UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JOWANKA AMORIM

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES DE
ERYTHRINA MULUNGU Benth. NO TRATAMENTO DA ASMA EM UM
MODELO ANIMAL**

**Ribeirão Preto, SP
2017**

JOWANKA AMORIM

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES DE
ERYTHRINA *MULUNGU* BENTH. NO TRATAMENTO DA ASMA EM
UM MODELO ANIMAL**

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

Área de concentração: Puericultura e Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Fabio Carmona.

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos de Carvalho
Borges.

**Ribeirão Preto, SP
2017**

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Amorim, Jowanka

Avaliação do extrato etanólico das flores de *Erythrina mulungu* Benth. no tratamento da asma em um modelo animal.

74f.;30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Puericultura e Pediatria

Orientador: Fabio Carmona

1. Asma. 2. Fitoterápico. 3. Inflamação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jowanka Amorim

Avaliação do extrato etanólico das flores de *Erythrina mulungu* Benth. no tratamento da asma em um modelo animal

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais Luiz Gonzaga Amorim, Maria do Carmo
Gomes Amorim; e irmão, Wellington Luiz Amorim dedico
este trabalho, com profunda gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelos dons concedidos e por Ele ser guia na minha jornada.

Agradeço aos meus pais pela dedicação que tiveram e pela oportunidade que deram à educação dos filhos; agradeço o incentivo em todas as minhas escolhas, encorajando-me e sendo o solo firme para eu poder pisar e ir em busca dos sonhos. Vocês serão para sempre meu lar, onde quer que eu vá.

Agradeço ao meu irmão Wellington pelo incentivo, pelo exercício da escuta, por me ensinar muito sobre a vida, muito além de livros.

Ao professor orientador, Fabio Carmona, por ter concedido a oportunidade de ingressar na pós-graduação; por ter confiado no meu trabalho para a execução deste projeto e ter redirecionado os caminhos quando o projeto inicial não se efetivou. Eu não ia desistir, mas você soube lidar de um modo muito tranquilo, transmitindo-me confiança, e foi daí que novas possibilidades surgiram.

Ao meu professor co-orientador, Marcos de Carvalho Borges, pelo acolhimento dentro do seu grupo de pesquisa, pela condução dos trabalhos durante o percurso de 2 anos, mantendo-se constante, paciente, dedicado, acessível e incentivando-nos ao desenvolvimento pleno das nossas aptidões.

A minha co-orientadora Prof^{ra} Dra. Ana Maria Soares Pereira por ser referência de pessoa e profissional, pela atenção, pelo carinho e prontidão em dar todas as condições para o desenvolvimento do trabalho.

Aos três professores agradeço por acreditarem no estudo científico com plantas medicinais e por hoje se tornarem minhas referências em pesquisa. Agradeço também pelo exemplo de trabalho em equipe; embora ele exija mais e se torne cansativo, os fazem vencer obstáculos e colher frutos mais fecundos junto aos seus alunos.

Aos dedicados colegas de laboratório, Bruna Cestari, Camila Carla Guimarães, Lucas Junqueira, Camila Sandy, Vanessa Maciel, Andiamira Balestra e Leandra Zanetti, pelo comprometimento, pela determinação e persistência; pelo espírito de companheirismo, humildade e empatia.

Aos professores do Curso de Nutrição, Rosa Wanda Diez Garcia, Paula Garcia Chiarello pela oportunidade que tive em me aproximar da prática da nutrição através do

estágio docência. Ao Professor Júlio Sergio Marchini também meus agradecimentos, pela referência e pelas muitas oportunidades construtivas.

Agradeço aos meus amigos também, aos de longe e aos de perto, porque não desistiram de mim, preencheram espaços, trouxeram alegrias e suavizaram a saudade. Em especial, às amigas Elaine Hillesheim, Débora Marcos Rubim e Regina Helena Carmo.

Ao laboratório de Fisiopatologia Pulmonar Experimental, em nome do Prof. Dr. Marcos Borges de Carvalho pela concessão do espaço e dos aparelhos para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao laboratório de Fitoquímica da Universidade de Ribeirão Preto, em nome da Prof. Dra. Ana Maria Soares Pereira, pela concessão do espaço e equipamentos para o preparo do extrato da planta medicinal.

Ao Laboratório de Patologia Celular e Molecular de Doenças do Fígado, no nome do Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho e da técnica Deisy Mara da Silva pelo preparo das lâminas de histologia.

Ao Laboratório de Neurologia Experimental, no nome do Prof. Dr. Amilton Antunes Barreira, e ao Antônio Renato Meirelles e Silva pela concessão do uso dos microscópios para que as lâminas de histologia fossem fotografadas e pela edição das mesmas.

A Universidade de São Paulo, pela estrutura e pelas condições de trabalho aos pós-graduandos.

A CAPES pela concessão da bolsa; à CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

“Quando amamos e acreditamos do fundo da nossa alma, em algo, nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados de uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer a nossa fé. Essa força estranha faz com que sempre tomemos a decisão certa, na hora exata e, quando atingimos nossos objetivos, ficamos surpresos com a nossa própria capacidade”.

(Paulo Coelho)

RESUMO

AMORIM, J. **Avaliação do extrato etanólico das flores de *Erythrina mulungu* Benth. no tratamento da asma em um modelo animal.** 2017. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Ribeirão Preto, 2017

Introdução: Estima-se que 300 milhões de pessoas no mundo possuam asma e há expectativa de aumentar o número de mortes pela doença nos próximos 10 anos. Parte disto deve-se à limitação na eficácia dos tratamentos atuais e à heterogeneidade da doença. *Erythrina mulungu* Benth. (Leguminosae, mulungu) é uma planta nativa brasileira de interesse do Sistema Único de Saúde para ser estudada e que apresenta potenciais efeitos anti-inflamatórios. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da administração do extrato etanólico das flores de *E. mulungu* no tratamento da asma em um modelo experimental, e os mecanismos envolvidos. **Métodos:** Camundongos Balb/c sensibilizados com ovalbumina (OVA) foram tratados por via intraperitoneal com 4 doses (200, 400, 600 e 800 mg/kg) do extrato de *E. mulungu*, ou dexametasona (2 mg/kg) – controle positivo – durante 7 dias consecutivos e foram paralelamente desafiados com ovalbumina intranasal. A hiper-responsividade brônquica foi avaliada *in vivo*, 24 h após o último desafio; o lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado para avaliação do número de células totais e diferencial por citômetro e contagem microscópica, respectivamente. O sangue foi coletado para dosagem de anticorpos IgE para ovalbumina. Níveis de citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e INF- γ foram dosados no homogenato pulmonar através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA); e o recrutamento de células inflamatórias no tecido foi avaliado coloração Hematoxilina-Eosina (H&E). O perfil cromatográfico da planta foi analisado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), seguido de espectrofotometria de massas (MS). **Resultados:** O tratamento com *E. mulungu* diminuiu significativamente o aumento da hiper-responsividade brônquica nos animais em todas as doses testadas. Diminuiu o número de células totais, eosinófilos e linfócitos no LBA, significativamente na dose de 600 mg/kg e suprimiu significativamente a concentração de IL-4 e IL-5. Além disso, *E. mulungu* diminuiu significativamente o recrutamento de células inflamatórias no tecido dos animais asmáticos. Erisotrina, N-óxido-erisotrina e hipaforina foram os constituintes majoritários encontrados. **Conclusão:** Coletivamente esses resultados sugerem que *E. mulungu* tem potencial para uso no tratamento da asma, através da modulação da resposta inflamatória, apresentando efeitos imunomodulador e anti-inflamatório.

Palavras-chave: Asma, planta medicinal, inflamação, Leguminosae

ABSTRACT

AMORIM, J. **Evaluation of ethanolic extract from the Brazilian medicinal plant *Erythrina mulungu* Benth. in the treatment of asthma in an animal model.** 2017. Dissertation (Master's degree) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Background: Asthma affects 300 million people worldwide and the number of victims of the disease is expected to increase in the next 10 years. Part of this may be a result of the limited efficacy of current treatments and disease heterogeneity. *Erythrina mulungu* Benth. (Leguminosae, mulungu) is a Brazilian native species which is listed by the Brazilian National Program of Medicinal Plants and Herbal Medicines to be studied and that has potential anti-inflammatory effects. **Objective:** To evaluate the effects of *E. mulungu* flowers ethanolic extract in ovalbumin (OVA)-induced asthma in mice, and to study the mechanisms involved. **Methods:** OVA-sensitized mice were intraperitoneally treated with four doses (200, 400, 600 e 800 mg/kg) of the *E. mulungu* extract or dexamethasone (2 mg/kg) – positive control – during seven consecutive days and simultaneously challenged with intranasal ovalbumin. Airway hyperresponsiveness was evaluated *in vivo*, 24 h after the last OVA challenge; bronchoalveolar lavage fluids (BAL) was collected for counting the number of total and differential inflammatory cells. Blood was collected for measurement of anti-OVA IgE levels. Levels of cytokines IL-4, IL-5, IL-10 IL-13 and INF- γ were measured in pulmonary homogenate by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA); and the inflammatory cells recruitment to the lung tissue were determined using hematoxylin and eosin staining (H&E). The species' chromatographic profile was evaluated by Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometer. **Results:** The treatment with *E. mulungu* extract significantly reduced the airway hyperresponsiveness in all doses evaluated. It significantly reduced the number of total cells, eosinophils and lymphocytes in BAL, at 600 mg/kg and significantly decreased the levels of IL-4 and IL-5. In addition, *E. mulungu* significantly decreased the cellular inflammatory infiltration in the lung tissue of allergic mice. Erysothrone, erysothrone-N-oxide and hypaphorine were the major constituents in the extract. **Conclusions:** Collectively, these results suggest the potential of *E. mulungu* for asthma treatment, through modulation of inflammatory response.

