UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ALESSA CASTRO RIBEIRO

Avaliação de uso de *Momordica charantia* L. no tratamento de asma em modelo animal

Ribeirão Preto

2016

ALESSA CASTRO RIBEIRO

Avaliação de uso de *Momordica charantia* L. no tratamento de asma em modelo animal

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

Área de concentração: Saúde da Criança e do
Adolescente

Orientador: Prof. Dr. Fabio Carmona

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ribeiro, Alessa Castro

Avaliação do uso de *Momordica charantia* L. no tratamento de asma em modelo animal

58p., il, 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP –

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Dr. Fábio Carmona

1. Asma, 2. Cucurbitaceae , 3. Fitoterápico

Nome: RIBEIRO, Alessa Castro

Título: Avaliação de uso de *Momordica charantia* L. no tratamento de asma em modelo animal

Dissertação apresentada a faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de mestre.
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

A Marcel com amor, e gratidão por sua compreensão, carinho, e companheirismo durante a
elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de participar de um trabalho científico inovador e que me trouxe grandes contribuições científicas e profissionais.

Aos meus pais, Reine e Eva, pelo apoio incondicional na minha busca por conhecimento e na formação pessoal.

Ao Prof. Dr. Fábio Carmona, pelo tempo de convivência e ensino, que muito contribuiu para meu conhecimento pessoal, científico e profissional.

A equipe do Laboratório de Fisiopatologia Pulmonar Experimental da FMRP-USP, em especial ao Prof. Dr. Marcos de Carvalho Borges, pelo tempo de qualidade e ensino, primordial para minha formação.

A Instituição Casa Espírita Terra de Ismael pelo cultivo e carinho com plantas medicinais.

A equipe do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UNAERP, em especial a Prof.^a Dr.^a Ana Maria Soares Pereira, pelo apoio e carinho no manuseio das plantas medicinais.

RESUMO

RIBEIRO, A.C. *Momordica charantia* L. no tratamento de asma em modelo animal. 2016. 58p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A asma é uma doença crônica das vias aéreas responsável por significativa morbidade e mortalidade mundial. Medicamentos anti-inflamatórios, tais como os corticosteróides, são algumas das opções de tratamento mais importantes, no entanto, elas podem causar efeitos secundários indesejáveis. Historicamente, as plantas foram uma fonte principal de moléculas com atividade biológica. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do *MC*, um extrato vegetal brasileira com propriedades anti-inflamatórias, no tratamento da asma em um modelo animal. Métodos: Camundongos machos Balb/C, com idade de 5 a 6 semanas, foram sensibilizados com ovalbumina (OVA) por via intraperitoneal (IP) por duas vezes, com uma semana de intervalo, e desafiados diariamente com OVA intranasal durante três dias. Os animais foram tratados diariamente com a *MCA* (aquoso) *MCHA* (hidroalcólico) na dose 500 mg/kg ip por três dias, durante os desafios. Os camundongos do grupo controle receberam solução salina nos mesmos dias. Cinco a oito animais por grupo foram utilizados. Vinte e quatro horas após o último desafio, os ratinhos foram ventilados com um respirador animal pequeno (FlexiVent®), e foram realizadas medições in vivo da hiperreatividade brônquica com concentrações crescentes de metacolina em aerossol (6,25, 12,5, 25 e 50 mg / ml). Os parâmetros avaliados e comparados foram: a resistência total (RRS), elastância total (ERS), resistência do tecido (G) e elastância tecidual (H). Após ventilação, foi colhido lavado broncoalveolar (LBA) para análise da contagem de células totais e diferenciais. Interleucinas inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ) foram analisadas no homogenato pulmonar além da dosagem sérica de IgE anti-OVA. Os pulmões dos animais foram coletados para análise histológica (H&E). Resultados: O tratamento com extrato *MCHA* reduziu significativamente a hiperresponsividade brônquica através da mensuração das medidas RRS ($p<0,001$), ERS ($p<0,05$), G ($p<0,05$) and H ($p<0,001$), quando comparado com o grupo de animais asmáticos não tratados. Extratos de *MCA* e *MCHA* reduziram também significativamente células totais ($p<0,05$) e contagem de eosinófilos ($p<0,05$). *MCHA* reduziu a concentração de IFN- γ ($p<0,01$) quando comparado aos animais asmáticos não tratados. *MCA* ($p<0,001$) mostrou uma significativa redução do número de células inflamatórias por área quando comparado ao grupo asmático não tratado. Conclusão: Os dois extratos (aquoso e hidroetanólico) das folhas da espécie *Momordica charantia* L., na dose de 500 mg/kg, foi eficaz no tratamento da asma em modelo animal induzido por ovalbumina tanto em medidas da mecânica pulmonar quando em marcadores inflamatórios e estudo histológico, sendo o extrato hidroetanólico potencialmente mais eficaz na dose estudada.

Palavras-chave: 1. Asma, 2. Cucurbitaceae, 3. Fitoterápico

ABSTRACT

RIBEIRO, A.C. *Momordica charantia* L. in the treatment of asthma in an animal model. 2016. 58p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Asthma is a chronic disease of the airways responsible for significant morbidity and mortality worldwide. Anti-inflammatory medications, such as corticosteroids, are some of the most important treatment options, however they can cause undesirable side effects. Historically, plants have been a major source of molecules with biological activity. The objective of this study was to evaluate the effect of *MC*, a Brazilian herbal extract with anti-inflammatory properties, on asthma treatment in an animal model.

Methods: Male Balb/c mice, 5 to 6 weeks, were sensitized twice with ovalbumin (OVA) intraperitoneally (ip), one week apart, and challenged daily with OVA intranasally for three days. Mice were treated daily with *MCA* (aqueous) *MCHA* (hydroethanolic) extract (500 mg/kg) ip for three days, during challenges. Control mice received saline on the same days. Five to eight mice were utilized per group. Twenty-four hours after the last challenge, mice were ventilated with a small-animal ventilator (FlexiVent®), and *in vivo* measurements of bronchial hyperresponsiveness were performed with increasing concentrations of methacholine aerosol (6.25, 12.5, 25 and 50 mg/ml). The following parameters were evaluated and compared: total resistance (RRS), total elastance (ERS), tissue resistance (G) and tissue elastance (H). After ventilation, was collected bronchoalveolar lavage (BAL) for analysis of total and differential count inflammatory cells. Interleukins (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ) were analyzed in lung homogenate. Moreover serum anti-OVA IgE were dosage. The lungs of the animals were collected for histological analysis (H & E) **Results:** Treatment with *MCHA* extract significantly decreased airway hyperresponsiveness, measured by RRS ($p<0,001$), ERS ($p<0,05$), G ($p<0,05$) and H ($p<0,001$), when compared to OVA-challenged mice. *MCA* e *MCHA* extract also significantly reduced BAL total cell ($p<0,05$) and eosinophil counts ($p<0,05$). *MCHA* reduced IFN- γ concentration ($p<0,01$) as compared to the untreated group asthmatic. *MCA* ($p<0,001$) showed a significant reduction in the number of inflammatory cells per unit area in the air compared to the asthmatic untreated group. **Conclusion:** The administration of *MCA* and *MCHA* from the leaves of *Momordica charantia* L. species, at a dose of 500 mg / kg was effective in the treatment of asthma in animal models induced by ovalbumin in both pulmonary mechanics measurements as inflammatory markers, and histological study, and potentially more effective *MCHA* extract the studied dose.

Keywords: 1. Asthma, 2. Cucurbitaceae, 3. Phytotherapeutic

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Protocolo de sensibilização e desafio dos camundongos com ovalbumina (OVA). 27
- Figura 2.** Número total de células no lavado bronco-alveolar (LBA) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. 32
- Figura 3.** Contagem relativa de eosinófilos e macrófagos no lavado bronco-alveolar (LBA) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. 32
- Figura 4.** Contagem relativa de neutrófilos e linfócitos no lavado bronco-alveolar (LBA) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. 33
- Figura 5.** Contagem absoluta de eosinófilos e macrófagos no lavado bronco-alveolar (LBA) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg.....34
- Figura 6.** Contagem absoluta de neutrófilos e linfócitos no lavado bronco-alveolar (LBA) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg.....34
- Figura 7.** Resistência Pulmonar Total (RRS) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. 35
- Figura 8.** Elastância Pulmonar Total (ERS) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. 36
- Figura 9.** Resistência Tecidual (G) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. 37

Figura 10. Elastância Tecisual (H) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de <i>Momordica charantia</i> L. na dose de 500 mg/kg.	38
Figura 11. Concentração de IL-13 (pg/mL) do homogenato pulmonar dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de <i>Momordica charantia</i> L. na dose de 500 mg/kg.	39
Figura 12. Concentração de IL-5 (pg/mL) do homogenato pulmonar dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de <i>Momordica charantia</i> L. na dose de 500 mg/kg.	39
Figura 13. Concentração de IL-4 (pg/mL) do homogenato pulmonar dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de <i>Momordica charantia</i> L. na dose de 500 mg/kg.	40
Figura 14. Concentração de IL-10 (pg/mL) do homogenato pulmonar dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de <i>Momordica charantia</i> L. na dose de 500 mg/kg.	40
Figura 15. Concentração de Interferon-Gama (pg/mL) do homogenato pulmonar dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de <i>Momordica charantia</i> L. na dose de 500 mg/kg.	41
Figura 16. Concentração de IgE-Ovalbumina (pg/mL) do homogenato pulmonar dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de <i>Momordica charantia</i> L. na dose de 500 mg/kg.	42
Figura 17. Células inflamatórias do tecido pulmonar. A,B,C,D,E,F: Micrografia representativas do seguintes grupos SAL-SAL(A), OVA-SAL (B), SAL-MCA(C), OVA-MCA (D),SAL-MCHA(E),OVAMCHA(F).....	43
Figura 18. Análise Histológica Pulmonar com coloração Hematoxilina e Eosina. Quantificação de número de células inflamatórias em relação a área medida em pixels ² (Cel/Pilxels ²) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados	

com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia*
L. na dose de 500 mg/kg.43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência
CONCEA, Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP
COX-2, ciclo-oxigenase 2
CVF, capacidade vital funcional
DMSO, dimetilsulfóxido
ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
EPO, proteína catiônica eosinofílica
ECP, peroxidase eosinofílica
ERS, elastância total
FMRP-USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
G, resistência tecidual
GM-CSF, fator estimulador de crescimento de granulócitos e monócitos
H, elastância tecidual
i.p., intraperitoneal
ICAM-1, *intercellular adhesion molecule 1*
IFN, interferon
IL, interleucina
iNOS, óxido nítrico sintetase induzível
ISAAC, *International study of asthma and allergies in childhood*
LBA, lavado broncoalveolar
MBP, proteína básica principal
MCA, extrato aquoso de *Momordica charantia*
MCHA, extrato hidroetanólico (ou hidroalcoólico) de *Momordica charantia*
NANC, fibras nervosas não-adrenérgicas/não colinérgicas
NF-κB, fator nuclear *kappa-B*
OVA, ovalbumina
PCR, proteína C reativa
PFE, pico de fluxo expiratório
RRS, resistência total
SAL, solução salina isotônica
SUS, Sistema Único de Saúde
TGO, transaminase glutamato-oxaloacética

TGP, transaminase glutamato-pirúvica

TNF, fator de necrose tumoral

UNAERP, Universidade de Ribeirão Preto

VCAM-1, *vascular cell adhesion protein 1*

VEF1, volume expiratório forçado no primeiro segundo

VRS, vírus respiratório sincicial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Hipótese.....	24
1.2	Relevância do Estudo.....	24
2	OBJETIVOS.....	24
2.1	Objetivos específicos	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Desenho do estudo	25
3.2	Material	25
3.2.1	Camundongos	25
3.2.2	Obtenção e preparo da droga vegetal	25
3.2.2	Extratos	26
3.2.3	Controle de qualidade.....	26
3.2.4	Dose.....	26
3.3	Delineamento do estudo	26
3.3.1	Protocolo de sensibilização e desafio.....	27
3.3.2	Medida dos parâmetros <i>in vivo</i> da função pulmonar.....	28
3.3.3	Lavado broncoalveolar	29
3.3.4	Dosagem de citocinas inflamatórias no Homogenato Pulmonar	29
3.3.5	Dosagem sérica de anticorpos IgE anti-ovalbumina	30
3.3.6	Processamento e fixação pulmonar	30
3.3.7	Histoquímica	30
3.3.8	Análise dos resultados	31
4	RESULTADOS	31
4.1	Contagem de células totais e diferenciais	31
4.2	Medida dos parâmetros <i>in vivo</i> da função pulmonar	35
4.3	Dosagem de citocinas inflamatórias no homogenato pulmonar	38
4.4	Dosagem sérica de anticorpos IgE anti-ovalbumina.....	41
4.5	Análise Histológica	42
5	DISCUSSÃO.....	43
6	CONCLUSÃO.....	47
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
8	ANEXOS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma Brônquica

Definição

A asma brônquica é uma doença heterogênea, geralmente caracterizada por uma inflamação crônica das vias aéreas, sendo definida pela história de sintomas respiratórios como sibilância, dispneia, opressão torácica e tosse, que variam ao longo do tempo e em intensidade, juntamente com limitação variável do fluxo aéreo expiratório (1).

Inflamação da via aérea, hiper-responsividade brônquica e crises de broncoespasmo com obstrução reversível ao fluxo aéreo são características principais da doença. Um quarto aspecto que pode ser incluído nesta definição diz respeito às alterações anátomo-funcionais da via aérea inferior, chamadas, em conjunto, de remodelamento brônquico, e que estão diretamente relacionadas à inflamação crônica da via aérea e ao prognóstico da doença (2).

O desenvolvimento e manutenção da asma dependem da ação de fatores externos variados em indivíduos geneticamente predispostos e é considerada, em todo mundo, um problema de saúde pública, devido à alta prevalência e custos socioeconômicos (2,3).

Epidemiologia

A incidência da asma em estudo multicêntrico ISAAC (*International study of asthma and allergies in childhood*), realizado em 56 países mostrou uma variabilidade na prevalência de asma ativa em escolares e adolescentes de 1,5% a 37,6% no mundo, com média de 11,6% e 13,7% em escolares e adolescentes, respectivamente (2,4,5).

Atualmente é uma das condições crônicas mais comuns, e afeta de 1-18% da população adulta e pediátrica de diferentes países, ou seja, cerca de 300 milhões de indivíduos. Estima-se que existam aproximadamente 20 milhões de asmáticos no Brasil, considerando uma prevalência global de 10%. Em 2011 foram registradas pelo DATASUS 160 mil hospitalizações em todas as idades, classificando a asma como quarta causa de internações no Sistema Único de Saúde (SUS) (2-4).

O custo direto no tratamento da asma, bem como a utilização de serviços de saúde e medicações, dobra entre pacientes com asma não controlada, sendo a falta de controle da mesma o maior componente relacionado a utilização dos serviços de saúde. Entretanto o gasto direto relacionado a medicações é maior entre os portadores de asma controlada. O custo da asma aumenta proporcionalmente com a gravidade da doença (4-6).

