonstraram que o tratamento com curcumina via ip reduziu significativamente a hiper-responsividade brônquica e os animais tratados via gavagem também reduziu, porém, não de forma significativa.

Um outro estudo avaliou os efeitos de Sakuranetina em um modelo animal de asma sobre os efeitos na inflamação pulmonar crônica, responsividade brônquica, inflamação das vias aéreas e remodelamento. Foram estudados quatro grupos: grupo controle, grupo sensibilizado e desafiado com OVA, grupo sensibilizado e desafiado com OVA e tratado com Sakuranetina, e grupo sensibilizado e desafiado com OVA e tratado com dexametasona. A Sakuranetina atenuou a hiper-responsividade brônquica, inflamação e remodelamento brônquico, sendo esses resultados atribuídos a redução das citocinas pró-inflamatórias e redução do estresse oxidativo (77).

Em nosso laboratório, recentemente foi realizado um estudo com *Eclipta prostrata*, em que foi administrado o extrato metanólico dessa planta nas doses de 100, 250 e 500 mg/kg por sete dias. Como resultados, o estudo obteve uma diminuição da hiper-responsividade brônquica, redução de células totais e eosinofílicas e redução das citocinas inflamatórias IL-4, IL-5 e IL-13 com a administração do extrato na dose de 250mg/kg. (78).

Em suma, não existe um consenso do tempo de tratamento adequado em um modelo experimental de asma. Além disso, a administração da droga via gavagem é a forma usada na maioria dos estudos, diferentemente da via i.p. escolhida em nosso estudo, o que pode ser uma limitação de nosso trabalho. Porém, essa forma foi escolhida para iniciar os estudos com *P. venusta* em um modelo animal de asma, visto que até hoje nenhum estudo avaliou a atividade anti-inflamatória e antioxidante em um modelo semelhante ao nosso.

Uma limitação de nosso estudo foi ter avaliado apenas uma via de defesa antioxidante total, tendo várias vias mais específicas para avaliar o estresse oxidante e a defesa antioxidante. Outra limitação de nosso estudo é a falta de um grupo tratado com corticosteroide. Porém, o nosso objetivo era avaliar se a *P. venusta* apresentava resposta anti-asmática e não compará-la com o tratamento padrão. Também avaliamos os efeitos *P. venusta* em um modelo de asma aguda, o que não permitiu avaliar os efeitos dessa planta no remodelamento brônquico. Mais estudos, com diferentes doses e tempo de tratamento ainda são necessários.

6 CONCLUSÕES

Podemos concluir que a administração de extrato hidroetanólico de *P. venusta* na dose de 100 mg/kg não reduziu as principais características inflamatórias, e na dose de 300 mg/kg reduziu apenas o número total de células e de eosinófilos no LBA

A administração de extrato aquoso de *P. venusta* nas doses de 100 e 300 mg/kg diminuiu a hiper-responsividade brônquica, reduziu o número total de células e de eosinófilos no LBA. Além disso, o tratamento com 300mg/kg desse extrato reduziu as células inflamatórias no tecido pulmonar e aumentou a capacidade antioxidante.

Desta forma, o extrato de *P. venusta* aquosa atenuou as principais características da asma em um modelo animal provavelmente por um mecanismo antioxidante.

REFERÊNCIAS

- 1 Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma, (GINA), 2016. 2016.
- 2 [IV Brazilian Guidelines for the management of asthma]. JbrasPneumol. 2006; 32 Suppl 7, p:S447-74, 2006.
- 3 ANANDAN, C. et al. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. **Allergy**, v.65(2), p.152-67, 2010.
- 4 OLIN, J.T.; WECHSLER, M. E. Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment. **BMJ**, v.349, p.5517, 2014.
- 5 MASOLI, M. et al. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy**, v.59(5), p.469-78, 2004.
- 6 STANLEY, J.S.; SZEFLER, M.D. Advancing asthma care: the glass is only half full. **Allergy Clin Immunol**, v.128(3), p.485–494, 2011. doi10.1016/j.jaci.2011.07.010.
- 7 Portal Brasil. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2015/01/asma-atinge-6-4-milhoes-de-brasileiros>. Acesso em: 14 mai. 2016.
- 8 Boletim Epidemiológico. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/maio/06/2015-026-doencas-respiratorias-cronicas.pdf>. Acesso em: 14 mai. 2016.
- 9 Chronic Respiratory Diseases; World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>. Acesso em: 03 mai. 2016.
- 10 BOUSQUET, J. et al. Eosinophilic inflammation in asthma. **The New England journal of medicine**, v.323(15), p.1033-9, 1990.
- 11 BOUSQUET, J. et al. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v.161(5), p.1720-45, 2000.
- 12 VIGNOLA, A.M. et al. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v.157(2), p.403-9, 1998.
- 13 HOLGATE, S.T. Pathogenesis of asthma. **Clinical and experimental allergy**, v.38(6), p.872-97, 2008. doi10.1111/j.1365-2222.2008.02971.x.
- 14 GEORAS, S.N. et al. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. **The European respiratory journal**, v.26(6), p.1119-37, 2005. doi: 10.1183/09031936.05.00006005.
- 15 SAHINER, U.M. et al. Oxidative Stress in Asthma. **WAO Journal**, v.4, p.151–158, 2011. doi10.1097/WOX.0b013e318232389e.