Key-words: Asthma, herbal medicine, inflammation, Leguminosae

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBA	Compostos bioativos
<i>E. mulungu</i>	<i>Erythrina mulungu</i> Benth.
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator (Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos)
H&E	Hematoxilina-Eosina
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ILC	<i>Innate lymphoid cells</i> (Células linfóide inata)
IMC	Índice de Massa Corporal
INF	Interferon
LB	Linfócito B
LBA	Lavado broncoalveolar
Mch	Metacolina
NF- kB	Fator de transcrição nuclear NF-KB
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVA	Ovalbulina (proteína)
PA	Princípio ativo
RENAFITO	Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RR	Risco relativo
SUS	Sistema Único de Saúde
T _H	Linfócito T <i>helper</i> (auxiliar)
TSLP	<i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i> (Citocina linfopoetina do estroma tímico)
UPLC-MS/MS	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometer</i> Cromatografia Líquida de Ultra-alta Pressão Acoplado a Espectro de Massas
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> (molécula de adesão celular-vascular-1)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Publicações encontradas com os descritores “ <i>Erythrina mulungu</i> ” e “ <i>Erythrina verna</i> ” em base de dados.	28
Tabela 2. Evidências científicas dos efeitos terapêuticos da <i>Erythrina mulungu</i> Benth., parte da planta, tipo de extrato, características do tratamento, dose e via de administração.....	29
Tabela 3. Evidências clínicas científicas dos efeitos terapêuticos da <i>Erythrina mulungu</i> Benth.....	31
Tabela 4. Escore para a quantificação da severidade da inflamação peribrônquica.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Erythrina mulungu</i> Benth.	26
Figura 2. Fluxograma da busca dos estudos científicos com <i>Erythrina mulungu</i> Benth.	27
Figura 3. Flores secas (esquerda) e o pó (direita) obtidos da <i>Erythrina mulungu</i> Benth.	35
Figura 4. Modelo experimental de asma e tratamento com o extrato etanólico das flores de <i>Erythrina mulungu</i> Benth. (EV).	37
Figura 5. Efeitos do tratamento de 7 dias com as doses de 200, 400, 600 e 800mg/kg do extrato etanólico das flores de <i>Erythrina mulungu</i> Benth (EV) e de dexametasona (DEXA) na hiper-responsividade brônquica.....	45
Figura 6. Efeitos do tratamento de 7 dias com as doses de 200, 400, 600 e 800 mg/kg do extrato etanólico das flores de <i>Erythrina mulungu</i> Benth. (EV) no número de células totais (A) e na contagem diferencial absoluta de células (B) no lavado bronquio-alveolar (LBA)...	47
Figura 7. Efeito do tratamento de 7 dias com as doses de 200, 400, 600 mg/kg do extrato etanólico das flores de <i>Erythrina mulungu</i> (EV) e de dexametasona (DEXA) sobre os níveis de IgE sérico.	48
Figura 8. Efeito do tratamento de 7 dias com as doses de 200, 400, 600 e 800 mg/kg do extrato etanólico das flores de <i>Erythrina mulungu</i> (EV) e de dexametasona (DEXA) sobre os níveis de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e INF- γ	50
Figura 9. Efeito do tratamento com <i>Erythrina mulungu</i> Benth. sobre a infiltração de células inflamatórias no tecido pulmonar	51
Figura 10. Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-MS	53
Figura 11. Desenho da estrutura química dos constituintes majoritários da <i>Erythrina mulungu</i> Benth.....	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Asma: definição, epidemiologia, diagnóstico, fisiopatologia e tratamento	16
1.2 A prática da Fitoterapia: perspectivas históricas, atuais e justificativas para uso.....	23
1.3 <i>Erythrina mulungu</i> Benth.....	25
1.4 Justificativa	32
1.5 Hipótese.....	32
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3. MÉTODO	34
3.1 Delineamento do estudo.....	34
3.2 Condução do estudo.....	34
3.3 Obtenção da planta medicinal	34
3.4 Preparo da droga vegetal.....	35
3.5 Preparo do extrato etanólico da droga vegetal	35
3.6 Controle de qualidade	36
3.7 Escolha da dose administrada aos camundongos.....	36
3.8 Preparo da solução administrada e definição da dose.....	36
3.9 Camundongos	36
3.10 Protocolo de sensibilização e desafio	37
3.11 Intervenção.....	37
3.12 Avaliação da hiper-responsividade brônquica em resposta à metacolina.....	38
3.13 Coleta do lavado broncoalveolar, sangue e pulmões	39
3.14 Avaliação de celularidade total e diferencial	40
3.15 Dosagem sérica de anticorpos IgE para ovalbumina.	40

3.16 Dosagem de citocinas inflamatórias T _H 1 e T _H 2 no homogenato pulmonar.....	41
3.17 Análise histológica pulmonar	41
3.18 Análise fitoquímica do extrato etanólico das flores de <i>Erythrina mulungu</i>	42
3.19 Análise estatística	43
4. RESULTADOS	44
4.1 Efeito de <i>E. mulungu</i> sobre hiper-responsividade brônquica em resposta à metacolina	44
4.2 Efeito de <i>E. mulungu</i> sobre a celularidade total e diferencial	46
4.3 Efeito de <i>E. mulungu</i> sobre os níveis de IgE sérico.....	48
4.4 Efeito de <i>E. mulungu</i> sobre os níveis de citocinas do tecido pulmonar.....	49
4.5 Efeito de <i>E. mulungu</i> sobre a infiltração por células inflamatórias no tecido	51
4.6 Identificação dos componentes de <i>E. mulungu</i>	52
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO.....	61
7. REFERÊNCIAS	62
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP	72
ANEXO B - Protocolo utilizado no preparo do homogenato pulmonar	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Asma: definição, epidemiologia, diagnóstico, fisiopatologia e tratamento

A asma é a doença inflamatória mais comum dos pulmões e é uma das doenças imunológicas crônicas de maior ocorrência em humanos, que afeta pessoas da infância à fase adulta (1, 2). Segundo a Iniciativa Global da Asma, é uma doença heterogênea, definida pelo histórico de sintomas respiratórios, que variam ao longo do tempo e em intensidade, juntamente com um padrão variável de obstrução das vias aéreas ³.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 300 milhões de pessoas no mundo possuam asma, sendo esta prevalente em 1 a 18 % da população em diferentes países; e que esta prevalência está aumentando, especialmente entre crianças ⁴. Estima-se que aproximadamente 1000 pessoas morrem por dia devido à doença ⁵.

No Brasil, estima-se que existam 20 milhões de asmáticos se considerada a prevalência global de 10 %. Dados de 2011 mostram que no país, a asma é a 4ª causa de hospitalizações e que a taxa de mortalidade, entre 1998 e 2007, foi de 1,52/100.000 habitantes (variação 0,85 – 1,72/100.000 habitantes) ⁶.

A resposta inflamatória nos pulmões frequentemente inicia-se na infância quando os estímulos ambientais - tais como infecções virais do trato respiratório, exposição a alérgenos, fumaça de cigarro e outros poluentes oxidantes - ativam a produção de citocinas pelo epitélio das vias aéreas - entre as principais estão as interleucinas (IL) 25, IL-33 e/ou TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*) - desencadeando uma série de reações patológicas subsequentes que levam ao desenvolvimento da asma em crianças suscetíveis por apresentarem atopia pré-existente e/ou fatores de risco genéticos específicos em reguladores da resposta inflamatória e/ou outras vulnerabilidades menos compreendidas ^{2, 7}. O desenvolvimento da asma sofre influência, portanto, de fatores de risco genéticos e ambientais.

Tem sido amplamente investigada, mais recentemente, a influência da microbiota intestinal na maturação e no funcionamento do sistema imunológico. O estudo de coorte de Fujimura, *et al* (2016), publicado na revista *Nature*, investigou se a composição da microbiota de neonatos com 1 mês de vida influenciaria a população de linfócitos T CD4+, de modo a aumentar ou diminuir o risco relativo (RR) para o desenvolvimento de atopia aos 24 meses e de asma aos 48 meses de idade. Em conclusão, verificou-se a susceptibilidade para asma

alérgica nas crianças com um padrão de microbiota menos abundante de bactérias *Bifidobacterium*, *Akkermansia* e *Faecalibacterium*; e com maior proporção de *Candida* e *Rhodotorula*. Assim, estuda-se que alteração no microambiente intestinal é uma via potencial para alterar função de células T CD4+. O estudo sugere que a intervenção na primeira infância para manipular a composição e a função do microbiota intestinal pode ser uma estratégia viável para prevenção da doença ⁸.