Os custos indiretos estão relacionados a fatores socioeconômicos e psicológicos, e estão relacionados em maior escala a pacientes asmáticos não controlados, considerando que o paciente asmático, quando em crise, apresenta absenteísmo escolar e no trabalho, perda da produtividade, restrição física, emocional e social, o que gera impacto negativo na família e sociedade, além do potencial risco de mortalidade (1, 6, 7).

Etiologia e Patologia

A inflamação das vias aéreas é considerada o mecanismo fisiopatológico de proteção presente mesmo em asmáticos assintomáticos (8, 9, 10). A inflamação é definida como resposta dos tecidos vascularizados frente a uma agressão, com o propósito de reparar e restaurar o tecido danificado. No entanto, a inflamação crônica causa alterações estruturais. Essa inflamação resulta de uma interação complexa entre diferentes tipos de células, fibras musculares e endotélio (11,12,13).

Os mecanismos inflamatórios na asma ocorrem em dois momentos. Inicialmente há uma fase aguda na qual se inicia após a exposição a agentes desencadeadores, promovendo alteração da permeabilidade vascular, broncoconstrição e hiper-responsividade brônquica. A fase crônica, ocorre posteriormente, na qual há nova fase de obstrução da via aérea, como consequência do efeito de citocinas e outras substâncias produzidas pelas células inflamatórias (14, 15).

A inflamação brônquica constitui o mais importante mecanismo fisiopatológico da asma, e resulta de interações complexas entre células inflamatórias, mediadores inflamatórios e células estruturais das vias aéreas. Está presente não apenas em asmáticos graves ou com doença de longa duração, mas também em pacientes com asma de início recente, em pacientes com formas leves da doença e mesmo nos assintomáticos (15).

O desenvolvimento da asma é influenciado por fatores ambientais, ocupacionais e individuais (genéticos). Os principais fatores externos associados ao desenvolvimento de asma são os alérgenos inaláveis (substâncias do corpo e fezes de ácaros domésticos, antígenos fúngicos, de insetos como baratas e de animais domésticos, além de pólenes) e os vírus respiratórios, particularmente as infecções pelo vírus sincicial respiratório (VSR) nos primeiros anos de vida (1, 2, 7, 8).

Poluentes ambientais, como a fumaça de cigarro, gases e poluentes particulados em suspensão no ar, como as partículas provenientes da combustão do óleo diesel, também parecem atuar como fatores promotores ou facilitadores da sensibilização aos alérgenos e da hiper-responsividade brônquica em indivíduos predispostos (15).

Cerca de 300 substâncias já foram identificadas como potenciais agentes causais de asma ocupacional, e acredita-se que 10% das asma iniciadas na idade adulta estejam associadas a estes agentes (15).

Diversos genes candidatos, em diferentes níveis de associação e penetração, têm sido associados a diferentes fenótipos de asma. Tipicamente, o impacto destes diversos genes individualmente nas manifestações fenotípicas da doença é pequeno, porém a atuação sinérgica de múltiplos genes pode ser relevante dentro de um contexto ambiental favorável.

A especificação de genes isolados na asma se torna difícil devido a heterogeneidade fenotípica: início em idade indeterminada, estágios variados de gravidade e intensidade, associação a diferentes fenótipos intermediários, como atopia, hiper-responsividade brônquica, níveis séricos de IgE, dermatite atópica, dentre outros (1,2).

A predisposição geneticamente determinada para produzir grandes quantidades de anticorpos IgE específicos para alérgenos ambientais/inaláveis (substâncias de ácaros da poeira, fungos, insetos, animais domésticos e pólenes), acontece na asma atópica. Estes indivíduos se tornam sensibilizados, ou seja, já produzem IgE específica para um ou mais destes alérgenos, e apresentam uma resposta de hipersensibilidade imediata (mediada por IgE) na mucosa da via aérea quando entram em contato com estas substâncias novamente (16).

A ligação do alérgeno à IgE na membrana dos mastócitos na mucosa e submucosa brônquica leva à ativação e à degranulação dos mesmos, liberando mediadores inflamatórios pré-formados (já estocados em seus grânulos), como a histamina e o fator ativador de plaquetas (PAF), além de mediadores neoformados, produzidos a partir do ácido araquidônico liberado da membrana celular, como prostaglandinas e leucotrienos. Os efeitos imediatos destas substâncias são vasodilatação e extravasamento vascular, com consequente edema da parede brônquica, hipersecreção de muco e broncoconstricção, responsáveis pelas manifestações clínicas da crise de asma (17).

As interleucinas (IL-3, IL-5) e fator estimulador de crescimento de granulócitos e monócitos (GM-CSF) são produzidos pelos mastócitos ativados, e junto com os leucotrienos, atraem e ativam outras células inflamatórias à parede brônquica, que prosseguem o processo inflamatório local. A inflamação brônquica da asma apresenta características especiais. Ativação e degranulação de mastócitos, como infiltração eosinofílica, lesão intersticial e epitelial das vias aéreas e ativação de linfócitos Th2 que produzem citocinas, como IL-4, IL-5, IL-13, entre outras, são responsáveis pela amplificação e agravamento do processo inflamatório (8, 17).

A IL-4 tem papel importante no aumento da produção e expressão de IgE específica de receptores de alta e baixa afinidade para IgE por células inflamatórias, como mastócitos, basófilos e eosinófilos. A IL-5 é importante na atração, ativação e aumento da sobrevivência de eosinófilos, principal célula efetora da lesão tecidual através da liberação de proteínas catiônicas que agredem a matriz extracelular e as células epiteliais. A IL-13 age de forma semelhante a IL-4, aumentando a produção de IgE específica por linfócitos B diferenciados em plasmócitos, tanto em nível local como a distância (8, 17).

Vários mediadores inflamatórios e citocinas também são liberados por outras células ativadas, como macrófagos [fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-6, óxido nítrico], linfócitos T (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 e GM-CSF), eosinófilos [proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO), prostaglandinas, leucotrienos e citocinas], neutrófilos (elastase) e células epiteliais (endotelina-1, prostaglandinas, leucotrienos, óxido nítrico). Além disso, o endotélio vascular ativado tem um papel importante no recrutamento de células inflamatórias através do aumento da expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 e VCAM-1. Através de seus mediadores, as células causam lesões e alterações na integridade epitelial, anormalidades no controle neural autônomo e no tônus da via aérea, alterações na permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso da via aérea, levando à hiper-responsividade brônquica (17,18).

Neste processo inflamatório crônico, as células epiteliais e miofibroblastos, presentes abaixo do epitélio, se ativam e proliferam iniciando a deposição intersticial de colágeno e proteoglicanos na lâmina reticular da membrana basal, explicando o aparente espessamento e lesões irreversíveis que podem ocorrer em pacientes com asma mais grave ou de longa evolução (18).

Outras alterações, incluindo hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, elevação no número de células caliciformes, aumento das glândulas e vasos sanguíneos submucosos e alteração no depósito/degradação dos componentes da matriz extracelular, são constituintes do remodelamento que interfere na arquitetura da via aérea, podendo levar à irreversibilidade da obstrução brônquica nos casos graves e de longa evolução (18-20).

Todas estas alterações estruturais ocorrem devido à ativação e desregulação da atividade normal do epitélio brônquico, miofibroblastos da camada subepitelial e o músculo liso brônquico. Estudos recentes, inclusive, demonstraram a capacidade da célula muscular lisa ativada transformar-se também numa célula com atividade pró-inflamatória, produzindo

citocinas e adquirindo a capacidade de expressar diversas moléculas de superfície importantes na inflamação crônica (19).

Infecções virais do trato respiratório alto ou baixo são o principal fator desencadeante de crises tanto em adultos quanto em crianças. Os vírus respiratórios têm a capacidade de aumentar consideravelmente a hiper-responsividade brônquica, ao estimularem o processo inflamatório e aumentarem a disfunção autonômica local pelas fibras nervosas não-adrenérgicas/não colinérgicas (NANC) da submucosa. Além disso, o atópico apresenta maior facilidade em contrair infecções virais respiratórias, particularmente pelo rinovírus, que utiliza moléculas de adesão como ICAM-1, que têm sua expressão aumentada no epitélio brônquico inflamado, como receptores para a infecção destas células. Desta forma, os vírus podem ser importantes fatores de aumento e manutenção da inflamação brônquica e de agravamento da doença, particularmente em crianças (18).

A fibrose subepitelial está presente, em graus variáveis, em todos os indivíduos com asma, mesmo antes do surgimento de sintomas. O remodelamento brônquico é definido pela hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa brônquica, que se correlaciona com a gravidade e o tempo de doença, associadas à proliferação vascular e ao aumento de tamanho das glândulas submucosas, colaboram para o progressivo espessamento da parede brônquica, e redução da reversibilidade da obstrução ao fluxo aéreo (20).

Diagnóstico Clínico e Diferencial

O diagnóstico clínico da asma é sugerido por uma associação de sintomas: dados clínicos obtidos pela anamnese, identificação da sensibilidade alérgica e parâmetros de função pulmonar. As manifestações que sugerem fortemente o diagnóstico de asma são a variabilidade dos sintomas, como sibilância, dispneia, opressão torácica e tosse, que variam ao longo do tempo e em intensidade, juntamente com limitação do fluxo aéreo expiratório variável (1, 2).

O diagnóstico da condição alérgica baseia-se na busca de outras manifestações atópicas pregressas ou familiares (asma, rinite ou dermatite atópica), na relação dos sintomas com fatores específicos (poeira, mofo, animais domésticos) e na identificação de IgE específica para os principais alérgenos inaláveis intradomiciliares (ácaros, fungos, cães/gatos e baratas), através do teste cutâneo de leitura imediata, que é o método mais rápido, sensível e de melhor relação custo-benefício para este fim, se realizado de forma adequada, por profissional treinado e com extratos alergênicos confiáveis (2).

O diagnóstico da asma como de caráter alérgico é feito através da presença de IgE específica para um ou mais alérgenos inaláveis, definindo a presença de sensibilização alérgica/atópica, e a correlação desta informação com a história clínica do paciente. A dosagem sérica de IgE específica deverá ser utilizada na impossibilidade da realização de teste cutâneo de forma adequada, como por exemplo, no uso crônico de anti-histamínicos, presença de eczema extenso ou durante período de descontrole da asma (1).

A espirometria é utilizada no diagnóstico funcional de adultos e crianças maiores. A classificação inicial da gravidade da doença é realizada através de duas medidas importantes de limitação ao fluxo de ar das vias aéreas: volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁) e capacidade vital funcional (CVF). A redução da relação entre estas duas medidas (VEF₁/CVF) e intensidade dessa limitação é determinada pela redução percentual do VEF₁ em relação ao seu previsto. A demonstração significativa da reversibilidade, parcial ou completa, da limitação ao fluxo de ar após a inalação de broncodilatadores de curta ação, auxiliam na confirmação diagnóstica (21,22).

A variação diurna exagerada do pico de fluxo expiratório (PFE) pode ser utilizada para documentar a obstrução variável do fluxo aéreo. Em indivíduos sintomáticos com espirometria normal e ausência de reversibilidade demonstrável ao uso de broncodilatador, o diagnóstico pode ser confirmado pela demonstração de hiper-responsividade brônquica através de teste de broncoprovocação com agentes broncoconstrictores (metacolina, histamina, carbacol) ou teste de broncoprovocação por exercício (23).

O diagnóstico diferencial da asma é amplo, particularmente em crianças menores de cinco anos de idade e idosos. As dificuldades são maiores nos asmáticos com obstrução fixa ao fluxo aéreo e nos fumantes. Cabe ressaltar que a determinação funcional de significativa variabilidade do fluxo aéreo reduz em muito as dúvidas diagnósticas (2).

Tratamento

De acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o manejo da asma em 2012, os objetivos principais do tratamento da asma são: controlar os sintomas; prevenir a limitação crônica ao fluxo aéreo, secundária ao remodelamento brônquico; permitir atividades normais; manter a função pulmonar normal ou a melhor possível; evitar crises e visitas a emergência e hospitalizações; reduzir a necessidade do uso de broncodilatador para alívio; minimizar efeitos adversos da medicação e prevenir a morte (2).

O tratamento da asma é indicado de acordo com a classificação e gravidade da doença. Dessa forma segundo a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, o tratamento da asma pode ser dividido em cinco etapas (2).

Na primeira fase, o principal objetivo é a promoção da educação do paciente e o controle ambiental, utilizando medicação de alívio sintomas ocasionais (tosse, sibilos ou dispneia ocorrendo duas vezes ou menos por semana) de curta duração (24). Geralmente o paciente está assintomático, entre esses episódios, com função pulmonar normal e sem despertar noturno. Utiliza-se dessa forma, beta-agonista de rápido ação, além de anticolinérgico inalatório, beta-2-agonista oral ou teofilina oral, mas esses têm um início de ação mais lento e um maior risco de efeitos adversos (25).

Na fase 2, são usados inicialmente corticosteroides inalatórios em doses baixas (26,27). Medicamentos alternativos incluem antileucotrienos (28-30) para aqueles que apresentam efeitos adversos indesejáveis com o uso de corticosteroide inalatório.

Na fase seguinte, a associação de um corticosteroide inalatório em doses baixas com um beta-2-agonista inalatório de ação prolongada é a primeira escolha. Um beta-2-agonista de ação rápida é utilizado para o alívio de sintomas conforme necessário. Como alternativa, aumenta-se a dose do corticosteroide inalatório (31-33). Outras opções são a adição de um antileucotrieno (34-39) ou a adição de teofilina, nesta ordem.

Na fase 4, o recomendado é que o tratamento seja conduzido por um médico especialista. A escolha preferida consiste na combinação de corticosteroide inalatório em doses médias ou altas com um beta-2-agonista de ação prolongada. Como alternativa, pode-se adicionar um antileucotrieno ou teofilina (40).

Na etapa 5, adiciona-se corticosteroide oral às outras medicações de controle já referidas (41), mas deve-se sempre considerar os efeitos adversos potencialmente graves. Esse esquema somente deve ser empregado para pacientes com asma não controlada na fase 4, que tenham limitação de suas atividades diárias e frequentes exacerbações. A adição de anti-IgE é uma alternativa na etapa 5 para pacientes atópicos, pois sua utilização pode melhorar o controle da asma e reduzir o risco de exacerbações (42-47).

O manejo da asma depende de medidas culturais, socioeconômicas e regionais. Além disso, o comprometimento com tratamento é importante em um contexto geral, sendo necessário o estabelecimento de uma parceria médico-paciente, identificação e controle dos fatores de risco, avaliação, monitoramento e manutenção do controle da asma, prevenção e controle de riscos futuros e consideração de situações especiais no manejo da asma.

A resposta ao tratamento é variável entre os pacientes e, apesar da eficácia do tratamento medicamentoso disponível, alguns pacientes não atingem o controle preconizado. Além disso, alguns dos medicamentos utilizados, como os corticosteroides, podem apresentar efeitos colaterais indesejáveis, tais como, redução do crescimento, osteopenia e osteoporose, catarata, glaucoma, entre outros (48). Desta forma, se faz necessário a busca por novas drogas anti-inflamatórias para o tratamento da asma, como os medicamentos fitoterápicos.

1.2 Medicamentos Fitoterápicos

A utilização de plantas como medicamento 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 (49, 50). Sua principal vantagem em relação à terapia convencional é o sinergismo do fitocomplexo. O isolamento de um único princípio ativo (uma única substância) pode ser vantajoso em algumas situações, mas não em outras, onde a atuação do fitocomplexo é superior à de quaisquer dos componentes isoladamente (49). 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 (51). Estima-se que cerca de 80% da população mundial faça uso de plantas ou de suas preparações na atenção primária à saúde (52).