- 16 BARBOSA, K.B.F et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista Nutrição**, v. 23(4), p.629-643, 2010.
- 17 SANDRA, M. L. V. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química nova**, v. 30(5), p. 1323-1338, 2007.
- 18 SILVA, P.A. **Efeitos da inibição crônica das óxido nítrico sintases na mecânica de tecido periférico, no recrutamento eosinofílico e no remodelamento da matriz extracelular induzida por inflamação crônica pulmonar**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008.
- 19 BUSH, A.; SAGLANI, S. Management of severe asthma in children. **The Lancet**, v.376(9743), p.814-25, 2010. doi10.1016/S0140-6736(10)61054-9.
- 20 FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. Editora Atheneu, 2008.
- 21 LORENZI, H.; MATOS F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Instituto Plantarum, 2008.
- 22 SAAD, G.A. et al. **Fitoterapia Contemporânea: tradição e ciência na prática clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- 23 BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 5ª edição, Brasília: ANVISA, 2010.
- 24 BRASIL. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 10: Guia de notificação de drogas vegetais**. Brasília: ANVISA, p.8, 2010.
- 25 CARVALHO, A.C.B.; SILVEIRA, D. Drogas vegetais: uma antiga forma de utilização de plantas medicinais. **Brasília Med.** v.48(2), p.219-37, 2010.
- 26 BRASIL. Lei nº 6360 (23 de setembro de 1976). Brasília: Diário Oficial da União, 1976.
- 27 BRASIL. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diretoria Colegiada. Resolução-RDC nº 37 (6 de julho de 2009). Brasília: Diário Oficial da União, 2009.
- 28 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa nº 5: Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado, de 11 de dezembro de 2008. Brasília: Diário Oficial da União, p. 9, 2008.
- 29 CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v.55(3), p.37-9, 2003.
- 30 ERNST, E. Complementary therapies for asthma: what patients use? **Journal of Asthma**, v.35, p.667-71, 1998.
- 31 III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma, J Pneumol 28 (Supl 1) – Junho de 2002.

- 32 LEAL, L.K.A.M. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p.151–159, 2000.
- 33 BABAYIGIT, A. et al. Effects of Ginkgo biloba on airway histology in a mouse model of chronic asthma. **Allergy Asthma**, v.30, p.186-91, 2009.
- 34 OH, S.W. et al. Curcumin attenuates allergic airway inflammation and hyper-responsiveness in mice through NF-kappaB inhibition. **Journal of ethnopharmacology**, v.136(3), p.414-21, 2011.
- 35 FIERRO, I.M. et al. Studies on the anti-allergic activity of Mikania glomerata. **Journal of ethnopharmacology**, v.66(1), p.19-24, 1999.
- 36 NAPIMOGA, M.H.; YATSUDA, R. Scientific evidence for Mikania laevigata and Mikania glomerata as a pharmacological tool. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v.62(7), p.809-20, 2010.
- 37 BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 1ª edição ed. Brasília: ANVISA, p. 126, 2011.
- 38 FERREIRA, D.T. et al. Constituintes químicos das raízes de Pyrostegia venusta e considerações sobre a sua importância medicinal. **Química Nova**, v.23(1), p.42-6, 2000.
- 39 VELOSO, C.C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the hydroethanolic extract of the flowers of Pyrostegia venusta in mice. **Braz J Pharmacognosy**, v.22(1), p.162-8, 2012.
- 40 GUPTA, M.B. et al. Anti-inflammatory and antipyretic activities of beta-sitosterol. **Planta Med**, v.39, p.157-33, 1980.
- 41 SHEN, K.H. et al. Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway. **Mol Cell Biol**, v.33, p.279-91, 2010.
- 42 VELOSO, C.C. et al. Hydroethanolic extract of Pyrostegia venusta (Ker Gawl.) Miers flowers improves inflammatory and metabolic dysfunction induced by high-refined carbohydrate diet. **J Ethnopharmacol**, v.151(1), p.722-8, 2014.
- 43 ROY, P. et al. In vivo antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of Pyrostegia venusta (Ker Gawl) Miers. **J Ethnopharmacol**, v.140(1), p.186-92, 2012.
- 44 ROY, P. et al. Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of Pyrostegia venusta (Ker Gawl) Miers). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p.69, 2011.