Não são bem conhecidas as razões pelas quais as respostas imunes iniciadas na infância se tornam persistentes na vida adulta. Talvez se possa atribuir à “memória” das reações pela fixação de programações imunológicas aberrantes estabelecidas durante a janela metabólica na primeira infância, quando o sistema imunológico ainda tem plasticidade. Durante esse período do desenvolvimento, tanto as células da resposta imune inata, quanto da resposta imune adaptativa são susceptíveis às mudanças epigenéticas que levam a mudanças persistentes no comportamento celular das mesmas ².

Uma vez manifestada, o diagnóstico da asma é baseado na história clínica de sintomas respiratórios como tosse, sibilância, dispneia e/ou desconforto torácico, e na obstrução da via aérea (limitação variável ao fluxo aéreo expiratório). Como critério diagnóstico diferencial às demais doenças respiratórias crônicas, esses sintomas geralmente se apresentam com piora característica no início da manhã e à noite e se exacerbam na presença de gatilhos, tais como atividade física, contato com alérgenos/irritantes de mucosa (cheiro fortes de perfumes, fumaça de cigarro), mudanças climáticas e infecções virais. Os sintomas também variam ao longo do tempo e em intensidade e podem apresentar melhora espontânea ou com tratamento medicamentoso ³.

A obstrução da via aérea e a condição de variabilidade da função pulmonar podem ser confirmadas por espirometria, onde a resposta de constrição brônquica é induzida por exercício físico, metacolina (Mch) ou histamina e medida sua reversibilidade com broncodilatores ou anti-inflamatórios ³. Este teste avalia também a característica intrínseca e diagnóstica da asma, chamada de hiper-responsividade brônquica, um estado patológico no qual o estreitamento das vias aéreas podem ser rapidamente disparado ⁹.

A asma é frequentemente caracterizada por períodos assintomáticos pontuados com manifestações clínicas que podem variar de moderadas a graves ^{2, 9}. Um subgrupo considerável de indivíduos com asma sofre do tipo mais grave da doença que é caracterizado por sintomas mais frequentes e exacerbações. As exacerbações são fenômenos clínicos complexos que envolvem a perda do controle da asma e o aparecimento dos sintomas citados

anteriormente. O resultado desse processo é o estreitamento da via aérea, que resulta não apenas da contração do músculo liso, mas também do edema de mucosa e da formação exacerbada de muco intraluminal ². Os episódios de exacerbação podem também variar de moderados a graves e até mesmo serem fatais por falência respiratória.

Na última década, métodos de detecção viral baseada em ácidos nucleicos demonstram que a infecção por rinovírus é o gatilho mais comum de exacerbação da doença. Cerca de 90% das exacerbações da asma na infância estão associadas a viroses. As explicações do por que a infecção por rinovírus tem consequências tão graves em pacientes asmáticos, e não em saudáveis, ainda têm sido estudadas. Evidências mostraram que as células epiteliais brônquicas de pacientes asmáticos produzem menos interferon (INF) tipo I e tipo III, comparados aos controles saudáveis, quando induzidas por rinovírus. Ainda não se sabe se esse defeito é uma causa ou um efeito da patogenia da asma ⁹.

Como visto, as manifestações clínicas variáveis tornam a asma uma doença heterogênea. Com base nas características comuns dos pacientes asmáticos, têm sido propostos diferentes fenótipos para a asma. Os indivíduos podem ser agrupados em 4-5 “clusters” de acordo com idade, gênero, atopia, função pulmonar, cuidado com a saúde e o índice de massa corporal (IMC). Por essa divisão, por exemplo, o maior grupo é caracterizado por obstrução média da via aérea e relativamente resistente às exacerbações. O outro grupo é caracterizado por obstrução grave e mais propenso a exacerbações. Nesse cluster de pacientes com asma mais grave incluem-se os indivíduos mais velhos e indivíduos obesos. Pesquisas mais atuais buscam esclarecer se a heterogeneidade de fenótipos pode ser explicada por mecanismos celulares ou moleculares em comum ². Alguns dos fenótipos mais comuns incluem:

- Asma alérgica: é o fenótipo mais facilmente reconhecido, que frequentemente tem início na infância e está associado ao passado ou história familiar de doença alérgica (rinite, eczema etc). O exame de escarro desses pacientes geralmente revela uma inflamação eosinofílica nas vias aéreas. Os pacientes com este fenótipo de asma são bons respondedores ao tratamento com corticosteroides inalados.
- Asma não alérgica: alguns adultos que desenvolvem asma não associada com alergias. O perfil celular do escarro pode ser neutrofílico, eosinofílico ou conter poucas células inflamatórias. Pacientes com este fenótipo geralmente respondem menos com corticosteroides inalados.

- Asma tardia: asma apresentada pela primeira vez na vida adulta, particularmente em mulheres. Esses pacientes tendem a não ser alérgicos e a necessitar de doses extremamente altas de corticosteroides, ou mesmo serem refratários ao tratamento.
- Asma com limitação fixa ao fluxo aéreo: são pacientes que já apresentam mudanças estruturais no epitélio pulmonar, chamado remodelamento brônquico, decorrente da inflamação crônica; cursam com limitação permanente ao fluxo aéreo.
- Asma e obesidade: pacientes com excesso de peso apresentam sintomas respiratórios proeminentes e pouca inflamação eosinofílica na via aérea ³.

Outro termo proposto para asma e atualmente discutido é baseado no mecanismo imunopatológico da doença. Por ele, foi proposto o endotipo de asma, chamado “T_H2- alto” que é caracterizado por níveis aumentados de inflamação do tipo 2 nas vias aéreas. O termo “endotipo” foi proposto em 2008 para direcionar os estudos na heterogeneidade molecular da asma. Assim, um endotipo é um subtipo da doença definido por um mecanismo funcional ou patológico distinto, diferentemente de fenótipo, que são características observacionais. A vantagem dessa divisão consiste que um endotipo pode ser alvo de um tipo de tratamento específico para um mecanismo molecular causador ².

A base da fisiopatologia da asma envolve a quebra da homeostasia imunológica no trato respiratório e a liberação de citocinas que ativam um processo inflamatório que garantem a manutenção crônica, característica da doença ^{1, 10}. É importante salientar que a resposta inflamatória é um processo agudo, fisiológico e necessário para manutenção da integridade do organismo, e que se encerra após a remoção do estímulo desencadeante. No entanto, pode haver doenças com inflamação inapropriada, em que a resposta inflamatória progride para uma fase crônica, em resposta a determinado estímulo, como alergia, transplantes, etc. ¹¹. Nesse mesmo contexto, a asma é uma doença crônica, na qual uma resposta inflamatória anormal é ativada contra substâncias ambientais comuns, a que a maioria indivíduos saudáveis não responde.

Quando um antígeno entra em contato com a via aérea, sua detecção imunológica inicial se dá por células sensoras no local da infecção ou do dano tecidual. As células sensoras são células epiteliais, macrófagos, células dendríticas e mastócitos que promovem a resposta imune inata, como primeira linha de defesa, para remover o estímulo, reparar o tecido e cessar a resposta inflamatória. As células sensoras, bem como boa parte das células do sistema

imunológico, atuam liberando citocinas de primeira ordem (tais como IL-1 α , IL-1 β , IL-23, IL-25) capazes de ativar e recrutar células efectoras (monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos) para o local da infecção/dano e ativar linfócitos residentes no tecido ⁹. A produção de IL-25, IL-33 e TSLP pelas células epiteliais estão vinculadas à ativação de resposta inflamatória tipo 2, discutida a seguir ^{1, 2, 9}.

Os linfócitos T auxiliares (*T helper*/ CD4⁺) desencadeiam e reforçam a resposta imune através de um determinado conjunto de citocinas ¹¹, que descrevem as distintas respostas do tipo 1 e tipo 2, principalmente reguladas por subpopulações de *T helper* 1 e (T_H1) e *T helper* 2 (T_H2), respectivamente ².

Uma das possíveis explicações para a inflamação observada na asma é o desequilíbrio entre as respostas imunológicas T_H1 e T_H2, com um desvio para T_H2 ¹². Este último tipo de inflamação ocorre em cerca de 80% das crianças e na maioria dos adultos com asma sensibilizada a alérgenos ambientais (pelo de animais de estimação, pólen, ácaros, fungos). É bem estabelecido o papel central dos linfócitos T_H2 na asma alérgica clássica, ou asma eosinofílica (este último termo não é mais utilizado), mas não explica todas as variações fenotípicas encontradas. Portanto, uma variedade de outras células T em diferentes subtipos de asma, incluindo a associação de linfócitos T_H1 e T_H17 com a asma neutrofílica também têm sido investigadas ¹, ampliando o conhecimento sobre a fisiologia dessas células no contexto da asma.