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) (53, 54, 55, 56). Recentemente, a 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (2010) e o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2011) contêm monografias de inúmeros medicamentos fitoterápicos.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define os fitoterápicos como sendo medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais, obtidos empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco e outros) (57,58).

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 ultrapassam a cifra de 800 milhões de dólares (59), 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 (60).

Dentre as terapias existentes para o tratamento da asma, os medicamentos fitoterápicos podem assumir grande importância. Inúmeros estudos têm sido publicados sobre o efeito de diversos extratos vegetais com propriedades anti-inflamatórias e broncodilatadores (59, 61).

Em um estudo experimental recente, foi proposto tratamento para asma através da curcumina, um polifenol presente no rizoma da espécie *Curcuma longa* L. (“açafrão-da-terra,” Zingiberaceae), que tem sido usado há séculos como remédio anti-inflamatório na medicina asiática. Neste trabalho, foi demonstrado que a curcumina pode ter um efeito benéfico no tratamento da asma através da inibição do fator nuclear *kappa*-B (NF-kB) (63). Outros estudos realizados com *Mikania glomerata* Spreng. (“guaco,” Asteraceae) e *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker (“guaco,” Asteraceae) demonstraram que estas plantas também apresentam ação anti-inflamatória nas vias aéreas (64,65).

Atualmente, no Brasil, a ANVISA regulamentou o uso de algumas espécies vegetais como anti-inflamatórias (54, 55, 61) e outras como broncodilatadoras (54, 55, 61). Porém, ainda existem outras espécies que necessitam de investigação quanto a sua eficácia no tratamento da asma.

***Momordica charantia* L.**

A *Momordica charantia* L. (“melão-de-são-caetano,” Cucurbitaceae) é uma planta trepadeira anual, com origem do sul da China e leste da Índia. O seu fruto é oblongo e pendente, do tipo cápsula, de coloração verde quando fruto novo e muda para uma cor mais alaranjada quando maduro, com sementes avermelhadas no interior. As folhas são membranosas, pilosas, lobadas com cinco até sete lóbulos e lisas. *Mordica* em latim significa mordida, uma referência às bordas da folha dessa planta, que parece que foi mordida (66,67).

A *M. charantia* é um planta medicinal com ação anti-inflamatória e com potencial para o tratamento da asma. A espécie cresce em áreas tropicais, incluindo partes da Amazônia, África Oriental, Ásia e Caribe, sendo cultivada em toda América do Sul para o uso em forma de alimento ou medicamento (66, 67).

Na Amazônia, as populações locais e tribos indígenas cultivam esta planta medicinal com fins de alimentação e medicamentos. Medicinalmente, a planta tem uma longa história de uso pelos povos indígenas amazônicos. O chá da folha da *M. charantia* é utilizado no controle de diabetes, para expelir gases intestinais, promover a menstruação, e como um antiviral contra sarampo, hepatite, e para febre. Usado topicamente para lesões, feridas e infecções e, internamente e externamente para vermes e parasitas (67).

A *M. charantia* é uma terapia alternativa que tem sido principalmente usado para diminuir os níveis de glicose no sangue em doentes com diabetes mellitus. Componentes do extrato desta planta parecem ter semelhanças estruturais com insulina animal. Atividades antivirais e anti-neoplásicas também têm sido relatadas in vitro (67). A espécie é rica em momordicinas e momordicosídeos, substâncias que garantem suas propriedades hipoglicemiantes, antitumorais e antivirais (49).

Estudos pré-clínicos têm demonstrado que a *M. charantia* é promissora no controle de peso e deposição de gordura. Os estudos têm mostrado que a planta é capaz de reduzir o ganho de peso associado a dietas ricas em gorduras. Além disso, esta planta apresenta potencial para o tratamento de todas as condições associadas à síndrome metabólica (68).

A *M. charantia* consta na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (61), na lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado da ANVISA (RDC-10) (54) e no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (60) para uso medicinal.

Desta forma, considerando que mesmo com o tratamento disponível atualmente para asma, alguns pacientes não atingem o controle preconizado, e que essas drogas possuem efeitos colaterais indesejáveis, mais estudos são necessários para descoberta de novos medicamentos anti-inflamatórios para o tratamento da asma, como os medicamentos fitoterápicos.

1.2 Hipótese

Extratos das folhas da espécie *M. charantia* apresentam atividade anti-inflamatória e reduzem a inflamação e a hiper-responsividade brônquica em modelo experimental de asma.

1.3 Relevância do Estudo

O tratamento da asma atualmente apresenta alto ônus financeiro além de efeitos colaterais indesejados e difícil controle da doença. O estudo de fitoterápicos anti-inflamatórios em modelo animal de asma contribui de forma a apresentar uma ferramenta adicional no tratamento e menores índices de internações e complicações decorrentes da asma.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da administração dos extratos aquoso e hidroetanólico de *M. charantia*, no tratamento da asma em um modelo experimental, e os mecanismos envolvidos.

2.1 Objetivos específicos

Foram avaliados como objetivos específicos:

- Alterações celulares (contagem celular total e diferencial) no lavado broncoalveolar;
- Alterações na responsividade brônquica;
- Produção de citocinas por células do tipo Th1 e Th2 no homogenato pulmonar;
- Quantificação de alterações histológicas pulmonares.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

O estudo foi dividido em duas etapas:

1. Verificação da atividade terapêutica: os extratos (aquoso e hidroetanólico) foram testados na dose de 500 mg/kg;
2. Verificação das alterações celulares, citocinas e remodelamento brônquico.

3.2 Material

3.2.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c machos, 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 no Biotério do Departamento de Clínica Médica, com livre acesso a água e alimento. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (CONCEA), protocolo nº 072/2013 (ANEXO A).

3.2.2 Obtenção e preparo da droga vegetal

A espécie é 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 foi depositada no Herbário da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). A parte da planta que foi usada são as folhas.

A planta foi lavada e o excesso de água foi removido com folhas de papel. A seguir, a planta foi seca 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 é chamado de droga vegetal.

3.2.2 Extratos

Foram preparados extratos aquoso e hidroetanólico da espécie, conforme abaixo:

1. Extrato aquoso: em 1 L de água fervente foram adicionados 100 g de droga vegetal, deixando em infusão por 1 hora. A seguir, o extrato foi filtrado em papel de filtro e em seguida, liofilizado.
2. Extrato hidroetanólico: em 1 L de álcool 70% (solução aquosa v/v) foram adicionados 100 g da droga vegetal, deixando em maceração por 10 dias. Depois, o extrato foi filtrado em papel de filtro e em seguida rotaevaporado.
3. Os extratos foram preparados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UNAERP, sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Ana Maria Soares Pereira.

3.2.3 Controle de qualidade

A droga vegetal e o extrato foram submetido a controle de qualidade de acordo com a legislação brasileira vigente (60,61). Foi realizada quantificação dos marcadores biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O controle de qualidade do extrato foi feito no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UNAERP, sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Ana Maria Soares Pereira.

3.2.4 Dose

Os extratos foram administrados aos animais nas doses 500 mg/kg, uma vez ao dia, por via intraperitoneal, nos dias 15, 16 e 17 do protocolo.

O extrato aquoso liofilizado foi ressuspensão em solução salina fisiológica, de forma que a solução estoque fosse a 25% do extrato. O extrato hidroetanólico rotaevaporado foi ressuspensão em solução salina fisiológica contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), de forma que a solução estoque fosse a 20% do extrato.

3.3 Delineamento do estudo

Trata-se de estudo experimental in vivo, com delineamento longitudinal com controle inerte (solução salina). Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiopatologia Pulmonar Experimental da FMRP-USP.

3.3.1 Protocolo de sensibilização e desafio

O protocolo de sensibilização e desafio encontra-se abaixo na **Figura 1**, com duração de 18 dias. Os camundongos foram sensibilizados no primeiro e oitavo dias do protocolo (D1 e D8) através de injeção intraperitoneal (i.p.) de 10 µg de ovalbumina (OVA) diluídos em 0,2 mL de solução salina isotônica estéril. Nos dias 15, 16 e 17 os camundongos foram submetidos aos desafios (D15, D16 e D17) 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 xilazina (2 mg/mL). O grupo controle foi submetido aos mesmos procedimentos, nos mesmos dias, porém a sensibilização e os desafios foram realizados somente com solução salina isotônica. Os experimentos foram realizados no decimo oitavo dia do protocolo (D18).

Figura 1. Protocolo de sensibilização e desafio dos camundongos com ovalbumina (OVA).

Seis grupos com 8 a 10 camundongos por grupo foram estudados, conforme descritos abaixo. Os experimentos foram realizados usando extratos aquosos, e hidroetanólicos.

- Grupo 1 (OVA-SAL): Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos receberam solução salina durante o período de tratamento;
- Grupo 2 (OVA-MCA): Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos receberam *M. charantia* aquosa (MCA) durante o período de tratamento;

- Grupo 3 (OVA-MCHA): Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos receberam *M. charantia* hidroetanólica (MCHA) durante o período de tratamento;
- Grupo 4 (SAL-MCA): Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com solução salina. Os camundongos receberam *M. charantia* aquosa (MCA) durante o período de tratamento;
- Grupo 5 (OVA-MCHA): Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com solução salina fisiológica. Os camundongos receberam *M. charantia* hidroetanólica (MCHA) durante o período de tratamento;
- Grupo 6 (SAL-SAL): Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com solução salina. Os camundongos receberam solução salina durante o período de tratamento;

3.3.2 Medida dos parâmetros *in vivo* da função pulmonar

No décimo oitavo dia do protocolo, os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal com xilazina (10 mg/kg) e pentobarbital (30 mg/kg), e foi feita uma traqueostomia com uma cânula traqueal (*Precision Tips – Engenred fluid Dispensing – Nordon EFD, Tip 20 GA PP 0,19 x 1,5 PNK 50P*). Após este procedimento estes animais foram conectados, através da cânula traqueal a um pequeno ventilador mecânico para animais FlexiVent (*Scireq, Montreal, QC, Canadá*) sendo a frequência respiratória de 150 respirações/minuto e pressão expiratória final positiva (PEEP) de 3 cmH₂O. Os animais receberam via intraperitoneal 1,2 mg/kg de brometo de pancurônio e, somente após completamente anestesiados e curarizados, foram realizadas algumas medidas respiratórias através de FlexiVent.

Este 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. Estes dois modelos permitem a separação das alterações nos diferentes compartimentos pulmonares, vias aéreas e parênquima.

Para isso, antes da coleta de dados da mecânica respiratória, os pulmões são insuflados até uma pressão de 27 cmH₂O para a homogeneização dos pulmões. Após com a técnica de oscilação forçada, o pistão, controlado por um computador aplica 13 componentes senoides com frequência primas que vão de 1 a 20,5 Hz, durante um período de 3 segundos (*quick prime-3 perturbation*). Regressão linear múltipla é então utilizada para ajustar dados no modelo de fase constante do pulmão, descritos por Hantos, et al, usando a seguinte equação (69):

$$ZRS(f) = R_{aw} + j2\pi f l + (G_{ti} - jH_{ti})/(2\pi f)^\alpha$$

Onde ZRS é a impedância do sistema respiratório, R_{aw} é a resistência das vias aéreas, j representa a unidade imaginária, l é a inercância 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 relacionada a elastância tecidual, $\alpha = (2/\pi)\tan^{-1}(H/G)$ e f a frequência respiratória.

A hiper-responsividade brônquica foi mensurada através de medidas da 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), durante 10 segundos cada concentração, 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 0,85 ($COD \geq 0,85$). Foram analisados 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 análises descritas abaixo.

3.3.3 Lavado broncoalveolar

Foi colhido lavado broncoalveolar (LBA) a fim de quantificar o grau de inflamação das vias aéreas. Ao final da ventilação, o LBA foi coletado duas vezes pela infusão e aspiração de 1 mL de solução salina pela cânula traqueal, obtendo LBA 1 e LBA 2. As duas amostras do LBA foram centrifugadas em uma centrífuga (*Eppendorf 5804R*) a 3000 rpm por 5 minutos com temperatura de 4 °C. O sobrenadante do LBA 1 foi coletado e armazenado a -80 °C para dosagem de citocinas. Os precipitados LBA 1 e LBA 2 foram ressuspensos e colocados em 500 µL de solução salina. Com este material 50 µL foram usados para contagem de células totais coradas com o azul de trypan, (sendo usados 10 µL de células e a mesma quantidade de azul de trypan). Outra parte deste material, 100 µL foram centrifugados a 400 rpm por 3 minutos em centrífuga tipo Cytospin (Centrífuga Citológica, *ThermoFisher Scientific, Shandon Cytospin*) em lâminas de microscopia fosca lapidada (26,0 x 76,0 mm – espessura 1 a 1,2 mm) que foram coradas pela técnica de Diff-Quick® para contagem da diferenciação das células inflamatórias. Foram contadas 300 células inflamatórias de cada amostra.

3.3.4 Dosagem de citocinas inflamatórias no homogenato pulmonar

O homogenato pulmonar foi processado através de um protocolo exposto no ANEXO B. Foi realizada a dosagem de citocinas inflamatórias sintetizadas por células de padrão Th1 e Th2 sobrenadante do homogenato pulmonar por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences BD OptEIA™, San Diego CA e eBiosciences San Diego CA, EUA). Foram quantificadas as seguintes citocinas: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ .

3.3.5 Dosagem sérica de anticorpos IgE anti-ovalbumina

Após as coletas dos LBA 1 e LBA 2, foi realizada coleta de sangue do ventrículo direito do camundongo através de uma seringa de insulina 1 mL (*BD Plastipak*™) com agulha de hipodérmica (0,45 x 13 mm – *BD PrecisionGlide*™). O sangue foi centrifugado em uma centrífuga (*Eppendorf* 5804R) a 3300 rpm, 4 °C durante 22 minutos. Posteriormente o plasma foi separado e armazenado em um freezer a -80 °C (*Ilshim Lab Co. Deep Freezer*) para a quantificação de IgE específica para ovalbumina pelo método ELISA. Brevemente, placas de poliestireno foram incubadas com ovalbumina por, no mínimo, 18 horas. As amostras foram purificadas com proteína G, adicionadas em duplicata à placa e incubadas. Anticorpos anti-IgE de camundongo foram adicionados, seguidos de conjugado enzimático e substrato. Entre os passos, a placa foi lavada com PBS, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween-20. A leitura da absorbância foi feita com auxílio do espectrofotômetro Versa Max (Molecular Devices, EUA) no comprimento de onda 450 nm e 570 nm e os resultados foram expressos como unidades de densidade óptica.

3.3.6 Processamento e fixação pulmonar

Após a coleta do sangue de ventrículo direito, a caixa torácica foi aberta, através de uma incisão com tesoura e pinça cirúrgica, e foram infundidos 5 mL de solução salina no ventrículo direito para retirada do sangue dos pulmões. Os pulmões foram insuflados com formalina tamponada a 10% sob uma pressão de 25 cm H₂O por 25 minutos. Depois, os pulmões foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24 horas, incluídos em blocos de parafina e cortados em micrótomo convencional com espessura de 5 μ m. Os cortes foram utilizados para histoquímica.