- 45 PEREIRA, A.M.S. et al. Evaluation of anticandidal and antioxidante activities of phenolic compounds from *Pyrostegia venusta* (Ker gawl.) Miers. **Chemico-Biological Interactions**, v.224, p.136–141, 2014.
- 46 BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17: Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Brasília: ANVISA; 2010. p. 8.
- 47 HANTOS, Z. et al. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. **J Appl Physiol**, v.72(1), p.168-78, 1992.
- 48 SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods**, v.9(7), p.671-5, 2012.
- 49 CINZIA, L. et al. A role for decorin in a murine model of allergen-induced asthma. **AJP-Lung Cell Mol Physiol**, v.300, p.863-873, 2011.
- 50 EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidante apacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v.37, p.277-285, 2004.
- 51 DAVOINE, F., LACY, P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. **Frontier in Immunology**, v.5, p.570, 2014.
- 52 MORENO-MACIAS, H., ROMIEU, I. Effects of antioxidant supplements and nutrients on patients with asthma and allergies. **J Allergy Clin Immunol**, v. 133(5), p.1237-44, 2014.
- 53 DONG, C.C. et al. Effect of diesel exhaust particles on allergic reactions and airway responsiveness in ovalbumin-sensitized brown Norway rats. **Toxicol Sci**, v.88(1), p.202-12, 2005.
- 54 BOER, J. et al. Role of nitric oxide and superoxide in allergen-induced airway hyperreactivity after the late asthmatic reaction in guinea-pigs. **Br J Pharmacol**, v.133(8), p.1235-42, 2001.
- 55 MISSO, N. L. et al. Plasma concentrations of dietary and nondietary antioxidants are low in severe asthma. **Eur Respir J**, v.26(2), p.257-64, 2005.
- 56 HOSKINS, A. et al. Natural-source d- α -tocopheryl acetate inhibits oxidant stress and modulates atopic asthma in humans in vivo. **Allergy**, v.67(5), p.676-82, 2012.
- 57 KUSANO, C., FERRARIL, B. Total antioxidant capacity (TAC) in clinical, experimental and nutritional studies. **J Health Sci Inst**, v.28(4), p.307-10, 2010.
- 58 NADEEM, A. et al. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v.111(1), p.72-8, 2003.
- 59 YOON, S.Y. et al. The impact of total antioxidant capacity on pulmonary function in asthma patients. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.16(11), p.1544-50, 2012.

- 60 SMITH, D.H. et al. A National Estimate of the Economic Costs of Asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v.156, p.787–793, 1997.
- 61 ASSAYAG, E.I.; BEAULIEU, M.J.; CORMIER, Y. Bronchodilatory and Anti-Inflammatory Effects of ASM-024, a Nicotinic Receptor Ligand, Developed for the Treatment of Asthma. **Plos one**, v.9, 2014. dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086091.
- 62 CARMONA, F.; PEREIRA, A.M.S. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.23, p.379-385, 2013.
- 63 BLANC, P.D. et al. Alternative Therapies Among Adults With a Reported Diagnosis of Asthma or Rhinosinusitis. **CHEST**, v.120, p.1461-1467, 2001. doi:10.1378/chest.120.5.1461.
- 64 INMAN, M.D. Trends and recommendations in studies of mouse airway function. **Clin Exp Allergy**, v.40, p.524-527, 2010.
- 65 TODO-BOM, A.; MOTA-PINTO, A. Fisiopatologia da asma grave. **Revista Portuguesa De Imunoalergologia**, v.14, p.43-48, 2016.
- 66 DAVOINE, F.; LACY, P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. **Frontiers Immunology**, v.5, 2014. doi10.3388/fmmj2014.00570.
- 67 JANSSEN-HEININGER, Y.M.W. et al. Airway Hyperresponsiveness and Inflammation: Causation, Correlation, or No Relation? **J Allergy Ther**, 2012.
- 68 BUSSE, W.W. The Relationship of Airway Hyperresponsiveness and Airway Inflammation. **CHEST**, v.138, 2010.
- 69 VELOSO, C.C. et al. *Pyrostegia venusta* attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p.355-358, 2010.
- 70 MOSTAFA, N.M.; EL-DAHSHAN, O.; SINGAB, A.N.B. *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers: A Botanical, Pharmacological and Phytochemical Review. **Med Aromat Plants**, v.2, 2013. dx.doi.org/10.4172/2167-0412.1000123.
- 71 KIM, H.R. et al. Chlorogenic acid suppresses pulmonary eosinophilia, IgE production, and Th2-type cytokine production in an ovalbumin-induced allergic asthma: Activation of STAT-6 and JNK is inhibited by chlorogenic acid. **Int Immunopharmacol**, v.10, p.1242-1248, 2010.
- 72 YAMADA, P. et al. Inhibitory effect of acteoside isolated from *Cistanche tubulosa* on chemical mediator release and inflammatory cytokine production by RBL-2H3 and KU812 cells. **Planta Med**, v.76, p.1512-1518, 2010.
- 73 JIMÉNEZ, C.; RIQUEIRA, R. Phenylethanoid Glycosides in Plants: Structure and Biological Activity. **Nat Prod Rep**, v.11, p.591-606, 1994.