Após terem sido ativadas, as células T_H2, na asma alérgica e, potencialmente, na asma não alérgica, secretam citocinas do tipo 2, tais como IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), conhecidas como citocinas de segunda ordem, que vão ativar uma série de respostas sobre as células efectoras (neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, basófilos, macrófagos), além de ativarem a resposta imune adaptativa humoral com produção de anticorpos por linfócitos B (LB) e formação de LB de memória ¹³. Tais citocinas se caracterizam por ativar uma resposta mediada principalmente por eosinófilos, mastócitos, basófilos e imunoglobulina E (IgE), característica da asma alérgica ^{1,9}. Trabalhos em ratos Rag2^{-/-} que não possuem células T e B mostraram que o tratamento por IL-25 (citocina de primeira ordem liberada pelas células epiteliais em resposta à alérgenos) provocou a liberação de IL-5 e IL-13 e a indução de resposta imunológica tipo 2. Tais achados levaram a acreditar que não haveria somente a produção de citocinas do tipo 2 por T_H; foi então que se identificou congêneres de células linfoides inatas (conhecidas por uma variedade de nomes na literatura: células naturais auxiliaadoras, nuócitos e células inatas

auxiliadoras 2), e que recentemente foi proposto que todas as ILCs (*innate lymphoid cells*) que produzem citocinas do tipo 2, fossem determinadas ILC2.

Na sequência dos eventos, algumas células T_H2 ativas migram para folículos de células B (localizados nos órgãos linfoides secundários - baço, linfonodos e tecidos linfoides associado à mucosa) para ativar as células B virgens (*naive*) e dar início à proliferação e diferenciação das mesmas, culminando com troca de isótipo (classe) da cadeia pesada das imunoglobulinas de IgM para IgE, produção aumentada de IgE pelos plasmócitos e formação de células B de memória. O evento de troca e maturação da afinidade das imunoglobulinas é mediada pelas citocinas produzidas pelos T_H – no caso, IL-4 que induz a mudança de classe para IgE; maturação da afinidade decorre da exposição continuada ao alérgeno, gerando anticorpos com capacidade aumentada de ligação ao antígeno, de modo que ao se ligar, neutraliza-o com maior eficiência. Os linfócitos B de memória são células capazes de sobreviver a longos períodos e montam respostas rápidas à introdução de um antígeno subsequente. Elas permanecem nos órgãos linfoides ou circulam no sangue. A ativação gera anticorpos de alta afinidade e produção de grandes quantidades após a segunda exposição aos antígenos ¹³.

Dessa forma, a resposta imune adaptativa mediada por T_H2 na asma envolve tanto a resposta celular, para atração e expansão clonal de células T, quanto a resposta humoral (produção de anticorpos e de células de memória) ^{1,9,11}. A consequência da cascata inflamatória desencadeada, é a hipersensibilidade mediada por IgE a aeroalérgenos, a ativação de células epiteliais da via aérea, a quimioatração de células efectoras (mastócitos, eosinófilos e basófilos) e o remodelamento do epitélio e da matrix subepitelial ⁹. O termo “hipersensibilidade” nada mais é do que uma definição clínica de imunidade como “sensibilidade”, que se baseia no fato de o indivíduo ter sido exposto a um antígeno e apresentar uma reação detectável, ou seja, é “sensível” ao antígeno em contato subsequente ¹³.

O remodelamento da via aérea é, portanto, uma consequência da inflamação crônica que acomete o tecido, em que mudanças estruturais são vistas tanto no epitélio, quanto na submucosa. No epitélio, há metaplasia de células de *goblet* ou caliciformes (células produtoras de muco e mucinas, componentes chaves da barreira protetora que impede a entrada de patógenos pelo epitélio). Na mucosa, observam-se mudanças de fibrose subepitelial (aumento da deposição de colágeno tipo I, III e V, fibronectina e tenascin C na lâmina reticular na zona basal da membrana basal), aumento do volume das glândulas submucosas, hiperplasia e hiperplasia das células do músculo liso, aumento do número de

vasos sanguíneos. Tais mudanças tornam o indivíduo mais susceptível a exageradas respostas a alérgenos ambientais inalados e a exacerbação mais proeminente pelo estreitamento basal do calibre da via aérea ².

O tratamento da asma envolve as medidas educacionais sobre a exposição a desencadeantes alérgenos e o tratamento farmacológico. Este último tem por finalidade intervir na resposta inflamatória através da modificação dos mediadores de sinalização ou supressão dos componentes do sistema imune ¹¹. Entre os mediadores de sinalização estão os fármacos que agem sobre os eicosanoides, a histamina e as células do sistema imune. Os agonistas de receptor β_2 -adrenérgicos e os glicocorticoides continuam sendo o principal tratamento para os indivíduos asmáticos ². Os glicocorticoides têm eficácia sobre a imunossupressão do tipo 2. No entanto, são conhecidos seus efeitos colaterais, locais e sistêmicos, como disfonia, candidíase, catarata, osteoporose e supressão da glândula adrenal, particularmente quando utilizado em altas doses e por prolongados períodos de tempo. Tipicamente os regimes de tratamento atuais incluem a combinação de diferentes drogas. Além das citadas, incluem-se anticolinérgicos, antagonistas de receptores de leucotrienos e terapias direcionadas a IgE (estes dois últimos mais recentemente). Além deles, inibidores específicos da inflamação do tipo 2, tais como anticorpos monoclonais anti-IgE (Omalizumab®), IL-5, IL-13 e TSLP, estão sendo estudados como novos recursos terapêuticos e adjuvantes ao tratamento com corticosteroides ².

Como visto, a asma é uma doença de amplo espectro, desencadeada por muitos fatores, que induz respostas imunológicas e inflamatórias diversas, envolvendo mediadores não somente mediados por T_H2 , mas também por T_H1 e T_H17 , e tem seus mecanismos ainda sendo estudados. Esse amplo espectro faz com que um grupo de pacientes permaneça sem controle ou com controle inadequado da doença. Dada a complexidade envolvendo a resposta imunológica na asma, a limitação do tratamento farmacológico, seja pelos efeitos colaterais dos medicamentos existentes, seja pelo difícil controle da doença, faz-se necessário que se busquem potenciais agentes anti-inflamatórios para o manejo e tratamento da doença. Neste ínterim, o uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos surgem como uma fonte promissora de novas substâncias para o estudo em asma.

1.2 A prática da Fitoterapia: perspectivas históricas, atuais e justificativas para uso

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 ^{14, 15}.

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças já foi utilizado majoritariamente no Brasil no século passado, fato ilustrado pelo amplo número de espécies botânicas nacionais e estrangeiras (mais de 280) descritas na primeira Farmacopeia Brasileira, de 1929 ¹⁶. Antes da “era sintética”, 80% dos medicamentos eram obtidos a partir raízes, cascas e folhas ¹⁷. Atualmente, um grande número de moléculas usadas como fármacos, como digoxina, efedrina, atropina, escopolamina, taxol, vincristina, artemisinina, entre outras, são derivadas de plantas e a indústria farmacêutica se interessa pelo estudo de produtos naturais devido aos diversos efeitos colaterais dos medicamentos sintéticos e pelo alto custo de produção destes, que ultrapassa de 800 milhões de dólares ¹⁸.

As etapas necessárias ao estudo de plantas medicinais e ao desenvolvimento de produtos derivados podem levar muitos anos. No entanto, o advento da robótica, bioinformática, biotecnologia molecular, química e de outras ciências contribuiu significativamente para a prospecção de pesquisas na área de produtos naturais ^{16, 17}.

A utilização de medicamentos fitoterápicos vem sendo estimulada pela OMS desde 1978 (Declaração de Alma-Ata), e também pelo governo brasileiro através da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (Portaria GM nº 971, de 02/05/2006), e da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Decreto Presidencial 5.813 de 22 de junho de 2006), que completou 10 anos no ano passado (2016) ¹⁹.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da RDC Nº 26 de 13 de maio de 2014 ²⁰, vigente, descreve os medicamentos fitoterápicos como produtos obtidos com o emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, caracterizado pelo conhecimento da segurança e eficácia/efetividade do uso, assim como pela reprodutibilidade e a constância da sua qualidade.

Sobre a comprovação da segurança e eficácia, a RDC dispõe que estas devem ser baseadas em (a) ensaios não clínicos e clínicos de segurança e eficácia (por documentação tecno-científica) ou através do (b) registro simplificado. A comprovação da segurança e eficácia por meio deste último refere-se à presença da planta na lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado (Instrução Normativa nº 2 de 13 de maio de 2014 –

atualmente vigente) ou nas monografias de fitoterápicos de uso bem estabelecido da Comunidade Europeia (*Community herbal monographs with well-establish use*) elaborada pelo Comitê de Produtos Medicinais Fitoterápicos (*Committe on Herbal Medicinal Products*) da *Eurepean Medicines Agency*.

Os benefícios à saúde atribuídos ao uso de fitoterápicos são devido à presença de diversos compostos bioativos (CBAs) ou princípios ativos (PAs) encontrados nas folhas, flores, cascas, caules ou raízes das plantas ²¹.

Os PAs são substâncias orgânicas produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, isto é, o conjunto de reações químicas da célula vegetal nas quais se transformam carboidratos, aminoácidos e lipídios (produtos da reação de fotossíntese, chamado de metabolismo primário) em uma rica e vasta diversidade de substâncias ²². Mas por que razão as plantas produzem uma vasta diversidade de substâncias? Entre as teorias levantadas, a mais aceita é que, evolutivamente, as plantas passaram a produzi-las para conferir vantagem na capacidade de sobrevivência, garantindo assim o afastamento de predadores (animais, insetos, micro-organismos patogênicos) e à perpetuação da espécie pela atração de polinizadores (abelhas, pássaros, etc.) ²³.