3.3.7 Histoquímica

Os cortes de parafina foram corados com hematoxilina e eosina para visualização e quantificação de inflamação. Para análise morfológica foram selecionadas 4 a 5 vias aéreas de

cada camundongo, que apresentaram epitélio íntegro e relação do menor diâmetro/menor diâmetro $\geq 0,5$. Antes de serem analisadas, as lâminas foram visualizadas no microscópio LeicaDM500 (Leica, Alemanha) e as imagens foram fotografadas com um aumento de 200 x, transferidas para um computador e analisadas pelo *software* ImageJ 1,47 (Research of Services Branch, Nacional institute of Health – NIH) (70).

A quantificação do número total de células inflamatórias coradas com hematoxilina e eosina foi realizada utilizando a contagem de células inflamatórias com relação a área selecionada (área total da via aérea subtraído da áreas externa da membrana hialina).

3.3.8 Análise dos resultados

Os resultados encontrados decorrentes da administração dos extratos da espécie *M. charantia*, após a sensibilização e desafios com OVA foram avaliados utilizando o teste ANOVA e foram comparados com seus respectivos controles. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Contagem de células totais e diferenciais

Os resultados obtidos na análise da contagem de células totais e diferenciais do lavado broncoalveolar estão representadas nas figuras a seguir.

Na contagem de células totais do lavado broncoalveolar, o número total de células no grupo OVA-SAL foi significativamente maior do que no grupo SAL-SAL, mostrando que o modelo foi bem-sucedido ($p < 0,001$). Além disso, o grupo asmático tratado (OVA-MCA) apresentou número total de células significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo asmático não tratado (OVA-SAL) (**Figura 2**).

Figura 2. Número total de células no lavado broncoalveolar (LBA) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg.

Legenda: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

As figuras a seguir representam a contagem diferencial de células no LBA dos seis grupos estudados, em número absoluto (**Figura 2**) e relativo (**Figura 3**).

Figura 3. Contagem relativa de eosinófilos e macrófagos no lavado broncoalveolar (LBA) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg.

Legenda: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Figura 4. Contagem relativa de Neutr3filos e Linf3citos no lavado broncoalveolar (LBA) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solu33o salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetan33lico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg.

Legenda: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

As **Figura 3** e **4** mostram que o modelo animal de asma foi bem sucedido, quando observamos diferen33as significativas entre os grupos SAL-SAL e OVA-SAL na contagem de eosin33filos ($p < 0,001$), macr33fagos ($p < 0,001$) e neutr33filos ($p < 0,001$). Nos grupos tratados tamb33m houve diferen33as estatisticamente significantes entre os grupos OVA-SAL e OVA-MCA, e entre OVA-SAL e OVA-MCHA, na contagem de eosin33filos ($p < 0,001$) e de neutr33filos ($p < 0,001$). Resumidamente, os animais asm33ticos tratados com MCA ou MCHA apresentaram redu33o significativa na propor33o de eosin33filos e aumento significativo na propor33o de neutr33filos, quando comparados com os asm33ticos n33o tratados.

Figura 5. Contagem absoluta de eosinófilos e macrófagos no lavado broncoalveolar (LBA) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg.

Legenda: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Figura 6. Contagem absoluta de Neutrófilos e Linfócitos no lavado broncoalveolar (LBA) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg.

Legenda: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Na **Figura 5 e 6** podemos observar diferenças significativas na contagem de eosinófilos ($p < 0,001$) e macrófagos ($p < 0,05$) entre os grupos SAL-SAL e OVA-SAL. Com relação aos grupos tratados, a contagem de eosinófilos apresentou diferença entre os grupos OVA-SAL e OVA-MCA ($p < 0,001$), e OVA-SAL e OVA-MCHA ($p < 0,001$), sendo que na última comparação estes dois grupos apresentaram diferença também na contagem de neutrófilos ($p < 0,01$). Resumidamente, os animais asmáticos tratados com MCA ou MCHA apresentaram redução significativa do número absoluto de eosinófilos, e os animais asmáticos tratados com MCHA apresentaram aumento significativo do número absoluto de neutrófilos, quando comparados com os animais asmáticos não tratados.

4.2 Medida dos parâmetros *in vivo* da função pulmonar

Os resultados obtidos das medidas dos parâmetros da função pulmonar estão expostos nas figuras a seguir.

Figura 7. Resistência Pulmonar Total (RRS) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. A hiper-responsividade brônquica foi mensurada através de medidas da condição basal (Basal) e salina (Salina) e após a provocação com a administração de concentrações crescentes de aerossóis com metacolina (Mch 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL), durante 10 segundos cada concentração, através de um nebulizador ultrassônico. Legenda: *, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A resistência pulmonar total (RRS) está representada na **Figura 7**, na qual podemos observar o sucesso do modelo animal de asma quando observamos as diferenças entre os grupos SAL-SAL e OVA-SAL na concentração de 50 mg/mL de metacolina ($p < 0,001$). O mesmo

padrão de resposta pulmonar se apresenta entre os grupos OVA-SAL e OVA-MCA, e OVA-SAL e OVA-MCHA. Resumidamente, os animais asmáticos tratados com MCA ou MCHA apresentaram redução na RRS com Mch 50 mg/mL, quando comparados com os animais asmáticos não tratados.

Figura 8. Elastância Pulmonar Total (ERS) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. A hiper-responsividade brônquica foi mensurada através de medidas da condição basal (Basal) e salina (Salina) e após a provocação com a administração de concentrações crescentes de aerossóis com metacolina (Mch 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL), durante 10 segundos cada concentração, através de um nebulizador ultrassônico. Legenda: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

A elastância pulmonar total (ERS) está representada na **Figura 8**. Na mesma observou-se diferenças entre os grupos SAL-SAL e OVA-SAL nas concentrações de 25 ($p < 0,05$) e 50 ($p < 0,001$) de metacolina. Com relação aos grupos tratados não houve diferença entre os grupos OVA-SAL e OVA-MCA, porém houve diferença expressiva entre os grupos OVA-SAL e OVA-MCHA nas concentrações de 25 ($p < 0,05$) e 50 ($p < 0,01$). Resumidamente, os animais asmáticos tratados com MCHA apresentaram redução na ERS com Mch 25 e 50 mg/mL, quando comparados com os animais asmáticos não tratados.

Figura 9. Resistência Tecidual (G) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. A hiper-responsividade brônquica foi mensurada através de medidas da condição basal (Basal) e salina (Salina) e após a provocação com a administração de concentrações crescentes de aerossóis com metacolina (Mch 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL), durante 10 segundos cada concentração, através de um nebulizador ultrassônico. Legenda: *, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Na **Figura 9** está representada a resistência tecidual, na qual há diferença entre os grupos SAL-SAL e OVA-SAL nas concentrações de 25 ($p < 0,05$) e 50 ($p < 0,001$). O grupo tratado OVA-MCA não apresentou diferença quando comparado ao OVA-SAL. De outra forma o grupo OVA-MCHA apresentou diferença com relação ao OVA-SAL nas concentrações de 25 ($p < 0,05$) e 50 ($p < 0,001$) de metacolina. Resumidamente, os animais asmáticos tratados com MCHA apresentaram redução em G com Mch 25 e 50 mg/mL, quando comparados com os animais asmáticos não tratados.

Figura 10. Elastância Tecidual (H) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. A hiper-responsividade brônquica foi mensurada através de medidas da condição basal (Basal) e salina (Salina) e após a provocação com a administração de concentrações crescentes de aerossóis com metacolina (Mch 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL), durante 10 segundos cada concentração, através de um nebulizador ultrassônico. Legenda: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

A elastância tecidual está representada na **Figura 10**, na qual mostra diferença entre os grupos SAL-SAL e OVA-SAL na concentração de 50 ($p < 0,001$) de metacolina. Os grupos OVA-MCA e OVA-MCHA apresentaram diferenças com relação ao OVA-SAL na concentração de 50 ($p < 0,001$) de metacolina. Resumidamente, os animais asmáticos tratados com MCA ou MCHA apresentaram redução em H com Mch 50 mg/mL, quando comparados com os animais asmáticos não tratados.

4.3 Dosagem de citocinas inflamatórias no homogenato pulmonar

A dosagem de citocinas expressas por células inflamatórias do tipo Th1 e Th2 foram realizadas em homogenato pulmonar, processado através de um protocolo (Anexo B). As citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ foram dosadas e estão representadas nas figuras a seguir.

Figura 11. Concentração de IL-13 (pg/mL) do homogenato pulmonar dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. Legenda: *, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Na **Figura 11** está representada a citocina IL-13 na qual há diferença significativa entre os grupos OVA-SAL e SAL-SAL ($p < 0,05$). Os grupos asmáticos tratados não apresentaram diferenças com relação ao grupo asmático não tratado.

Figura 12. Concentração de IL-5 (pg/mL) do homogenato pulmonar dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. Legenda: *, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A citocina IL-5 está representada na **Figura 12** a qual não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Os grupos asmáticos tratados não apresentaram diferenças com relação ao grupo asmático não tratado.

Figura 13. Concentração de IL-4 (pg/mL) do homogenato pulmonar dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. Legenda: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Na **Figura 13** está representada a concentração da citocina IL-4. Os grupos asmáticos tratados não apresentaram diferenças com relação ao grupo asmático não tratado.

Figura 14. Concentração de IL-10 (pg/mL) do homogenato pulmonar dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. Legenda: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

A concentração da IL-10 está representada na **Figura 14**, na qual não houve diferença estatística significativa entre os grupos asmático não tratado e asmáticos tratados.

Figura 15. Concentração de Interferon-Gama (pg/mL) do homogenato pulmonar dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. Legenda: *, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A concentração do interferon-gama está representada na **Figura 15**, na qual o tratamento com MCHA levou a redução significativa na concentração de interferon quando comparado com o grupo asmático não tratado ($p < 0,01$). Os demais grupos não apresentaram diferenças entre si.

4.4 Dosagem sérica de anticorpos IgE anti-ovalbumina

A dosagem sérica de anticorpo IgE anti-OVA está representada pela **Figura 16**, onde houve diferença entre os grupos SAL-SAL e OVA-SAL ($p < 0,05$). Os grupos asmáticos tratados não apresentaram diferenças com relação ao grupo asmático não tratado.

Figura 16. Concentração de IgE anti-ovalbumina (pg/mL) do homogenato pulmonar dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg .Legenda: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

4.5 Análise Histológica

Os cortes de parafina foram corados com hematoxilina e eosina para visualização e quantificação de células inflamatórias.

4.5.1. Hematoxilina e Eosina

Os resultados obtidos na análise de quantificação de células inflamatórias estão ilustrados na **Figura 17 e 18**. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos OVA-SAL vs SAL-SAL e OVA-SAL vs OVA-MCA ($p < 0,001$). Em resumo, o grupo de animais asmáticos com MCA apresentou redução significativa no número de células inflamatórias por unidade de área na via aérea quando comparado com o grupo asmático não tratado.

Figura 17. Células inflamatórias do tecido pulmonar. Micrografias representativas dos seguintes grupo SAL-SAL (A), OVA-SAL (B), SAL-MCA (C), OVA-MCA (D), SAL-MCHA (E), OVA-MCHA (F).

Figura 18. Análise Histológica Pulmonar com coloração Hematoxilina e Eosina. Quantificação de número de células inflamatórias em relação a área medida em pixels² (Cel/Pixels²) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg.

Legenda: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, realizado com o objetivo de avaliar os efeitos anti-inflamatórios de dois extratos da planta medicinal *M. charantia* em modelo animal de asma, obtivemos resultados interessantes. O presente estudo demonstrou pela primeira vez que extratos das folhas de *M.*

charantia são eficazes no tratamento da asma em modelo experimental, em camundongos, por mecanismos provavelmente anti-inflamatórios.

O tratamento dos animais com os extratos, principalmente o MCHA, resultou em melhora da mecânica pulmonar *in vivo*, bem como em melhora de vários parâmetros inflamatórios, como contagem de células totais e eosinófilos no LBA e no tecido pulmonar, e concentração de IFN-gama no homogenato pulmonar. Não foram detectadas diferenças nas concentrações de outras citocinas no homogenato pulmonar. Além disso, os resultados mostraram redução no número de células inflamatórias e de alguns parâmetros da mecânica pulmonar nos animais tratados com extrato aquoso, MCA, mas com efeito inferior ao observado com o MCHA.

De maneira geral, nossos resultados sugerem que o extrato MCHA possui atividade mais intensa do que o MCA. Isto pode ser explicado pelo fato de que os diferentes métodos de extração (água e etanol) resultam em diferentes conjuntos de moléculas com polaridades e solubilidades diferentes em solventes diversos. Neste caso, é possível que haja uma ou mais moléculas presentes no MCHA que são mais eficazes como anti-inflamatórias neste modelo.

A *M. charantia* é utilizada, desde a antiguidade, para o tratamento do diabetes, uma doença metabólica com efeitos inflamatórios sistêmicos. Em animais diabéticos, a administração do extrato etanólico de *M. charantia* resultou em diminuição significativa da glicemia, ureia, creatinina, TGO, TGP, colesterol e triglicérides, sugerindo atividade antidiabética, protetora hepato-renal e hipolipemiante (71). Os resultados positivos no tratamento do diabetes parecem estar relacionados a saponinas esteroidais (charantinas), a peptídeos semelhantes à insulina, e a alcaloides presentes na planta. Os prováveis mecanismos de ação desta planta incluem aumento do número de células Beta pancreáticas, aumento da liberação de insulina, ação semelhante à insulina, e uma possível ação extra-pancreática (aumento da utilização hepática e muscular de glicose, inibição da glicose-6-fosfatase e da frutose-1,6-biofosfatase, estimulação da glicose-6-fostado desidrogenase hepática e eritrocitária, inibição da absorção intestinal de glicose) (72). Muitos estudos têm demonstrado a atividade antidiabética desta planta em modelos animais, incluindo a prevenção das complicações crônicas. Estudos recentes têm atribuído a esta planta atividade anti-inflamatória, antiviral, e principalmente, contra vários tipos de cânceres (73).

De fato, a fração butanólica do fruto da *M. charantia* suprimiu, *in vitro*, a expressão de vários genes inflamatórios induzida por LPS, tais como os genes de TNF, IL1 α , IL1 β , G1p2, e Ccl5. A mesma fração suprimiu significativamente a ligação do NF-kB ao DNA e a fosforilação das proteínas p38, JNK e ERK MAPKs. Os compostos químicos provavelmente relacionados

a estas atividades são os terpenoides 1-R-linolenoyl-lysophosphatidylcholine (LPC), 2-R-linolenoyl-LPC, 1-lynoeoyl-LPC, e 2-linoleoyl-LPC (74). Em outro estudo, o mesmo extrato inibiu, *in vitro*, a ativação do NF-kB (35). Mais especificamente, dois compostos (triterpenos) isolados desta espécie inibiram, de forma dose-dependente, a ativação do NF-kB pelo TNF- α , e outros três compostos inibiram a ativação da iNOS e da COX-2 (75). Outros compostos terpenoides já foram isolados a partir do extrato hidroetanólico desta espécie, alguns com atividade anti-inflamatória comprovada *in vitro* (76).