- 74 LEE, J. Y. et al. Anti-asthmatic effects of phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum* leaves and *Rumex gmelini* herbes in conscious guinea-pigs challenged with aerosolized ovalbumin. **Phytomedicine**, v.18, p.134-142, 2011.
- 75 MACHADO, M.S.S. et al. The anti-allergic activity of *Cymbopogon citratus* is mediated via inhibition of nuclear factor kappa B (Nf-Kb) activation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, p. 168, 2015.
- 76 JEON, W.Y. et al. Samsoeum water extract attenuates allergic airway inflammation via modulation of Th1/Th2 cytokines and decrease of iNOS expression in asthmatic mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, 2015. doi10.1186/s12906-015-0561-3.
- 77 TOLETO, A.C. et al. Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. **British Journal of Pharmacology**, v.168, p.1736–1749, 2013.
- 78 MOREL, L.J.F.J. et al. A standardized methanol extract of *Eclipta prostrata* (L.) L.(Asteraceae) reduces bronchial hyperresponsiveness and production of Th2 cytokines in a murine model of asthma. **Journal of Ethnopharmacology**, 2016, submitted.

ANEXOS

ANEXO A: Aprovação do comitê de ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 072/2013, sobre a aula intitulada "*Avaliação do uso de extratos de plantas medicinais no tratamento da asma em um modelo animal.*", sob a responsabilidade do **Professor Doutor Fábio Carmona** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 24 de junho de 2013.

We certify that the protocol nº 072/2013, entitled "*Evaluation of medicinal plant extracts in the treatment of asthma in animal models*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 06/24/2013.

Ribeirão Preto, 24 de junho de 2013.

Prof. Dr. Omêro Benedicto Poli-Neto
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal FMRP-USP

APÊNDICES

Apêndice A: (a) UPLC-DAD cromatograma do verbascosídeo (b) UPLC-ESI-MS cromatograma do verbascosídeo.

Apêndice B: (a) UPLC-DAD cromatograma do isoverbascosídeo (b) UPLC-ESI-MS cromatograma do isoverbascosídeo.

Apêndice C: (a) UPLC-DAD cromatograma do extrato aquoso de *P. venusta*. (b) UPLC-ESI-MS cromatograma do extrato aquoso de *P. venusta* (RT = 12.46 min – verbascosídeo e RT = 13.00 – isoverbascosídeo).

Apêndice D: (a) UPLC-DAD cromatograma do extrato hidroetanólico de *P. venusta*. (b) UPLC-ESI-MS cromatograma do extrato hidroetanólico de *P. venusta* (RT = 12.46 min – verbascosídeo e RT = 13.00 – isoverbascosídeo).

Apêndice E: (a) UPLC-DAD cromatograma do ácido clorogênico (b) UPLC-ESI-MS cromatograma do ácido clorogênico.

Apêndice F: (a) UPLC-DAD cromatograma do extrato aquoso de *P. venusta*. (b) UPLC-ESI-MS cromatograma do extrato aquoso de *P. venusta* (RT= 9.39 min – ácido clorogênico).

Apêndice G: (a) UPLC-DAD cromatograma do extrato hidroetanólico de *P. venusta*. (b) UPLC-ESI-MS cromatograma do extrato hidroetanólico de *P. venusta* (RT= 9.39 min – ácido clorogênico).

Apêndice H: (a) UPLC- ESI-MS cromatograma do ácido quínico (b) UPLC-ESI-MS cromatograma do extrato aquosos de *P. venusta*. (TR = 2.49 – ácido quínico).

Apêndice I: (a) UPLC- ESI-MS cromatograma do ácido quínico (b) UPLC-ESI-MS cromatograma do extrato hidroetanólico de *P. venusta*. (TR = 2.49 – ácido quínico).