Uma vez ingeridas, na forma de chás, tinturas, extratos, xaropes ou medicamentos industrializados, tais substâncias são responsáveis por diversos efeitos farmacológicos no organismo.

Ao conjunto de todas as substâncias originadas do metabolismo secundário de uma planta, que são responsáveis, conjuntamente, pelos efeitos biológicos observados, dá-se o nome de **fitocomplexo** ²⁰.

O fitocomplexo caracteriza-se, por sua vez, como a principal vantagem dos fitoterápicos em relação à terapia convencional. O isolamento de um único PA pode ser vantajoso em algumas situações, mas não em outras, onde a atuação do fitocomplexo é superior à de quaisquer dos componentes isoladamente ¹⁵. Um exemplo disto é o fato de que, no tratamento da malária, o extrato bruto de *Artemisia annua* L. (“artemísia”, Compositae) é mais eficaz e induz menos resistência do que a substância isolada artemisinina (24, 25).

Inúmeros estudos têm sido publicados sobre o efeito de diversos extratos vegetais com propriedades anti-inflamatórias e broncodilatadoras ²⁶⁻²⁸. Em um estudo experimental, 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 de transcrição nuclear *kappa* B (NF-kB) ²⁹. 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 ^{30,31}.

Atualmente, no Brasil, a ANVISA regulamenta o uso de algumas espécies vegetais como anti-inflamatórias e outras como broncodilatadoras ³². Porém, ainda existem outras espécies que necessitam de investigação quanto a sua eficácia no tratamento da asma. Dentre as espécies com ação anti-inflamatória e com potencial para o tratamento da asma, destaca-se a *Erythrina mulungu* Benth (*E. mulungu*) (“mulungu”, Fabaceae)

Esta planta consta na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (RENISUS) ³³, na qual se tem interesse em ser investigada para futuramente compor a RENAFITO (Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos), aplicada na prática de prescrição do SUS.

1.3 *Erythrina mulungu* Benth

A espécie *Erythrina mulungu* Benth (Família Fabaceae-Faboideae), popularmente conhecida como suinã ou mulungu, é uma árvore nativa, encontrada na região centro-leste do país, especificamente nas florestas do sul da Bahia, Zona da Mata de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Vale do Paraíba), na floresta pluvial atlântica ³⁴.

Na ordem evolucionária, a planta é uma angiosperma. Morfologicamente é caracterizada de copa pequena e alta, espinhenta de 10 a 25 m de altura, com tronco de 50 a 70 cm diâmetro, revestido por casca acinzentada com ritidoma estriado (**Figura 1**). Folhas compostas trifoliadas, folíolos ovalados, glabros de 8-11 cm de largura e pouco maior no comprimento. A árvore floresce a partir do final do mês de agosto até final de setembro, em ramacetos axilares e terminais, com flores vermelhas (motivo pelo qual também é chamada de árvore-coral). Os frutos são em vagem curta, com 1-4 sementes e amadurecem em outubro/novembro ³⁴.

A espécie já foi chamada de *Coraliodendron mulungu* (Martius) Kuntze, *Erythrina flammea* Herzog ³⁵ tendo sido alterado recentemente para *Erythrina verna* Vell. Neste trabalho adotamos a nomenclatura de *Erythrina mulungu* Benth. devido à identificação

botânica. Tais sinônimos são frequentemente substituídos, e o nome científico pode ser consultado na base de dados <http://www.theplantlist.org/>.

O nome *Erythrina* vem do grego *erythros*, que significa vermelho, em referência à cor das flores ³⁶.

Figura 1. *Erythrina mulungu* Benth.

Fonte: LORENZI, H. Árvores Brasileiras. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2015

Na medicina popular há relato do uso centenário da casca de *E. mulungu* por populações indígenas com finalidade sedativa ¹⁴. Encontram-se também relatos de usos contra febre intermitente, insônia, gengivite, hepatite, inflamações esplênicas, bronquite e asma (14, 34) além de uso como anti-inflamatório, tranquilizante ³⁸, em convulsões e na menopausa ³⁹. O estudo de Albuquerque *et al*, (2007), analisou 21 publicações sobre plantas medicinais de uso tradicional da vegetação caatinga (semiárido), nordeste brasileiro. Foi descrito pela população local o uso terapêutico como ansiolítico e para insônia ⁴⁰.

A casca e as folhas de *E. mulungu* são as partes da planta tradicionalmente utilizadas com fins terapêuticos. No entanto, também há relatos do uso popular das flores ⁴¹. Vários

trabalhos científicos utilizaram as flores para testar a eficácia e segurança terapêutica ⁴¹⁻⁴⁵, e dentre as justificativas para o uso, foi por se colocar em risco a conservação da biodiversidade e do uso sustentável da espécie devido ao dano causado à planta pela raspagem da casca do caule ⁴¹.

Há cerca de trinta e cinco anos (na década de 80), pesquisas científicas passaram a ser desenvolvidas com *E. mulungu*, objetivando-se avaliar a segurança e a eficácia terapêutica alegada pela medicina popular tradicional, até então descrito em trabalhos etnofarmacológicos, bem como caracterizar os PAs possivelmente envolvidos em seus efeitos.

A **Figura 2** mostra o resultado da busca sistemática conduzida no dia 22/03/2017 nas bases de dados *Science Direct*, *Pubmed*, *Clinical trials*, *Web of Science* and *Cochrane Library* com os descritores “*Erythrina mulungu*” e “*Erythrina verna*” (separadamente):

Figura 2. Fluxograma da busca dos estudos científicos com *Erythrina mulungu* Benth.

Foram levantados os trabalhos etnofarmacológicos e de revisão em que a planta era citada, estudos fitoquímicos, estudos *in vitro*, experimentais e clínicos em que o extrato da planta/medicamento constituiu a intervenção do ensaio, além de capítulos de livros. Na **Tabela 1** há o resumo das publicações de acordo com tipo de estudo com a planta.

A **Tabela 2** mostra uma síntese das evidências científicas dos efeitos terapêuticos estatisticamente significativos de *E. mulungu*, parte da planta, tipo do extrato, características do tratamento, doses de efeito terapêutico e via de administração utilizada. Foram referenciados apenas os trabalhos originais, excluindo-se àqueles citados em revisão e capítulos de livros.

Observa-se que a planta apresenta efeitos terapêuticos ansiolítico, sedativo, anticonvulsivante, analgésico, antimicrobiano (*in vitro*) e anti-inflamatório comprovados em animais. A planta apresenta-se ainda em preparações fitoterápicas, tais como Maracugina® e Ritmoneuran®, atualmente comercializadas com indicação tranquilizante, além de o extrato ser disponível em farmácias magistrais para manipulação e comercialização ⁴⁶. Estudos clínicos também já foram conduzidos com a planta (**Tabela 3**) (47, 48).

Nenhum estudo, entretanto, testou os efeitos da administração de *E. mulungu* no tratamento da asma.

Tabela 1. Publicações encontradas com os descritores “*Erythrina mulungu*” e “*Erythrina verna*” em base de dados.

Tipo de Estudo	nº de publicações	Referências
Estudo etnofarmacológico (uso popular)	2	40,49
Estudos fitoquímicos	6	50–55
Estudos <i>in vitro</i>	8	38,53,56–61
Estudos experimentais (toxicidade e farmacológicos)	15	35,41–45,51,62–69
Estudos clínicos	2	47,48
Estudo de revisão (citação de uso terapêutico)	7	37,46,70–74
Estudo de aplicabilidade em agronomia e botânica	5	54,75–78
Capítulo de livro	1	(36)
Total:	45*	

*^{44,51} apresentam estudo fitoquímico e experimental; *⁵³ apresenta estudo fitoquímico e *in vitro*; *⁵⁴ apresenta estudo fitoquímico e botânico

Tabela 2. Evidências científicas dos efeitos terapêuticos da *Erythrina mulungu* Benth., parte da planta, tipo de extrato, características do tratamento, dose e via de administração.