In vivo, extratos desta espécie vegetal foram administrados a camundongos em um modelo experimental de sepse. Os animais tratados tiveram menor lesão de órgãos-alvo (menores concentrações de TGO e TGP), além de redução de marcadores inflamatórios como PCR, IL-1, IL-6, e TNF- α e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. Os animais tratados também tiveram menor expressão de NF-kB, iNOS e COX-2 (77,78).

Em humanos, a espécie *M. charantia* é extensamente usada pelas populações de vários países para o tratamento do diabetes mellitus (66). A administração de *M. charantia* por 6 semanas a ratos obesos e diabéticos melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, e reduziu marcadores inflamatórios no fígado, músculos e tecido adiposo. Os achados sugerem que a planta exerce atividade protetora contra a resistência insulínica e o diabetes através, entre outros mecanismos, da modulação da inflamação (79). Outros estudos com humanos mostram a redução significativa da glicemia de pacientes diabéticos quando tratados com o extrato aquoso dos frutos de *M. charantia* (80). Redução significativa da glicemia pós-prandial de 100 pacientes diabéticos tratados com a polpa do fruto foi observada no estudo de Ahmad, Hassan, Halder, & Bennoor (81). Em outro estudo com humanos, o suco dos frutos produziu melhora significativa na tolerância à glicose de pacientes diabéticos (82).

Pacientes diabéticos foram alocados para receber *M. charantia* (2 ou 4 g/dia) ou glibenclamida por 10 semanas. Todos apresentaram redução da hemoglobina glicosilada e da glicemia de jejum. Surpreendentemente, parâmetros como o lipidograma, índice aterogênico, peso corporal e pressão arterial melhoraram com o uso do fitoterápico mas pioraram com o uso da glibenclamida. Os autores concluíram que esta planta apresenta atividade hipoglicemiante fraca mas melhora os riscos cardiovasculares associados ao diabetes mellitus de maneira mais eficiente do que a glibenclamida (83).

Em nosso trabalho, os grupos tratados não apresentaram diferença na dosagem de várias citocinas inflamatórias, exceto IFN-gama. Podemos especular que não houve diferenças entre os grupos tratados e os não tratados devido ao curto protocolo de tratamento usado do nosso estudo. O IFN-gama apresentou dosagem com valores menores no grupo tratado com extrato

MCHA, o que novamente sugere maior potencial anti-inflamatório deste extrato, já que este mediador inflamatório em menor concentração sugere menor resposta inflamatória nos destes animais tratados (3, 8). Outra explicação possível é a de que o efeito anti-inflamatório tenha sido mediado por marcadores não estudados por nós.

A dosagem sérica da IgE foi realizada com objetivo de quantificar a resposta alérgica do modelo em resposta à OVA. Nesta análise, os tratamentos não resultaram em redução da dosagem de IgE. A ausência de diferenças entre os grupos de tratamento pode ser justificada pelo curto período (três dias) de sensibilização do protocolo proposto no estudo (2).

Na contagem de células totais no LBA, os resultados sugerem uma atividade anti-inflamatória mais eficaz nos animais que foram tratados com MCA. Entretanto, quando analisamos a contagem absoluta de células diferenciais no LBA os resultados mostram que os animais tratados com ambos os extratos obtiveram resposta anti-inflamatória satisfatória, com redução na contagem do número de eosinófilos, mas novamente o extrato MCHA parece ser superior. A presença de eosinófilos no LBA, responsáveis pela liberação de fatores mediadores, sinaliza que houve uma reação inflamatória que ocasiona a contração de musculatura lisa da via aérea, aumenta a permeabilidade da membrana vascular, potencializa a hiper-responsividade e aumenta a produção de muco.

Diversas plantas medicinais já foram estudadas em modelos animais de asma, como por exemplo, *Phellinus linteus*, *Panax ginseng*, *Astragalus membranaceus*, *Tinospora cordifolia*, *Pothos scandens*, *Pinus pinaster*, *Sceptridium ternatum*, entre outras (84-92). Entretanto, nenhuma dessas espécies, até onde sabemos, resultou em um medicamento comercial para o tratamento da asma.

As possíveis explicações para isto são as dificuldades metodológicas inerentes aos medicamentos fitoterápicos: falta de metodologia adequada aos estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos do fitocomplexo, dificuldades no isolamento de um único princípio ativo, variações na composição química de diferentes lotes da mesma planta, influenciados por fatores genéticos, climáticos, relacionados ao cultivo, colheita, armazenamento e extração, além de certa resistência por parte da comunidade médica e científica (93). Ao nosso ver, muitos desses problemas podem ser resolvidos empregando-se métodos biotecnológicos e agrônômicos, além da aceitação, por parte da população e, sobretudo, da comunidade científica, que um medicamento eficaz não necessariamente é uma única molécula, mas pode ser um fitocomplexo.

Alto custo financeiro, além de efeitos colaterais indesejados e difícil controle da doença, são características peculiares do tratamento da asma na atualidade, tornando-a, de forma

indireta, um problema de saúde pública. O estudo de fitoterápicos anti-inflamatórios, como a *M. charantia*, em modelo animal de asma, contribui de forma a apresentar um recurso adicional no tratamento.

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que investigou o potencial terapêutico da *M. charantia* para o tratamento da asma em um modelo animal. Esta planta medicinal está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (61), na lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado da ANVISA (RDC-10) (54) e no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (60) para uso medicinal. Esta planta está presente em todos os continentes, e é facilmente cultivável, além de ter excelente perfil de segurança para uso em humanos. Desta maneira, existe respaldo científico para futuros estudos com asma em seres humanos.

As limitações deste estudo incluem:

- Curto período de tratamento. Um tratamento mais prolongado poderia levar a resultados mais expressivos em relação aos marcadores inflamatórios no homogenato pulmonar.
- Falta de curva dose-resposta. O estudo de outras doses dos extratos poderia auxiliar na determinação da dose ideal. O uso de doses maiores poderia levar a resultados mais expressivos em relação aos marcadores inflamatórios no homogenato pulmonar.

6 CONCLUSÃO

A administração de dois extratos (aquoso e hidroetanólico) das folhas da espécie *Momordica charantia* L., na dose de 500 mg/kg, foi eficaz no tratamento da asma em modelo animal induzido por ovalbumina tanto em medidas da mecânica pulmonar quando em marcadores inflamatórios e estudo histológico, sendo o extrato hidroetanólico potencialmente mais eficaz na dose estudada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2015 [cited 2016 12 de fevereiro]. Available from: <http://www.ginasthma.org>.
2. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para manejo de Asma. Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. 2012;38 (Supli.1):S1-S46
3. Bates JH, Rincon M, Irvin CG. Animal models of asthma. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology. 2009 Sep;297(3):L401-10. PubMed PMID: 19561139. Pubmed Central PMCID: 2739768.
4. Sole D, Yamada E, Vana AT, Costa-Carvalho BT, Naspitz CK. Prevalence of asthma and related symptoms in school-age children in Sao Paulo, Brazil--International Study of Asthma and Allergies in Children (ISAAC). The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma. 1999;36(2):205-12. PubMed PMID: 10227272.
5. Sole D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. J Pediatr (Rio J). 2006 Sep-Oct;82(5):341-6. PubMed PMID: 16951799. Epub 2006/09/05. eng.
6. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology. 2008 Jan;31(1):143-78. PubMed PMID: 18166595.
7. World Health Organization. Chronic Respiratory Diseases [03/05/2013]. Available from: <http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>.
8. Martin JG, Novali M. Small animals models for drug discovery. Pulmonary pharmacology & therapeutics. 2011 Oct;24(5):513-24. PubMed PMID: 21601000.
9. Bousquet J, Chané P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, et al. Eosinophilic inflammation in asthma. The New England journal of medicine. 1990 Oct 11;323(15):1033-9. PubMed PMID: 2215562.

10. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000 May;161(5):1720-45. PubMed PMID: 10806180.
11. Vignola AM, Chanez P, Campbell AM, Souques F, Lebel B, Enander I, et al. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998 Feb;157(2):403-9. PubMed PMID: 9476850.
12. Georas SN, Guo J, De Fanis U, Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2005 Dec;26(6):1119-37. PubMed PMID: 16319345.
13. Del Prete G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy*. 1992 Oct;47(5):450-5. PubMed PMID: 1485646.
14. Haley KJ, Drazen JM. Inflammation and airway function in asthma: what you see is not necessarily what you get. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998 Jan;157(1):1-3. PubMed PMID: 9445269.
15. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2008 Jun;38(6):872-97. PubMed PMID: 18498538.
16. Bush A, Saglani S. Management of severe asthma in children. *Lancet*. 2010 Sep 03;376(9743):814-25. PubMed PMID: 20816548. eng.
17. Martinez, Fernando D., Vercelli, Donata. Seminar on Asthma. *Lancet* 2013;382: 1360-72
18. Conh L. Elias JA, Chumpp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Ann Rev Immunol* 2004;22: 789-815
19. Wadsworth SJ, Sandford AJ. Personalised medicine and asthma diagnostics/management. *Curr Allergy Asthma Rep* 2013; 13: 188-29
20. Holgate ST. Pathophysiology of asthma: what has our current understanding taught us about new therapeutic approaches? *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128:495-505
21. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005; 26(2): 319-38
22. Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Diretrizes para teste de função pulmonar. *J Pneumol*. 2002;28(3):S1-S238.

23. Hargreave FE, Pizzichini MM, Pizzichini E. Airway hyperresponsiveness as a diagnostic feature of asthma. In: Johansson SG, European Academy of Allergy and Clinical Immunology, editors. *Progress in Allergy and Clinical Immunology, Volume 3*, Stockholm: Proceedings of the XVth International Congress of Allergy and Clinical Immunology and the 1994 Annual Meeting of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Stockholm, June 26-July 1, 1994. Toronto: Hogrefe & Huber Publishers; 1995. p. 63-7.
24. de Oliveira MA, Faresin SM, Bruno VF, de Bittencourt AR, Fernandes AL. Evaluation of an educational programme for socially deprived asthma patients. *Eur Respir J*. 1999;14(4):908-14.
25. Using beta 2-stimulants in asthma. *Drug Ther Bull*. 1997;35(1):1-4.
26. Adams NP, Bestall JB, Malouf R, Lasserson TJ, Jones PW. Inhaled beclomethasone versus placebo for chronic asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;(1):CD002738.
27. O'Byrne PM, Reddel HK, Eriksson G, Ostlund O, Peterson S, Sears MR, et al. Measuring asthma control: a comparison of three classification systems. *Eur Respir J*. 2010;36(2):269-76.
28. Barnes NC, Miller CJ. Effect of leukotriene receptor antagonist therapy on the risk of asthma exacerbations in patients with mild to moderate asthma: an integrated analysis of zafirlukast trials. *Thorax*. 2000;55(6):478-83.
29. Bleecker ER, Welch MJ, Weinstein SF, Kalberg C, Johnson M, Edwards L, et al. Low-dose inhaled fluticasone propionate versus oral zafirlukast in the treatment of persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(6 Pt 1):1123-9.
30. Drazen JM, Israel E, O'Byrne PM. Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N Engl J Med*. 1999;340(3):197-206.
31. Pauwels RA, Löfdahl CG, Postma DS, Tattersfield AE, O'Byrne P, Barnes PJ, et al. Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. Formoterol and Corticosteroids Establishing Therapy (FACET) International Study Group. *N Engl J Med*. 1997;337(20):1405-11.
32. Powell H, Gibson PG. Inhaled corticosteroid doses in asthma: an evidence-based approach. *Med J Aust*. 2003;178(5):223-5.
33. Szeffler SJ, Martin RJ, King TS, Boushey HA, Cherniack RM, Chinchilli VM, et al. Significant variability in response to inhaled corticosteroids for persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(3):410-8.

34. Laviolette M, Malmstrom K, Lu S, Chervinsky P, Pujet JC, Peszek I, et al. Montelukast added to inhaled beclomethasone in treatment of asthma. Montelukast/ Beclomethasone Additivity Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(6):1862-8.
35. Fish JE, Israel E, Murray JJ, Emmett A, Boone R, Yancey SW, et al. Salmeterol powder provides significantly better benefit than montelukast in asthmatic patients receiving concomitant inhaled corticosteroid therapy. *Chest*. 2001;120(2):423-30.
36. Löfdahl CG, Reiss TF, Leff JA, Israel E, Noonan MJ, Finn AF, et al. Randomised, placebo controlled trial of effect of a leukotriene receptor antagonist, montelukast, on tapering inhaled corticosteroids in asthmatic patients. *BMJ*. 1999;319(7202):87-90.
37. Nelson HS, Busse WW, Kerwin E, Church N, Emmett A, Rickard K, et al. Fluticasone propionate/salmeterol combination provides more effective asthma control than low-dose inhaled corticosteroid plus montelukast. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(6):1088-95.
38. Price DB, Hernandez D, Magyar P, Fiterman J, Beeh KM, James IG, et al. Randomised controlled trial of montelukast plus inhaled budesonide versus double dose inhaled budesonide in adult patients with asthma. *Thorax*. 2003;58(3):211-6.
39. Vaquerizo MJ, Casan P, Castillo J, Perpiña M, Sanchis J, Sobradillo V, et al. Effect of montelukast added to inhaled budesonide on control of mild to moderate asthma. *Thorax*. 2003;58(3):204-10.
40. Bjermer L, Bisgaard H, Bousquet J, Fabbri LM, Greening AP, Haahtela T, et al. Montelukast and fluticasone compared with salmeterol and fluticasone in protecting against asthma exacerbation in adults: one year, double blind, randomised, comparative trial. *BMJ*. 2003;327(7420):891.
41. Mash B, Bheekie A, Jones PW. Inhaled vs oral steroids for adults with chronic asthma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD002160.
42. Bousquet J, Wenzel S, Holgate S, Lumry W, Freeman P, Fox H. Predicting response to omalizumab, an anti-IgE antibody, in patients with allergic asthma. *Chest*. 2004;125(4):1378-86.
43. Busse W, Corren J, Lanier BQ, McAlary M, FowlerTaylor A, Cioppa GD, et al. Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(2):184-90.
44. Djukanović R, Wilson SJ, Kraft M, Jarjour NN, Steel M, Chung KF, et al. Effects of treatment with antiimmunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(6):583-93.

45. Holgate ST, Chuchalin AG, Hébert J, Lötval J, Persson GB, Chung KF, et al. Efficacy and safety of a recombinant anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab) in severe allergic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(4):632-8.
46. Humbert M, Beasley R, Ayres J, Slavin R, Hébert J, Bousquet J, et al. Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE. *Allergy*. 2005;60(3):309-16.
47. Milgrom H, Fick RB Jr, Su JQ, Reimann JD, Bush RK, Watrous ML, et al. Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. rhuMAb-E25 Study Group. *N Engl J Med*. 1999;341(26):1966-73.
48. Taylor DR, Bateman ED, Boulet LP, Boushey HA, Busse WW, Casale TB, et al. A new perspective on concepts of asthma severity and control. *Eur Respir J*. 2008;32(3):545-54.
49. Ferro D. *Fitoterapia: Conceitos Clínicos*. São Paulo: Editora Atheneu; 2008.
50. Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2008.
51. Saad GA, Léda PHO, Sá IM, Seixlack ACC. *Fitoterapia Contemporânea: Tradição e Ciência na Prática Clínica*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.
52. Carvalho ACB, Silveira D. Drogas vegetais: uma antiga forma de utilização de plantas medicinais. *Brasilia Med*. 2010 Aug 03;48(2):219-37.
53. BRASIL. *Farmacopéia Brasileira*. 5a ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2010.
54. BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 10: Guia de notificação de drogas vegetais. Brasília: ANVISA; 2010. p. 8.
55. BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17: Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Brasília: ANVISA; 2010. p. 8.
56. BRASIL. Lei nº 6360 (23 de setembro de 1976). Brasília: Diário Oficial da União; 1976.
57. BRASIL. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diretoria Colegiada. Resolução-RDC nº 37 (6 de julho de 2009). Brasília: Diário Oficial da União; 2009.
58. 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; 2008. p. 9.
59. Calixto JB. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc Cult*. 2003;55(3):37-9.

60. BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 1ª edição ed. Brasília: ANVISA; 2011. p. 126.
61. BRASIL. RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. p. 2.
62. Clark CE, Arnold E, Lasserson TJ, Wu T. Herbal interventions for chronic asthma in adults and children: a systematic review and meta-analysis. *Primary care respiratory journal : journal of the General Practice Airways Group*. 2010 Dec;19(4):307-14. PubMed PMID: 20640388.
63. Oh SW, Cha JY, Jung JE, Chang BC, Kwon HJ, Lee BR, et al. Curcumin attenuates allergic airway inflammation and hyper-responsiveness in mice through NF-kappaB inhibition. *Journal of ethnopharmacology*. 2011 Jul 14;136(3):414-21. PubMed PMID: 20643202.
64. Fierro IM, da Silva AC, Lopes Cda S, de Moura RS, Barja-Fidalgo C. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. *Journal of ethnopharmacology*. 1999 Jul;66(1):19-24. PubMed PMID: 10432203.
65. Napimoga MH, Yatsuda R. Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2010 Jul;62(7):809-20. PubMed PMID: 20636868.
66. M. B. Krawinkel and G. B. Keding, “Bitter gourd (*Momordica charantia*): a dietary approach to hyperglycemia,” *Nutrition Reviews*, vol. 64, no. 7, pp. 331–337, 2006.
67. J. K. Grover and S. P. Yadav, “Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 93, no. 1, pp. 123–132, 2004.
68. Alam, M. A., Uddin, R., Subhan, N., Rahman, M. M., Jain, P., & Reza, H. M. (2015). Beneficial Role of Bitter Melon Supplementation in Obesity and Related Complications in Metabolic Syndrome. *Journal of Lipids*, 2015, 1–18. doi:10.1155/2015/496169
69. Hantos Z, Daróczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol* (1985). 1992 Jan;72(1):168-78.
70. Schneider CA, Rasband WS, Eleiceiri KW. INH Image to Image J: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9 (7): 671-5
71. Abd El Sattar El Batran, S., El-Gengaihi, S. E., & El Shabrawy, O. a. (2006). Some toxicological studies of *Momordica charantia* L. on albino rats in normal and alloxan diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(2), 236–42. doi:10.1016/j.jep.2006.05.015

72. Basch, E., Gabardi, S., & Ulbricht, C. (2003). Bitter melon (*Momordica Charantia*): A review of efficacy and safety. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 60, 356–359.
73. Grover, J. K., & Yadav, S. P. (2004). Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharmacol*, 93(1), 123–132. doi:10.1016/j.jep.2004.03.035
74. Kobori M, Nakayama H, Fukushima K, Ohnishi-Kameyama M, Ono H, Fukushima T, et al. Bitter gourd suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008 Jun 11;56(11):4004-11. PubMed PMID: 18489106.
75. Lii CK, Chen HW, Yun WT, Liu KL. Suppressive effects of wild bitter gourd (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* ser.) fruit extracts on inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. *Journal of ethnopharmacology*. 2009 Mar 18;122(2):227-33. PubMed PMID: 19330915.
76. Nhiem NX, Yen PH, Ngan NT, Quang TH, Kiem PV, Minh CV, et al. Inhibition of nuclear transcription factor-kappaB and activation of peroxisome proliferator-activated receptors in HepG2 cells by cucurbitane-type triterpene glycosides from *Momordica charantia*. *Journal of medicinal food*. 2012 Apr;15(4):369-77. PubMed PMID: 22248180. Pubmed Central PMCID: 3308713.
77. Liaw CC, Huang HC, Hsiao PC, Zhang LJ, Lin ZH, Hwang SY, et al. 5beta,19-epoxycucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia* and their anti-inflammatory and cytotoxic activity. *Planta Med*. 2015 Jan;81(1):62-70. PubMed PMID: 25469855.
78. Chao CY, Sung PJ, Wang WH, Kuo YH. Anti-inflammatory effect of *Momordica charantia* in sepsis mice. *Molecules*. 2014;19(8):12777-88. PubMed PMID: 25153878.
79. Yang, S. J., Choi, J. M., Park, S. E., Rhee, E. J., Lee, W. Y., Oh, K. W., ... Park, C.-Y. (2015). Preventive effects of bitter melon (*Momordica charantia*) against insulin resistance and diabetes are associated with the inhibition of NF-κB and JNK pathways in high-fat-fed OLETF rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(3), 234–40. doi:10.1016/j.jnutbio.2014.10.010
80. Leatherdale, B. A., Panesar, R. K., Singh, G., Atkins, T. W., Bailey, C. J., & Bignell, A. H. (1981). Improvement in glucose tolerance due to *Momordica charantia* (karela). *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 282(6279), 1823–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6786635>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1506397>

81. Ahmad, N., Hassan, M. R., Halder, H., & Bennoor, K. S. (1999). Effect of *Momordica charantia* (Karolla) extracts on fasting and postprandial serum glucose levels in NIDDM patients. *Bangladesh Medical Research Council Bulletin*, 25(1), 11–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1075865682>.
82. Welihinda, J., Karunanayake, E. H., Sheriff, M. H., & Jayasinghe, K. S. (1986). Effect of *Momordica charantia* on the glucose tolerance in maturity onset diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 17(3), 277–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3807390>
83. Inayat U Rahman, Khan, R. U., Khalil Ur Rahman, & Bashir, M. (2015). Lower hypoglycemic but higher antiatherogenic effects of bitter melon than glibenclamide in type 2 diabetic patients. *Nutrition Journal*, 14(1), 13. doi:10.1186/1475-2891-14-13
84. Basch E, Gabardi S, Ulbricht C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2003 Feb 15;60(4):356-9. PubMed PMID: 12625217.
85. Yan GH, Choi YH. *Phellinus linteus* Extract Exerts Anti-asthmatic Effects by Suppressing NF-kappaB and p38 MAPK Activity in an OVA-induced Mouse Model of Asthma. *Immune network*. 2014 Apr;14(2):107-15. PubMed PMID: 24851100. Pubmed Central PMCID: 4022778.
86. Lim CY, Moon JM, Kim BY, Lim SH, Lee GS, Yu HS, et al. Comparative study of Korean White Ginseng and Korean Red Ginseng on efficacies of OVA-induced asthma model in mice. *Journal of ginseng research*. 2015 Jan;39(1):38-45. PubMed PMID: 25535475. Pubmed Central PMCID: 4268570.
87. Huang X, Tang L, Wang F, Song G. Astragaloside IV attenuates allergic inflammation by regulation Th1/Th2 cytokine and enhancement CD4(+)CD25(+)Foxp3 T cells in ovalbumin-induced asthma. *Immunobiology*. 2014 Jul;219(7):565-71. PubMed PMID: 24731407.
88. Xu S, Tian BP, Zhang LH, Hua W, Xia LX, Chen ZH, et al. Prevention of allergic airway hyperresponsiveness and remodeling in mice by *Astragaliradix* antiasthmatic decoction. *BMC complementary and alternative medicine*. 2013;13:369. PubMed PMID: 24367979. Pubmed Central PMCID: 3922862.
89. Tiwari M, Dwivedi UN, Kakkar P. *Tinospora cordifolia* extract modulates COX-2, iNOS, ICAM-1, pro-inflammatory cytokines and redox status in murine model of

- asthma. *Journal of ethnopharmacology*. 2014 Apr 28;153(2):326-37. PubMed PMID: 24556222.
90. Gupta S, Basavan D, Muthureddy Nataraj SK, Raju KR, Babu UV, L MS, et al. Assessment of inhibitory potential of *Pothos scandens* L. on ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness in balb/c mice. *International immunopharmacology*. 2014 Jan;18(1):151-62. PubMed PMID: 24287447.
 91. Shin IS, Shin NR, Jeon CM, Hong JM, Kwon OK, Kim JC, et al. Inhibitory effects of Pycnogenol(R) (French maritime pine bark extract) on airway inflammation in ovalbumin-induced allergic asthma. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2013 Dec;62:681-6. PubMed PMID: 24120901.
 92. Yuan Y, Yang B, Ye Z, Zhang M, Yang X, Xin C, et al. *Sceptridium ternatum* extract exerts antiasthmatic effects by regulating Th1/Th2 balance and the expression levels of leukotriene receptors in a mouse asthma model. *Journal of ethnopharmacology*. 2013 Oct 7;149(3):701-6. PubMed PMID: 23933317.
 93. Carmona F, Pereira AMS. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2013;23(2):379-85.

8. 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

ANEXO B – Protocolo de Homogenato Pulmonar

1. Sempre manter o pulmão e os reagentes no gelo;
2. Secar o pulmão gentilmente em um filtro;
3. Pesar aproximadamente 50 microgramas (mg) do pulmão em balança de alta precisão;
4. Colocar o pulmão pesado em uma solução de PBS com antiprotease (Complete, EDTA-free, Roche número 11873580001 ou 04693159001 na concentração de 50mg/ml;
5. Limpar o homogeneizador na sequencia agua destilada, álcool 70%, agua destilada;
6. Secar o homogeneizador;
7. Homogeneizar o tecido até dissolver o tecido completamente, sendo aproximadamente 10 segundos de cada vez;
8. Limpar o homogeneizador na sequencia agua destilada, álcool 70%, agua destilada;
9. Centrifugar o tecido homogeneizado a 1900 rpm, durante 10 minutos a 4 C;
10. Retirar o sobrenadante a armazenar o mesmo a -80 C;

O preparo do inibidor de protease foi de 1 comprimido em 50 mL de PBS 1x estéril, preparado em fluxo laminar.

Título: *Momordica charantia* L. no tratamento de asma em modelo animal

Autores: Alessa Castro Ribeiro, Ana Maria Soares Pereira, Marcos de Carvalho Borges, Fabio Carmona

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Financiamento: CNPq

Contagem de palavras: 3.873

Palavras-chave: 1. Asma, 2. Cucurbitaceae, 3. Fitoterápico

ABSTRACT

Background: Asthma is a chronic disease of the airways, responsible for significant morbidity and mortality worldwide. Anti-inflammatory medications, such as corticosteroids, are some of the most important treatment options; however, they can cause undesirable side effects. Historically, plants have been a major source of molecules with biological activity. The objective of this study was to evaluate the effect of *Momordica charantia* L. (“bitter melon”, Cucurbitaceae), a plant species with anti-inflammatory properties, on asthma treatment in an animal model.

Methods: Male Balb/c mice, 5 to 6 weeks, were sensitized twice with ovalbumin (OVA) intraperitoneally (ip), one week apart, and challenged daily with OVA intranasally for three days. Mice were treated daily with aqueous (MCA) or hydroethanolic (MCHA) extract (500 mg/kg) ip for three days, during challenges. Control mice received saline on the same days. Five to eight mice were used per group. Twenty-four hours after the last challenge, mice were ventilated with a small-animal ventilator (FlexiVent®), and *in vivo* measurements of bronchial hyperresponsiveness were performed with increasing concentrations of methacholine aerosol (6.25, 12.5, 25 and 50 mg/mL). The following parameters were evaluated and compared: total resistance (RRS), total elastance (ERS), tissue resistance (G) and tissue elastance (H). After ventilation, bronchoalveolar lavage (BAL) was collected for analysis of total and differential inflammatory cells counts. Interleukins (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ) were analyzed in lung homogenate. Moreover, serum anti-OVA IgE concentration was measured. The lungs of the animals were collected for histological analysis (H&E).

Results: Treatment with MCHA extract significantly decreased airway hyperresponsiveness, measured by RRS ($p<0,001$), ERS ($p<0,05$), G ($p<0,05$) and H ($p<0,001$), when compared to non-treated mice. MCA and MCHA extracts also significantly reduced BAL total cell ($p<0,05$) and eosinophil counts ($p<0,05$). MCHA reduced IFN- γ concentration ($p<0,01$) as compared to the untreated mice. MCA ($p<0,001$) led to a significant reduction in the number of inflammatory cells per unit of airway area, compared to the untreated group.

Conclusion: The administration of MCA and MCHA, at a dose of 500 mg/kg, was effective in the treatment of asthma in an animal model induced by OVA, with effects in lung mechanics, inflammatory markers, and histological study.

INTRODUÇÃO

A asma brônquica é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, sendo definida pela história de sintomas respiratórios como sibilância, dispneia, opressão torácica e tosse, que variam ao longo do tempo e em intensidade, juntamente com limitação variável do fluxo aéreo expiratório (1).

A incidência da asma no estudo multicêntrico ISAAC (*International study of asthma and allergies in childhood*), realizado em 56 países, mostrou uma variabilidade na prevalência de asma ativa em escolares e adolescentes de 1,5% a 37,6% no mundo, com média de 11,6% e 13,7% em escolares e adolescentes, respectivamente (2,3). Estima-se que existam aproximadamente 20 milhões de asmáticos no Brasil, considerando uma prevalência global de 10%. Em 2011 foram registradas pelo DATASUS 160 mil hospitalizações em todas as idades, classificando a asma como quarta causa de internações no Sistema Único de Saúde (SUS) (2,3). Os custos diretos e indiretos relacionados à asma aumentam proporcionalmente com a gravidade da doença (1–3).

A resposta ao tratamento da asma é variável entre os pacientes e, apesar da eficácia do tratamento medicamentoso disponível atualmente, alguns pacientes não atingem o controle preconizado. Adicionalmente, pacientes de países em desenvolvimento podem não ter amplo acesso ao tratamento. Além disso, alguns dos medicamentos utilizados, como os corticosteroides, podem apresentar efeitos colaterais indesejáveis, tais como, redução do crescimento, osteopenia e osteoporose, catarata, e glaucoma (4). Desta forma, existe a necessidade da busca por novas formas de tratamento para a asma.

Momordica charantia L. (“melão-de-são-caetano”, Cucurbitaceae) é uma planta trepadeira anual, com origem do sul da China e leste da Índia, mas com distribuição mundial (5,6). Esta espécie tem sido amplamente estudada no tratamento da síndrome metabólica, devido, entre outras, a suas propriedades hipoglicemiantes, atribuídas à presença de momordicinas e momordicosídeos (6). A espécie possui também ação anti-inflamatória e, portanto, potencial para o tratamento da asma. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a eficácia de dois extratos de *M. charantia* no tratamento da asma em modelo animal.