Autor/Referência	Efeito	Extrato	Tipo de tratamento	Doses com efeito terapêutico	Via de adm
Flores					
Onusic <i>et al</i> , 2002 ⁴¹	ansiolítico	EHA 30% água e 70% etanol maceração por 10 dias	Agudo, 30 minutos pré-teste.	200 mg/kg	v.o.
Onusic <i>et al</i> , 2003 ⁴²	ansiolítico	EHA 30% água e 70% etanol maceração por 10 dias	Crônico, de 9 a 14 dias.	50, 100 e 200 mg/kg	v.o.
Ribeiro <i>et al</i> , 2006 ⁴³	sedativo	EHA 70% água e 30% etanol Não há informações sobre o tempo de maceração	Agudo, 1 hora anterior pré-teste e Crônico, por 21 dias.	100, 200 e 400 mg/kg (agudo) 50, 100 e 200 mg/kg (crônico)	v.o.
Flausino Jr., <i>et al</i> , 2007 ⁴⁴	ansiolítico	EHA 30% água e 70% etanol maceração por 10 dias	Agudo, 30 minutos pré-teste.	200 e 400 mg/kg	v.o.
Flausino Jr., <i>et al</i> , 2007 ⁴⁵	ansiolítico	EHA 30% água e 70% etanol maceração por 10 dias	Agudo, 30 minutos pré-teste.	100 e 200 mg/kg	v.o.
De Bona, <i>et al</i> , 2012 / ⁵¹	DL50 de 1, 37 g/kg, ausência de citotoxicidade,	EHA 30% água e 70% etanol Maceração por 3 dias	Agudo, avaliado nº de óbitos após 48h	250, 500 e 1000 mg/kg (para determinar a DL50) 200 e 400 mg/kg (teste de micronúcleo)	i.p
Casca do caule					
Vasconcelos, <i>et al</i> , 2004 ⁶³	atividade depressora do SNC	EHA 70% água e 30% etanol Mistura aquecida à 60°C por 2h	Agudo, 30 minutos pré-teste; i.p.	200 e 400 mg/kg (i.p)	i.p. e
Vasconcelos, <i>et al</i> , 2007 ⁶⁴	anticonvulsivante	EHA 70% água e 30% etanol Mistura aquecida à 60°C por 2h	Agudo, 1 hora pré-teste; v.o. Agudo, 30 minutos pré-teste	800 (v.o.) 400 mg/kg	v.o. i.p
Vasconcelos, <i>et al</i> , 2003 ⁶²	nociceptivo	EHA 70% água e 30% etanol Mistura aquecida à 60°C por 2h	Agudo, 30 minutos pré-teste.	200 e 400 mg/kg	i.p.
Oliveira, <i>et al</i> , 2012 ⁶⁶	anti-inflamatório e antinociceptivo	EHA 10% água e 90% etanol Maceração por 3 dias	Agudo, 30 a 40 minutos pré- teste.	100 mg/kg	v.o.
Vasconcelos, <i>et al</i> , 2011 ⁶⁵	anti-inflamatório	EHA 70% água e 30% etanol Mistura aquecida 60°C por 2h à	Agudo, 1 hora pré-teste.	200 e 400 mg/kg	v.o
Lima, <i>et al</i> , 2006 ³⁸	bactericida	-	-	Concentração de 100 mg/mL	<i>in vitro</i>
Omena, <i>et al</i> , 2007 ⁵⁶	larvicida	EHA 95% etanol Percolação por 3 dias ou Soxhlet por 2 dias	-	< 200 µg/mL	<i>in vitro</i>
Mazzari <i>et al</i> , 2016 ⁵⁹	Não inibe: expressão de CYP3A4; níveis de GSH; atividade Gp	Infusão por 20 minutos	-	100 µg/mL	<i>in vitro</i>

Legenda: adm administração; EHA extrato hidroalcoólico; DL dose letal; Gp glicoproteína P; SNC sistema nervoso central; v.o. via oral; i.p. intraperitoneal

Tabela 2 (Continuação)

Autor/Referência	Efeito	Extrato	Tipo de tratamento	Doses com efeito terapêutico	Via de adm
Folhas					
Mateus <i>et al</i> , 2013 ⁵⁷	Nematocida	Aquoso, Maceração por 24 horas	100mL de extrato em contato com 100mL de uma solução com ovos de <i>Meloidogyne incognita</i>	10, 20, 30, 40 e 50 g/L	<i>in vitro</i>
Proença, <i>et al</i> , 2012 ⁶⁸	Mudanças no desenvolvimento gestacional	HAE 70% etanol Percolação	Crônico, 1-19 dias gestacionais	1,5 mg/kg	v.o
Raiz					
Oliveira, <i>et al</i> , 2012 ⁶⁶	Anti-inflamatório e nociceptivo	EHA 10% água e 90% etanol Maceração por 3 dias	Agudo, 30 a 40 minutos pré-teste.	100 mg/kg	v.o.
Frações e PA isolados					
Flausino Jr., <i>et al</i> , 2007a ⁴⁴	Ansiolítico	(+)-11a-hydroxy-erythravine, (+)-erythravine e (+)-a-hydroxyerysotrine (flores)	Agudo, 30 minutos pré-teste.	3 e 10 mg/kg	v.o.
Flausino Jr., <i>et al</i> , 2007b ⁴⁵	ansiolítico	(+)-11a-hydroxy-erythravine e (+)-erythravine (flores)	Agudo, 30 minutos pré-teste.	3 e 10 mg/kg	v.o.
Faggion, <i>et al</i> , 2011 ³⁵	Anticonvulsivante	(+)-erythravine e (+)-11a-hydroxy-erythravine (flores)	Agudo, 10 minutos pré-teste	0,25 a 3,0 µg/µL	i.c.v.
Santos Rosa, <i>et al</i> , 2012 ⁶⁷	Anticonvulsivante e ansiolítico	(+)erysothrine	Agudo	0,5, 2,0 e 3,0 µg/µL	i.c.v.
Oliveira, <i>et al</i> , 2012 ⁶⁶	Anti-inflamatório e nociceptivo	Fração clorofórmio (raiz)	Agudo, 30 a 40 minutos pré-teste.	100 mg/kg	v.o.
Setti-Perdigao, <i>et al</i> , 2013 ⁵⁸	Inibidor dos receptores de Ach nicotínicos	(+)-11a-hydroxy-erythravine, (+)-erythravine e (flores)	-	100 µM	<i>in vitro</i>
Guaratini, <i>et al</i> , 2014 ⁶⁰	Atividade citotóxica contra células tumorais	8-oxo-eritraline e erisotrina	-	0.016 - 5 µg/mL	<i>in vitro</i>
Callejon <i>et al</i> , 2014 ⁵³	Baixa atividade à <i>Leishmania amazonensis</i>	Erythraline; 8-oxoerythraline; 8-Oxoerythraline; epoxide; crystamidine; erythrinine; erysovinee rythratidinone (casca do caule)	-	40, 20 e 10 µg/mL	<i>in vitro</i>

Legenda: adm administração; Ach acetilcolina; PA princípio ativo EHA extrato hidroalcoólico; v.o. via oral; i.p. intraperitoneal; i.c.v. intracerebroventricular

Tabela 3. Evidências clínicas científicas dos efeitos terapêuticos da *Erythrina mulungu* Benth.

Autores	Efeito	Característica do estudo	Descrição do estudo	Observações
Fiss <i>et al</i> , 2006 ⁴⁸	Insônia e ansiedade <small>*em combinação com outras plantas</small>	clínico multicêntrico, fase IV, mascarado, randomizado	n=96 pacientes tratados por 30 dias com Maracugina® (<i>Passiflora alata</i> , <i>Erythrina mulungu</i> , <i>Crataegus oxyacantha</i>) comparado com Passiflorine®, (<i>Passiflora incarnata</i> , <i>Crataegus oxyacantha</i> , <i>Salix alba</i>) em comprimido e solução oral.	Não há informações sobre a concentração de cada uma das plantas na preparação fitoterápica, a parte da planta utilizada, bem como marcadores químicos constituintes.
Silveira-Souto, <i>et al</i> , 2014 ⁴⁷	Ansiolítico	Clínico, randomizado, duplo-cego, crossover	n=30 pacientes tratados 1 hora antes do procedimento cirúrgico para extração de molares com 500mg (Mulungu Matura®), v.o.	Não há informações sobre a composição do fitoterápico.

Legenda: v.o. via oral

1.4 Justificativa

A demonstração de atividade anti-inflamatória do extrato das flores de *E. mulungu* em modelos animais de asma pode ser o início de uma alternativa para o tratamento da asma, bem como futuramente, levar ao desenvolvimento de novos medicamentos.

1.5 Hipótese

O extrato etanólico das flores de *E. mulungu* apresenta atividade anti-inflamatória e reduz a inflamação e a hiper-responsividade brônquica em modelo experimental de asma.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da administração do extrato etanólico das flores de *Erythrina mulungu* Benth. no tratamento da asma em um modelo experimental, bem como propor os mecanismos envolvidos.

2.2 Objetivos específicos

Serão avaliados como objetivos específicos:

- Obtenção do extrato etanólico das flores de *E. mulungu*
- Análise fitoquímica do extrato etanólico das flores de *E. mulungu*
- Alterações na responsividade brônquica *in vivo*;
- Alterações celulares (contagem celular total e diferencial) no lavado broncoalveolar;
- Dosagem sérica de anticorpos IgE para ovalbumina
- Produção de citocinas no homogenato pulmonar;
- Avaliação da infiltração celular no tecido pulmonar.

3. MÉTODO

3.1 Delineamento do estudo

Estudo experimental *in vivo*, longitudinal, com 4 semanas de intervenção, realizado no Laboratório de Fisiopatologia Pulmonar Experimental da FMRP-USP, no período de outubro de 2015 a março de 2017. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (CONCEA), sob o protocolo nº 072/2013 (ANEXO A).

3.2 Condução do estudo

O estudo foi dividido em duas etapas:

1. Verificação da atividade terapêutica do extrato etanólico da flor de *E. mulungu* nas doses de 200, 400, 600 e 800 mg/kg sobre a hiper-responsividade brônquica.
2. Verificação da atividade terapêutica na resposta inflamatória celular, na concentração de IgE, na concentração de citocinas e nas alterações do tecido pulmonar.