MATERIAL E MÉTODO

Trata-se de estudo experimental in vivo, com delineamento longitudinal com controle inerte (solução salina). Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiopatologia Pulmonar Experimental da FMRP-USP.

Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c machos, 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 no Biotério do Departamento de Clínica Médica, com livre acesso a água e alimento. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (CONCEA), protocolo nº 072/2013.

Produção dos extratos vegetais

A espécie é 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 exsiccata foi depositada no Herbário da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). A parte da planta que foi usada são as folhas. A planta foi lavada e o excesso de água foi removido com folhas de papel. A seguir, a planta foi seca 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 é chamado de droga vegetal.

Foram preparados extratos aquoso e hidroetanólico da espécie, conforme abaixo:

1. Extrato aquoso: em 1 L de água fervente foram adicionados 100 g de droga vegetal, deixando em infusão por 1 hora. A seguir, o extrato foi filtrado em papel de filtro e em seguida, liofilizado.
2. Extrato hidroetanólico: em 1 L de álcool 70% (solução aquosa v/v) foram adicionados 100 g da droga vegetal, deixando 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. A droga vegetal e o extrato foram submetido a controle de qualidade de acordo com a legislação brasileira vigente (7). Foi realizada quantificação dos marcadores biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O controle de qualidade do extrato foi feito no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UNAERP, sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Ana Maria Soares Pereira.

O extrato aquoso liofilizado foi ressuspenso em solução salina fisiológica, de forma que a solução estoque fosse a 25% do extrato. O extrato hidroetanólico rotaevaporado foi ressuspenso em solução salina fisiológica contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), de forma que a solução estoque fosse a 20% do extrato.

Protocolo de indução e tratamento

O protocolo de sensibilização e desafio possui duração de 18 dias. Os camundongos foram sensibilizados no primeiro e oitavo dias do protocolo (D1 e D8) através de injeção intraperitoneal (i.p.) de 10 µg de ovalbumina (OVA) diluídos em 0,2 mL de solução salina isotônica estéril. Nos dias 15, 16 e 17 os camundongos foram submetidos aos desafios (D15, D16 e D17) 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 xilazina (2 mg/mL). Os extratos foram administrados aos animais nas doses 500 mg/kg, uma vez ao dia, por via i.p., nos dias 15, 16 e 17 do protocolo. O grupo controle foi submetido aos mesmos procedimentos, nos mesmos dias, porém a sensibilização e os desafios foram realizados somente com solução salina isotônica. Os experimentos foram realizados no decimo oitavo dia do protocolo (D18).

Seis grupos com 8 camundongos por grupo foram estudados, conforme descritos abaixo. Os experimentos foram realizados usando extratos aquosos, e hidroetanólicos.

- Grupo 1 (OVA-SAL): Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos receberam solução salina durante o período de tratamento;
- Grupo 2 (OVA-MCA): Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos receberam *M. charantia* aquosa (MCA) durante o período de tratamento;
- Grupo 3 (OVA-MCHA): Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos receberam *M. charantia* hidroetanólica (MCHA) durante o período de tratamento;
- Grupo 4 (SAL-MCA): Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com solução salina. Os camundongos receberam *M. charantia* aquosa (MCA) durante o período de tratamento;
- Grupo 5 (OVA-MCHA): Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com solução salina fisiológica. Os camundongos receberam *M. charantia* hidroetanólica (MCHA) durante o período de tratamento;
- Grupo 6 (SAL-SAL): Os camundongos foram sensibilizados e desafiados com solução salina. Os camundongos receberam solução salina durante o período de tratamento.

Medida dos parâmetros *in vivo* da função pulmonar

No décimo oitavo dia do protocolo, os animais foram anestesiados através de injeção i.p. de xilazina (10 mg/kg) e pentobarbital (30 mg/kg), e foi feita uma traqueostomia com uma cânula traqueal (*Precision Tips – Engenred fluid Dispensing – Nordon EFD, Tip 20 GA PP*

0,19 x 1,5 PNK 50P). Após este procedimento estes animais foram conectados, através da cânula traqueal a um pequeno ventilador mecânico para animais, FlexiVent (*Scireq*, Montreal, QC, Canadá) sendo a frequência respiratória de 150 respirações/minuto e pressão expiratória final positiva (PEEP) de 3 cm H₂O. Os animais receberam via i.p. 1,2 mg/kg de brometo de pancurônio e, somente após completamente anestesiados e curarizados, foram realizadas algumas medidas respiratórias através de FlexiVent, de acordo com a metodologia descrita anteriormente (8). As medidas foram feitas em 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), durante 10 segundos em cada concentração, através de um nebulizador ultrassônico (*Hudson RCI, Teleflex Medical, Temecula, CA, USA*).

Os parâmetros respiratórios foram selecionados somente das curvas que apresentaram um coeficiente de determinação maior ou igual a 0,85 ($COD \geq 0,85$). Foram analisados e comparados os seguintes parâmetros: resistência respiratória total (RRS), elastância respiratória total (ERS), resistência tecidual (G) e elastância tecidual (H).

Lavado broncoalveolar

Ao final da ventilação, o lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado duas vezes pela infusão e aspiração de 1 mL de solução salina pela cânula traqueal. As duas amostras do LBA foram a 3000 rpm por 5 minutos com temperatura de 4 °C. O sobrenadante do foi coletado e armazenado a -80 °C para dosagem de citocinas. O precipitado foi ressuspenso em 500 µL de solução salina. Com este material, 50 µL foram usados para contagem de células totais, coradas com o azul de trypan, e 100 µL foram centrifugados a 400 rpm por 3 minutos em lâminas de microscopia fosca lapidada (26,0 x 76,0 mm – espessura 1 a 1,2 mm) que foram coradas pela técnica de Diff-Quick, para contagem diferencial de células inflamatórias. Foram contadas 300 células inflamatórias de cada amostra.

Dosagem sérica de anticorpos IgE anti-ovalbumina

Após as coletas do LBA, foi realizada coleta de sangue por punção do ventrículo direito. O sangue foi centrifugado a 3300 rpm, 4 °C durante 22 minutos. Posteriormente o plasma foi separado e armazenado em um freezer a -80 °C para a quantificação de IgE específica para OVA por ELISA. Brevemente, placas de poliestireno foram incubadas com OVA por, no mínimo, 18 horas. As amostras foram purificadas com proteína G, adicionadas em duplicata à placa e incubadas. Anticorpos anti-IgE de camundongo foram adicionados, seguidos de conjugado enzimático e substrato. Entre os passos, a placa foi lavada com PBS, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween-20. A leitura da absorbância foi feita com auxílio do

espectrofotômetro Versa Max (Molecular Devices, EUA) no comprimento de onda 450 nm e 570 nm e os resultados foram expressos como unidades de densidade óptica.

Processamento e fixação pulmonar

Após a coleta do sangue de ventrículo direito, a caixa torácica foi aberta, através de uma incisão com tesoura e pinça cirúrgica, e foram infundidos 5 mL de solução salina no ventrículo direito para retirada do sangue dos pulmões. Os pulmões foram insuflados com formalina tamponada a 10% sob uma pressão de 25 cm H₂O por 25 minutos. Depois, os pulmões foram fixados 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 histologia.

Dosagem de citocinas inflamatórias no homogenato pulmonar

Depois da coleta do LBA, os animais foram sacrificados para coleta dos pulmões e de sangue. Para coleta do homogenato pulmonar, coletou-se um fragmento de tecido pulmonar (50 mg), que foi colocado em uma solução de PBS com antiprotease (Complete, EDTA-free, Roche, a 50 mg/mL), e em seguida homogeneizado até dissolução completa, depois centrifugado a 1900 rpm, durante 10 minutos a 4 °C, e em seguida o sobrenadante foi retirado e armazenado a -80 °C até análise. Depois foi realizada a dosagem de citocinas inflamatórias IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN-γ por ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences BD OptEIA™, San Diego CA e eBiosciences San Diego CA, EUA).

Histologia

Os cortes de parafina foram corados com hematoxilina e eosina para visualização e quantificação de células inflamatórias. Para análise morfológica foram selecionadas 4 a 5 vias aéreas de cada camundongo, que apresentaram epitélio íntegro e relação do menor diâmetro/menor diâmetro $\geq 0,5$. Antes de serem analisadas, as lâminas foram visualizadas no microscópio LeicaDM500 (Leica, Alemanha) e as imagens foram fotografadas com um aumento de 200 x, transferidas para um computador e analisadas pelo *software* ImageJ 1,47 (*Research of Services Branch, National institute of Health – NIH*) (70). A quantificação do número total de células inflamatórias coradas com hematoxilina e eosina foi realizada utilizando a contagem de células inflamatórias com relação a área selecionada (área total da via aérea subtraído da área externa da membrana hialina).

Análise dos resultados

Foram utilizados modelos ANOVA de uma ou duas vias, com pós-teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Foi usado o software GraphPad Prism® 6 (LaJolla, CA).

RESULTADOS

Contagem de células totais e diferenciais

Na contagem de células totais do LBA, o número total de células no grupo OVA-SAL foi significativamente maior do que no grupo SAL-SAL, mostrando que o modelo foi bem-sucedido em desencadear inflamação na via aérea. Além disso, o grupo asmático tratado com MCA (OVA-MCA) apresentou número total de células significativamente menor quando comparado com o grupo asmático não tratado (OVA-SAL) (**Figura 1A**). Nas **Figura 1B** e **Figura 1C**, observamos que nos grupos asmáticos tratados (OVA-MCA e OVA-MCHA) a contagem de eosinófilos foi significativamente mais baixa do que o controle asmático não tratado (OVA-SAL), enquanto a contagem de neutrófilos foi significativamente mais elevada naqueles grupos. Nas **Figura 1D** e **Figura 1E**, observamos que os animais asmáticos tratados (OVA-MCA e OVA-MCHA) apresentaram redução significativa do número absoluto de eosinófilos se comparados aos animais asmáticos não tratados (OVA-SAL), e os animais asmáticos tratados com MCHA apresentaram aumento significativo do número absoluto de neutrófilos.

Medida dos parâmetros *in vivo* da função pulmonar

A resistência pulmonar total (RRS) está representada na **Figura 2A**. Nela, observamos que os animais asmáticos tratados com MCA ou MCHA apresentaram redução significativa na RRS com Mch 50 mg/mL, quando comparados com os animais asmáticos não tratados (OVA-SAL). A elastância pulmonar total (ERS) está representada na **Figura 2B**. Na mesma, observamos que os animais asmáticos tratados com MCHA apresentaram redução na ERS com Mch 25 e 50 mg/mL, quando comparados com os animais asmáticos não tratados. Na **Figura 2C** está representada a resistência tecidual (G), em que observamos que os animais asmáticos tratados com MCHA apresentaram redução em G com Mch 25 e 50 mg/mL, quando comparados com os animais asmáticos não tratados. A elastância tecidual (H) está representada na **Figura 2D**. Nela, observamos que os animais asmáticos tratados com MCA ou MCHA apresentaram redução em H com Mch 50 mg/mL, quando comparados com os animais asmáticos não tratados.

Dosagem de citocinas inflamatórias no homogenato pulmonar

As concentrações de citocinas no homogenato pulmonar estão apresentadas na **Figura 3**. Com relação a IL-13, IL-5, IL-4 e IL-10, os grupos asmáticos tratados não apresentaram diferenças com relação ao grupo asmático não tratado.

A concentração do IFN-gama está representada na **Figura 3E**. Nela, observamos que o tratamento com MCHA levou a redução significativa na concentração de IFN-gama quando comparado com o grupo asmático não tratado. Os demais grupos não apresentaram diferenças entre si.

Dosagem sérica de anticorpos IgE anti-ovalbumina

A dosagem sérica de anticorpo IgE anti-OVA está representada pela na **Figura 3F**, onde observamos diferença entre os grupos SAL-SAL e OVA-SAL. Entretanto, os grupos asmáticos tratados não apresentaram diferenças significativas com relação ao grupo asmático não tratado.

Análise histológica

A quantificação de células inflamatórias no tecido pulmonar está ilustrada nas **Figura 4** e **Figura 5**. Em resumo, o grupo de animais asmáticos tratados com MCA apresentou redução significativa no número de células inflamatórias por unidade de área na via aérea quando comparado com o grupo asmático não tratado (OVA-SAL).

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou pela primeira vez que extratos das folhas de *M. charantia* são eficazes no tratamento da asma em modelo experimental, em camundongos, por mecanismos provavelmente anti-inflamatórios.

O tratamento dos animais com os extratos, principalmente o MCHA, resultou em melhora da mecânica pulmonar e de vários parâmetros inflamatórios, como contagem de células totais e eosinófilos no LBA e no tecido pulmonar, e concentração de IFN-gama no homogenato pulmonar. Não foram detectadas diferenças significativas nas concentrações de outras citocinas de perfil Th2 no homogenato pulmonar. Além disso, os resultados mostraram redução no número de células inflamatórias e de alguns parâmetros da mecânica pulmonar nos animais tratados com extrato aquoso, MCA, mas com efeito inferior ao observado com o MCHA.

De maneira geral, nossos resultados sugerem que o extrato MCHA possui atividade mais intensa do que o MCA. Isto pode ser explicado pelo fato de que os diferentes métodos de extração (água e etanol) resultam em diferentes conjuntos de moléculas com polaridades e solubilidades diferentes em solventes diversos. Neste caso, é possível que haja uma ou mais moléculas presentes no MCHA que são mais eficazes como anti-inflamatórias neste modelo.

Na contagem de células totais no LBA, os resultados sugerem uma atividade anti-inflamatória mais eficaz nos animais que foram tratados com MCA. Entretanto, quando analisamos a contagem absoluta de células diferenciais no LBA, os resultados mostram que os animais tratados com ambos os extratos obtiveram resposta anti-inflamatória satisfatória, com

redução na contagem do número de eosinófilos, mas novamente o extrato MCHA parece ser superior. Os grupos asmáticos tratados não apresentaram diferença na dosagem de várias citocinas inflamatórias, exceto IFN-gama. Podemos especular que não houve diferenças entre os grupos tratados e os não tratados devido ao protocolo curto de tratamento usado do nosso estudo. O IFN-gama apresentou dosagem com valores menores no grupo tratado com extrato MCHA, o que novamente sugere maior potencial anti-inflamatório deste extrato, já que este mediador inflamatório em menor concentração sugere menor resposta inflamatória nos animais tratados (3, 8). Outra possível explicação é a de que o efeito anti-inflamatório tenha sido mediado por marcadores não estudados por nós. A dosagem sérica da IgE foi realizada com objetivo de quantificar a resposta alérgica do modelo em resposta à OVA. Nesta análise, os tratamentos não resultaram em redução da dosagem de IgE. A ausência de diferenças entre os grupos de tratamento pode ser justificada pelo curto período (três dias) de sensibilização do protocolo proposto no estudo.