3.3 Obtenção da planta medicinal

A espécie foi cultivada na instituição Casa Espírita Terra de Ismael (Farmacêutico Responsável: Anne Cristina Ferreira, CRF-SP 34.696, CNPJ: 01.824.056/0001-23, localização: latitude 21°4'33'' sul, longitude 47°44'48'' oeste) com autorização do governo brasileiro. As flores de *E. mulungu* foram coletadas às 10 horas da manhã, e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). O voucher é 3168, especialista Milena Ventrichi Martins.

3.4 Preparo da droga vegetal

Os extratos da droga vegetal foram preparados no Laboratório de Biotecnologia da UNAERP, sob supervisão da Prof.^a Dr.^a Ana Maria Soares Pereira. As flores de *E. mulungu* foram lavadas e o excesso de água foi removido com folhas de papel. Em seguida, as flores foram secas em estufa de ar circulante a 45 °C por 48 horas. Depois, trituradas em moinho de facas até a granulometria de 40 mesh, obtendo-se um pó resultante chamado de droga vegetal (**Figura 3**).

Figura 3. Flores secas (esquerda) e o pó (direita) obtidos da *Erythrina mulungu* Benth.

3.5 Preparo do extrato etanólico da droga vegetal

Para extração dos princípios ativos presente nas flores de *E. mulungu*, utilizaram-se 5,6 L de etanol e 1020 g de droga vegetal. Ambos, foram acondicionados em um bécker (6 L), misturados, e mantidos em maceração por 7 dias, com agitação diária, na ausência de luz, e em temperatura ambiente. Transcorrido o período, o extrato etanólico das flores obtido foi filtrado em papel de filtro e rota-evaporado. Em seguida, o líquido remanescente foi congelado e liofilizado, resultando em um resíduo seco final de 32,4316 g. O extrato etanólico das flores obtido foi armazenado em tubo Falcon fechado, na ausência de luz e em temperatura ambiente, até o momento do uso.

3.6 Controle de qualidade

As drogas vegetais e os extratos foram submetidos a controle de qualidade de acordo com a legislação brasileira vigente ⁷⁹. O controle de qualidade dos extratos foi feito no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UNAERP, sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Ana Maria Soares Pereira.

3.7 Escolha da dose administrada aos camundongos

Baseando-se nos resultados da revisão sistemática, pretendeu-se iniciar os testes com a dose de 200 mg/kg. Após primeira análise da dose e verificado o efeito, a hipótese do estudo foi extrapolada para se testarem as doses de 400, 600 e 800 mg/kg.

3.8 Preparo da solução administrada e definição da dose

O extrato etanólico de *E. mulungu* foi ressuspenso em solução salina 0,9 % e Tween80 na proporção 98:2 para ser administrado aos animais. A administração das doses foi determinada em 200, 400, 600 e 800 mg/kg do animal, sendo o volume administrado de 300 µL para as doses 200, 400 e 600 mg/kg (respectivas concentrações 20, 40 e 60 mg/mL). Para a dose de 800 mg/kg, foi administrado o volume de 600 µL da solução na concentração de 40 mg/mL. Como controle negativo, os animais receberam 300 µL da solução salina 0,9 % e Tween80 (98:2). O controle positivo recebeu 2 mg/kg de dexametasona, administrado em um volume de 300 µL por animal. Os dados apresentados consideram o peso para um camundongo de 30 g.

3.9 Camundongos

Foram utilizados camundongos machos Balb/c, com idade entre 6 e 8 semanas. Os animais foram obtidos no Biotério Central da FMRP-USP e mantidos em isoladores no Biotério do Departamento de Clínica Médica, com livre acesso a água e alimento.

3.10 Protocolo de sensibilização e desafio

O protocolo de sensibilização e desafio encontra-se abaixo, na **Figura 4**. Camundongos Balb/c foram sensibilizados duas vezes (em D1 e D8), com 10 µg de ovalbumina (OVA) diluídos em 0,2 mL de solução salina isotônica estéril, por via intraperitoneal (ip). Após uma semana da última sensibilização, os camundongos foram submetidos a quatro desafios (D15, D17, D19, D21) por via intra-nasal, com 10 µg de OVA diluídos em 50 µL de solução salina isotônica estéril, sob leve sedação com isoflurano 100 % (1 mL/mL), administrado por inalação.

Figura 4. Modelo experimental de asma e tratamento com o extrato etanólico das flores de *Erythrina mulungu* Benth. (EV); i.p. intraperitoneal

3.11 Intervenção

Os animais foram tratados diariamente, por sete dias consecutivos via ip. com uma das doses citadas. Os grupos controles – negativo e positivo – receberam respectivamente, solução salina-solvente e dexametasona (2 mg/kg), seguindo o mesmo protocolo de tratamento. Ao total, 7 grupos (contendo de 5 a 10 animais cada) foram estudados, sendo estes:

Grupos OVA/EV200, OVA/EV400, OVA/EV600, OVA/EV800: os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA. Receberam 200, 400, 600 ou 800 mg/kg de extrato etanólico da flor de *E. mulungu* durante o período de tratamento.

Grupo SAL/SAL (controle saudável): os camundongos foram sensibilizados e desafiados com solução salina. Os camundongos receberam solução salina durante o período de tratamento.

Grupo OVA/SAL (controle negativo): os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos receberam solução salina durante o período de tratamento.

Grupo OVA/DEXA (controle positivo): os camundongos foram sensibilizados e desafiados com OVA. Os camundongos receberam dexametasona (DEXA) durante o período de tratamento. Trata-se de um anti-inflamatório de referência.

3.12 Avaliação da hiper-responsividade brônquica em resposta à metacolina

No D22, ou 24h após último desafio, os animais foram anestesiados i.p. com xilazina (10 mg/kg) e quetamina (80 mg/kg), e sedados, submetidos a uma traqueostomia e à colocação de uma cânula traqueal (*Precision Tips – Engenred fluid Dispensing – Nordon EFD, Tip 20 GA PP 0,19 x 1,5 PNK 50P*). Imediatamente após a finalização desse procedimento, o animal foi conectado através da cânula a um ventilador mecânico para animais FlexiVent® (*Scireq, Montreal, QC, Canadá*) com frequência respiratória de 150 respirações/minuto e pressão expiratória final positiva (PEEP) de 3 cm H₂O para medir os parâmetros *in vivo* da função pulmonar.

Antes de iniciar as medidas respiratórias no respirador mecânico FlexiVent® os animais foram paralisados com 1,2 mg/kg de brometo de pancurônio, via i.p. 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, como vias aéreas e parênquima.

Para analisar a hiper-responsividade brônquica foram feitas medidas na condição basal e após a provocação com a administração de aerossóis com concentrações crescentes de metacolina (6,25; 12,5; e 25 mg/dL) por 10 segundos cada, através de um nebulizador ultrassônico (*Hudson RCI, Teleflex Medical, Temecula, CA, USA*). Os parâmetros respiratórios foram selecionados das curvas que apresentarem um coeficiente de determinação

maior ou igual a 0,9 ($COD \geq 0,9$). Foram avaliados e comparados os seguintes parâmetros: resistência total (RRS), elastância total (ERS), resistência tecidual (G) e elastância tecidual (H).

Ao final desse procedimento, os animais foram desconectados do ventilador para análises descritas a seguir.

3.13 Coleta do lavado broncoalveolar, sangue e pulmões

Foi coletado o 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 (*Eppendorf* 5804R) a 3000 rpm por 5 minutos com temperatura de 4°C. O sobrenadante do LBA1 foi separado e armazenado a -80 °C para análises posteriores; do LBA2, foi descartado. Os precipitados remanescentes do LBA1 e do LBA2 foram agrupados e ressuspensos em 500 µL de salina para contagem do número total e diferencial de células.

Após a coleta do LBA, o sangue foi retirado através do ventrículo direito; centrifugado (*Eppendorf* 5804R) a 3300 rpm por 22 minutos com temperatura de 4 °C e o plasma armazenado a -80 °C para dosagem de IgE anti-ovalbumina.

Na sequência, a caixa torácica foi aberta e foram infundidos 5 mL de solução salina no ventrículo direito para retirada do sangue residual dos pulmões. O pulmão direito foi retirado e armazenado em RNAlater (Qiagen, Austin, Texas, USA) em um freezer a -80 °C para posterior preparo do homogenato pulmonar para dosagem de citocinas. O pulmão esquerdo foi retirado e insuflado com 10 mL de formol tamponado a 10 %. Após, foi colocado em imerso em formol tamponado a 10 % por até 72 horas; após esse período, foi preservado em álcool etílico 70 % até o momento de serem incluídos em blocos de parafina e cortados em micrótomo convencional com espessura de 5 µm. Os cortes foram utilizados para análise histológica.

3.14 Avaliação de celularidade total e diferencial

Para contagem de célula total foi utilizado o aparelho Countess® Automated Cell Counter (*Life Technologies*, Carlsbad, Califórnia, EUA). Foram adicionados 10 µL da amostra com 10 µL de azul de Trypan e o valor absoluto fornecido pelo aparelho.

Para a contagem e diferenciação das células inflamatórias, as lâminas foram inicialmente preparadas. Para isso, 100 µL da amostra foram centrifugadas 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) e coradas pela técnica de Diff-Quick®. Foram contadas manualmente 300 células inflamatórias de cada amostra.