A *M. charantia* é utilizada, desde a antiguidade, para o tratamento do diabetes, uma doença metabólica com efeitos inflamatórios sistêmicos. Em animais diabéticos, a administração do extrato etanólico de *M. charantia* resultou em diminuição significativa da glicemia, ureia, creatinina, TGO, TGP, colesterol e triglicérides, sugerindo atividade antidiabética, protetora hepato-renal e hipolipemiante (9). Os resultados positivos no tratamento do diabetes parecem estar relacionados a saponinas esteroidais (charantinas), a peptídeos semelhantes à insulina, e a alcaloides presentes na planta. Os prováveis mecanismos de ação desta planta incluem aumento do número de células Beta pancreáticas, aumento da liberação de insulina, ação semelhante à insulina, e uma possível ação extra-pancreática (aumento da utilização hepática e muscular de glicose, inibição da glicose-6-fosfatase e da frutose-1,6-biofosfatase, estimulação da glicose-6-fostado desidrogenase hepática e eritrocitária, e inibição da absorção intestinal de glicose) (10). Muitos estudos têm demonstrado a atividade antidiabética desta planta em modelos animais, incluindo a prevenção das complicações crônicas. Estudos recentes têm também atribuído a esta planta atividades anti-inflamatória, antiviral, e principalmente, contra vários tipos de cânceres (6,10).

De fato, a fração butanólica do fruto da *M. charantia* suprimiu, *in vitro*, a expressão de vários genes inflamatórios induzida por LPS, tais como os genes de TNF- α , IL1 α , IL1 β , G1p2 e Ccl5. A mesma fração suprimiu significativamente a ligação do NF-kB ao DNA e a fosforilação das proteínas p38, JNK e ERK MAPKs. Os compostos químicos provavelmente relacionados a estas atividades são os terpenoides 1-R-linolenoyl-lysophosphatidylcholine (LPC), 2-R-linolenoyl-LPC, 1-lynoleoyl-LPC, e 2-linoleoyl-LPC (11). Em outro estudo, o

mesmo extrato inibiu, *in vitro*, a ativação do NF- κ B. Mais especificamente, dois compostos (triterpenos) isolados desta espécie inibiram, de forma dose-dependente, a ativação do NF- κ B pelo TNF- α , e outros três compostos inibiram a ativação da iNOS e da COX-2 (12). Outros compostos terpenoides já foram isolados a partir do extrato hidroetanólico desta espécie, alguns com atividade anti-inflamatória comprovada *in vitro* (13).

In vivo, extratos desta espécie vegetal foram administrados a camundongos em um modelo experimental de sepse. Os animais tratados tiveram menor lesão de órgãos-alvo (menores concentrações de TGO e TGP), além de redução de marcadores inflamatórios como PCR, IL-1, IL-6, e TNF- α e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. Os animais tratados também tiveram menor expressão de NF- κ B, iNOS e COX-2 (14,15). A administração de *M. charantia* por 6 semanas a ratos obesos e diabéticos melhorou a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, e reduziu marcadores inflamatórios no fígado, músculos e tecido adiposo. Os achados sugerem que a planta exerce atividade protetora contra a resistência insulínica e o diabetes através, entre outros mecanismos, da modulação da inflamação (16).

Em humanos, a espécie *M. charantia* é extensamente usada pelas populações de vários países para o tratamento do diabetes mellitus (5). Alguns estudos em humanos mostram redução significativa da glicemia de pacientes diabéticos quando tratados com o extrato aquoso dos frutos de *M. charantia* (17). Redução significativa da glicemia pós-prandial de 100 pacientes diabéticos tratados com a polpa do fruto foi observada em outro estudo (18). Em mais um estudo com humanos, o suco dos frutos produziu melhora significativa na tolerância à glicose de pacientes diabéticos (19). Ainda em outro estudo, pacientes diabéticos foram alocados para receber *M. charantia* (2 ou 4 g/dia) ou glibenclamida por 10 semanas. Todos apresentaram redução da hemoglobina glicosilada e da glicemia de jejum. Surpreendentemente, parâmetros como o lipidograma, índice aterogênico, peso corporal e pressão arterial melhoraram com o uso do fitoterápico, mas pioraram com o uso da glibenclamida. Os autores concluíram que esta planta apresenta atividade hipoglicemiante fraca, mas que melhora os riscos cardiovasculares associados ao diabetes mellitus de maneira mais eficiente do que a glibenclamida (20).

Diversas plantas medicinais já foram estudadas em modelos animais de asma, como por exemplo, *Phellinus linteus*, *Panax ginseng*, *Astragalus membranaceus*, *Tinospora cordifolia*, *Pothos scandens*, *Pinus pinaster*, *Sceptridium ternatum*, entre outras (10,21–28). Entretanto, nenhuma dessas espécies, até onde sabemos, resultou em um medicamento comercial para o tratamento da asma. As possíveis explicações para isto são as dificuldades metodológicas inerentes aos medicamentos fitoterápicos: falta de metodologia adequada aos estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos do fitocomplexo, dificuldades no isolamento de um

único princípio ativo, variações na composição química de diferentes lotes da mesma planta, influenciados por fatores genéticos, climáticos, relacionados ao cultivo, colheita, armazenamento e extração, além de certa resistência por parte da comunidade médica e científica (29). Ao nosso ver, muitos desses problemas podem ser resolvidos empregando-se métodos biotecnológicos e agronômicos, além da aceitação, por parte da população e, sobretudo, da comunidade científica, que um medicamento eficaz não necessariamente é uma única molécula, mas pode ser um fitocomplexo.

Alto custo financeiro, além de efeitos colaterais indesejados e difícil controle da doença, são características peculiares do tratamento da asma na atualidade, tornando-a, de forma indireta, um problema de saúde pública. O estudo de fitoterápicos anti-inflamatórios, como a *M. charantia*, em modelo animal de asma, contribui de forma a apresentar um recurso adicional no tratamento. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que investigou o potencial terapêutico da *M. charantia* para o tratamento da asma em um modelo animal. Esta planta medicinal está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), na lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado da ANVISA (RDC-10) (30) e no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (31) para uso medicinal. Esta planta está presente em todos os continentes, e é facilmente cultivável, além de ter excelente perfil de segurança para uso em humanos. Desta maneira, existe respaldo científico para futuros estudos com asma em seres humanos.

As limitações deste estudo incluem: (a) curto período de tratamento: um tratamento mais prolongado poderia levar a resultados mais expressivos em relação aos marcadores inflamatórios no homogenato pulmonar; e (b) falta de curva dose-resposta: o estudo de outras doses dos extratos poderia auxiliar na determinação da dose ideal e o uso de doses maiores poderia levar a resultados mais expressivos em relação aos marcadores inflamatórios no homogenato pulmonar.

Em conclusão, a administração de dois extratos (aquoso e hidroetanólico) das folhas da espécie *Momordica charantia* L., na dose de 500 mg/kg, foi eficaz no tratamento da asma em modelo animal induzido por ovalbumina tanto em medidas da mecânica pulmonar quando em marcadores inflamatórios e estudo histológico, sendo o extrato hidroetanólico potencialmente mais eficaz na dose estudada.

REFERÊNCIAS

1. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2016 [Internet]. 2016. Available from: www.ginasthma.org

2. Solé D, Yamada E, Vana AT, Costa-Carvalho BT, Naspitz CK. Prevalence of asthma and related symptoms in school-age children in São Paulo, Brazil--International Study of Asthma and Allergies in Children (ISAAC). *J Asthma* [Internet]. 1999;36(2):205–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10227272>
3. Solé D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK, ISAAC - Brazilian Group. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 2006;82(5):341–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951799>
4. Taylor DR, Bateman ED, Boulet L-P, Boushey HA, Busse WW, Casale TB, et al. A new perspective on concepts of asthma severity and control. *Eur Respir J* [Internet]. 2008 Sep;32(3):545–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18757695>
5. Krawinkel MB, Keding GB. Bitter gourd (*Momordica Charantia*): A dietary approach to hyperglycemia. *Nutr Rev* [Internet]. 2006 Jul;64(7 Pt 1):331–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16910221>
6. Grover JK, Yadav SP. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2004;93(1):123–32. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=15182917&retmode=ref&cmd=prlinks>
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 2011.
8. Hantos Z, Daróczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol* [Internet]. 1992 Jan;72(1):168–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1537711>
9. Abd El Sattar El Batran S, El-Gengaihi SE, El Shabrawy O a. Some toxicological studies of *Momordica charantia* L. on albino rats in normal and alloxan diabetic rats. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2006 Nov 24 [cited 2014 Mar 7];108(2):236–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16815658>
10. Basch E, Gabardi S, Ulbricht C. Bitter melon (*Momordica Charantia*): A review of efficacy and safety. *Am J Heal Pharm*. 2003;60:356–9.
11. Kobori M, Nakayama H, Fukushima K, Ohnishi-Kameyama M, Ono H, Fukushima T, et al. Bitter gourd suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *J Agric Food Chem*. 2008;56:4004–11.
12. Lii CK, Chen HW, Yun WT, Liu KL. Suppressive effects of wild bitter gourd

- (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* ser.) fruit extracts on inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2009;122(2):227–33.
13. Nhiem NX, Yen PH, Ngan NTT, Quang TH, Kiem P Van, Minh C Van, et al. Inhibition of nuclear transcription factor- κ B and activation of peroxisome proliferator-activated receptors in HepG2 cells by cucurbitane-type triterpene glycosides from *Momordica charantia*. *J Med Food* [Internet]. 2012;15(4):369–77. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3308713&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 14. Liaw C, Huang H, Hsiao P, Zhang L, Lin Z, Hwang S, et al. 5 β ,19-Epoxycucurbitane Triterpenoids from *Momordica charantia* and Their Anti-Inflammatory and Cytotoxic Activity. *Planta Med.* 2015;81(1):62–70.
 15. Chao C-Y, Sung P-J, Wang W-H, Kuo Y-H. Anti-Inflammatory Effect of *Momordica Charantia* in Sepsis Mice. *Molecules* [Internet]. 2014;19:12777–88. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/8/12777/>
 16. Yang SJ, Choi JM, Park SE, Rhee EJ, Lee WY, Oh KW, et al. Preventive effects of bitter melon (*Momordica charantia*) against insulin resistance and diabetes are associated with the inhibition of NF- κ B and JNK pathways in high-fat-fed OLETF rats. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2015;26(3):234–40. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095528631400237X>
 17. Leatherdale BA, Panesar RK, Singh G, Atkins TW, Bailey CJ, Bignell AH. Improvement in glucose tolerance due to *Momordica charantia* (karela). *Br Med J (Clin Res Ed)* [Internet]. 1981;282(6279):1823–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6786635>
 18. Ahmad N, Hassan MR, Halder H, Bennoor KS. Effect of *Momordica charantia* (Karolla) extracts on fasting and postprandial serum glucose levels in NIDDM patients. *Bangladesh Med Res Counc Bull* [Internet]. 1999;25(1):11–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10758656>
 19. Welihinda J, Karunanayake EH, Sheriff MH, Jayasinghe KS. Effect of *Momordica charantia* on the glucose tolerance in maturity onset diabetes. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 1986;17(3):277–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3807390>
 20. Inayat U Rahman, Khan RU, Khalil Ur Rahman, Bashir M. Lower hypoglycemic but higher antiatherogenic effects of bitter melon than glibenclamide in type 2 diabetic

- patients. *Nutr J* [Internet]. 2015;14(1):13. Available from: <http://ezproxy.think.edu.au/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=25504465&site=ehost-live&scope=site&custid=s8454151>
21. Yan GH, Choi YH. *Phellinus linteus* Extract Exerts Anti-asthmatic Effects by Suppressing NF- κ B and p38 MAPK Activity in an OVA-induced Mouse Model of Asthma. *Immune Netw* [Internet]. 2014 Apr;14(2):107–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24851100>
 22. Lim C-Y, Moon J-M, Kim B-Y, Lim S-H, Lee G-S, Yu H-S, et al. Comparative study of Korean White Ginseng and Korean Red Ginseng on efficacies of OVA-induced asthma model in mice. *J Ginseng Res* [Internet]. 2015 Jan;39(1):38–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25535475>
 23. Huang X, Tang L, Wang F, Song G. Astragaloside IV attenuates allergic inflammation by regulation Th1/Th2 cytokine and enhancement CD4(+)CD25(+)Foxp3 T cells in ovalbumin-induced asthma. *Immunobiology* [Internet]. 2014 Jul;219(7):565–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24731407>
 24. Xu S, Tian B-P, Zhang L-H, Hua W, Xia L-X, Chen Z-H, et al. Prevention of allergic airway hyperresponsiveness and remodeling in mice by *Astragaliradix* antiasthmatic decoction. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2013;13:369. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24367979>
 25. Tiwari M, Dwivedi UN, Kakkar P. *Tinospora cordifolia* extract modulates COX-2, iNOS, ICAM-1, pro-inflammatory cytokines and redox status in murine model of asthma. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2014 Apr 28;153(2):326–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24556222>
 26. Gupta S, Basavan D, Muthureddy Nataraj SK, Raju KRS, Babu U V, L M SK, et al. Assessment of inhibitory potential of *Pothos scandens* L. on ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness in balb/c mice. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2014 Jan;18(1):151–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24287447>
 27. Shin I-S, Shin N-R, Jeon C-M, Hong J-M, Kwon O-K, Kim J-C, et al. Inhibitory effects of Pycnogenol® (French maritime pine bark extract) on airway inflammation in ovalbumin-induced allergic asthma. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2013 Dec;62:681–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24120901>
 28. Yuan Y, Yang B, Ye Z, Zhang M, Yang X, Xin C, et al. *Sceptridium ternatum* extract exerts antiasthmatic effects by regulating Th1/Th2 balance and the expression levels of leukotriene receptors in a mouse asthma model. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2013 Oct

- 7;149(3):701–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23933317>
29. Carmona F, Pereira AMS. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. *Rev Bras Farm* [Internet]. 2013 Apr [cited 2014 Jun 6];23(2):379–85. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2013000200026&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 30. BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 10 de 09 de março de 2010. Notificação de drogas vegetais. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília: Diário Oficial da União; 2010 p. 8.
 31. BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 1ª ed. Brasília: ANVISA; 2011. p. 126.

FIGURAS

Figura 1. Número total de células (A), contagem relativa e absoluta de eosinófilos e macrófagos (B e D) e de neutrófilos e linfócitos (C e E) no lavado broncoalveolar (LBA) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. Legenda: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Figura 2. Resistência Pulmonar Total (RRS) (A), Elastância Pulmonar Total (ERS) (B), Resistência Tecidual (G) (C) e Elastância Tecidual (H) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. A hiper-responsividade brônquica foi mensurada através de medidas da condição basal (Basal) e salina (Salina) e após a provocação com a administração de concentrações crescentes de aerossóis com metacolina (Mch 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL), durante 10 segundos cada concentração, através de um nebulizador ultrassônico. Legenda: *, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 3. Concentração de interleucina (IL)-13 (A), IL-5 (B), IL-4 (C), IL-10 (D), interferon (IFN)-gama (E) e IgE anti-ovalbumina (OVA) (F), em pg/mL, no homogenato pulmonar dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg. Legenda: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Figura 4. Células inflamatórias do tecido pulmonar. Micrografias representativas dos seguintes grupo SAL-SAL (A), OVA-SAL (B), SAL-MCA (C), OVA-MCA (D), SAL-MCHA (E), OVA-MCHA (F). Coloração: H&E.

Figura 5. Quantificação de número de células inflamatórias em relação a área medida em pixel² (cél/pixel²) dos camundongos desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (MCA) ou hidroetanólico (MCHA) de *Momordica charantia* L. na dose de 500 mg/kg.

Legenda: *, p<0,05; **p <0,01; ***p <0,001.