3.15 Dosagem sérica de anticorpos IgE para ovalbumina.

Para a quantificação de IgE, inicialmente preencheu-se uma placa de 96 poços com 50 µL de solução OVA (10 µg/mL) sendo esta incubada por 12 horas a 4 °C. Os poços foram então lavados com solução PBS contendo 0,05 % de Tween 20. Na sequência, foram pipetados 200 µL de solução PBS adicionado de 10 % de soro fetal bovino para bloqueio das reações inespecíficas, e a placa foi incubada por mais 1 hora a 37 °C. Os poços foram lavados e as amostras de soro foram adicionadas em duplicata, utilizando-se a diluição 1:2 (25 µL de amostra). Após 2 horas a 37 °C, os poços foram lavados e 50 µL dos anticorpos biotinilados foram adicionados. Decorrido 1 hora a 37 °C, os poços foram lavados e 50 µL de estreptavidina HRP (diluída 1:10.000; BD Bioscience, EUA) foi adicionado e a placa incubada por 30 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Os poços foram então lavados e a reação foi revelada decorrido 30 minutos da incubação com 50 µL de TMB (BD Bioscience, EUA). A reação foi interrompida com adição de 25 µL de ácido sulfúrico (16 %). A leitura da absorbância foi lida com auxílio do espectrofotômetro Versa Max (Molecular Devices, EUA), no comprimento de onda de 450 nm e os resultados foram expressos como unidades de densidade óptica. Somente o grupo 800 mg/kg não foi submetido a esta análise devido à falta de amostra.

3.16 Dosagem de citocinas inflamatórias T_H1 e T_H2 no homogenato pulmonar

O homogenato foi preparado a partir do pulmão armazenado em RNAlater (Qiagen, Austin, Texas, EUA) a -80 °C. Para isso, 50 mg de pulmão de cada amostra foi pesado em uma balança de precisão e 1 mL de uma solução contendo inibidor de proteases (Complete EDTA-free, ROCHE) foi adicionado. O órgão foi processado utilizando um homogeneizador de tecido (OMNI(TH)-International-Kennesaw, GA, EUA) e após foi centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C para dosagem de citocinas. No ANEXO B, encontra-se o protocolo utilizado no preparo do homogenato. Foram quantificadas as citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- γ no sobrenadante do homogenato pulmonar pelo método ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences BD OptEIA™, SanDiego, CA e eBioscience, San Diego, CA, EUA). Algumas amostras foram diluídas para a realização do ensaio (de 1:2, até 1:20). O resultado final é o valor da concentração obtida, multiplicado pelo número de vezes da diluição. Apresenta-se assim como resultado final a concentração da citocina em picograma/mL.

3.17 Análise histológica pulmonar

Foram realizados cortes histológicos no pulmão com espessura de 5 μ m e realizada coloração de Hematoxilina-Eosina (H&E). Para análise morfológica, foram selecionadas 4 a 5 vias aéreas de cada camundongo que apresentavam epitélio íntegro e relação do maior diâmetro/menor diâmetro maior ou igual a 0,5. Antes de serem analisadas, as lâminas foram visualizadas no microscópio LeicaDM500 (Leica, Alemanha) e as imagens foram fotografadas com um aumento de 400 vezes e transferidas para um computador. Para quantificar a inflamação do tecido, delimitou-se a área após a membrana da via aérea (membrana basal), identificando a quantidade de células inflamatórias, através de método semi-quantitativo, estabelecendo um escore de inflamação ⁸⁰, de acordo com a **Tabela 4**. A atribuição do escore foi realizada por duas pessoas, sendo que em uma das análises a identificação dos grupos foi ocultada (cego).

Tabela 4. Escore para a quantificação da gravidade da inflamação peribrônquica.

Escore	Células inflamatórias
0	Normal
1	Poucas células inflamatórias
2	1 anel de células inflamatórias
3	Anel de células inflamatórias de 2 a 4 camadas
4	Anel de células inflamatórias com mais de 4 camadas

3.18 Análise fitoquímica do extrato etanólico das flores de *Erythrina mulungu*

Os alcaloides erisotrina, N-óxido erisotrina e hipaforina presentes no extrato etanólico de flor de *Erythrina mulungu* foram identificados usando padrões autênticos desses compostos. A análise foi realizada em sistema de Cromatografia Líquida de Ultra-alta Pressão acoplada a detector de massas (UPLC *H-Class* -Waters Corporation- Xevo TQ-S tandem quádrupolo -Waters Corporation, Milford, MA), operando com uma fonte Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) em modo positivo de análise. O volume de injeção de amostras foi de 5 µL em uma coluna Zorbax Eclipse XDB-coluna C18 (150 x 4,6 mm I.D. ; 3,5 µm de tamanho de partícula) de Agilent. A fase móvel utilizada consistiu de um gradiente de eluição de 0,1 % de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila contendo 0,1 % de ácido fórmico (solvente B) em um fluxo de 0,5 mL/min. O programa de gradiente de eluição começou com 15 % de B, posteriormente B foi elevada para 60% nos 25 minutos seguintes, manteve-se em 90 % de B durante 5 min, depois foi elevada para 95 % por 5 min e no final a condição de análise retornou para 15 % de B, nos últimos 5 min da análise. Os parâmetros de origem e de funcionamento foram otimizados como se segue: voltagem de corona = 0,3 kV, temperatura da fonte = 150 ° C, temperatura de dessolvatação (N₂) = 350 ° C, fluxo de gás de dessolvatação = 600 L/h, e a gama de massa de m/Z 100 e 500 no modo de varrimento total (Full-scan).

3.19 Análise estatística

Os resultados da responsividade brônquica foram avaliados através do teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas, e todos os demais resultados foram avaliados através do teste ANOVA de uma via e pós teste de Bonferroni's post-hoc para expressar a diferença entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes (GraphPad Prism versão 5).

4. RESULTADOS

4.1 Efeito de *E. mulungu* sobre hiper-responsividade brônquica em resposta à metacolina

Os parâmetros de resistência total (RRS), elastância total (ERS), resistência tecidual (G) e elastância tecidual (H), que caracterizam a medida de função pulmonar dos animais após o tratamento com as doses de 200, 400, 600 e 800 mg/kg do extrato etanólico das flores de *E. mulungu* podem ser visualizados na **Figura 5**.

O grupo OVA/SALTW comparado ao grupo SAL/SAL (controle) apresentou aumento significativo em RRS ($p<0,001$), ERS ($p<0,001$), G ($p<0,001$) e H ($p<0,001$) nas concentrações de 12,5 e 25 mg/mL de metacolina, confirmando a hiper-responsividade brônquica esperada no modelo. Todos os grupos tratados com extrato etanólico das flores *E. mulungu*, nas doses de 200 a 800 mg/kg, tiveram redução significativa da hiper-responsividade brônquica, comparado ao grupo OVA/SALTW ($p<0,001$). Tal efeito foi significativo nas concentrações de 12,5 e 25 mg/mL de metacolina, para todos os parâmetros testados RRS ($p<0,001$), ERS ($p<0,001$) G ($p=0,001$), H ($p<0,001$), nas doses de 200, 400, 600 e 800 mg/kg. A única exceção foi a resposta à dose de 25 mg/dL de metacolina do parâmetro G, no tratamento com 200 mg/kg, em que não houve redução significativa. A administração de dexametasona reduziu significativamente a hiper-responsividade brônquica em relação ao grupo OVA/SALTW, demonstrada por redução em RRS ($p<0,001$), ERS ($p<0,001$), G ($p<0,001$) e H ($p<0,001$).

Figura 5. Efeitos do tratamento de 7 dias com as doses de 200, 400, 600 e 800 mg/kg do extrato etanólico das flores de *Erythrina mulungu* Benth (EV) e de dexametasona (DEXA) na hiper-responsividade brônquica medida na condição basal e após teste de provocação com metacolina (Mch) (6,25, 12,5 e 25 mg/dL). Os dados estão expressos em média e erro padrão da média. n=7 SAL/SAL, OVA/SALTW, OVA/EV200, OVA/EV400 e OVA/DEXA; n=11 OVA/EV600; n=5 OVA/EV800. Um símbolo único significa p<0,05; dois símbolos repetidos, p<0,01; três símbolos, p<0,001.

4.2 Efeito de *E. mulungu* sobre a celularidade total e diferencial

O número de células totais e a contagem celular diferencial do lavado broncoalveolar (LBA) são apresentados na **Figura (a – e)**.

O modelo de asma resultou em aumento significativo no número total de leucócitos no LBA (OVA/SALTW x SAL/SAL, $p < 0,001$), confirmando novamente a resposta inflamatória induzida pela ovalbumina. No grupo asmático, a média foi de $2,0 \times 10^6$ células/animal.

A administração do extrato etanólico das flores de *E. mulungu* resultou na redução do número total de células, obtendo-se com a dose de 600 mg/kg um efeito significativo (OVA/SALTW x OVA/EV600, $p < 0,001$). Nenhuma outra redução significativa foi encontrada após o tratamento de 7 dias, nas doses de 200, 400 e 800 mg/kg comparados ao grupo OVA/SALTW (**Figura 6 a**). O tratamento com dexametasona (2 mg/kg) resultou na diminuição significativa da celularidade total, comparado ao controle asmático (OVA/DEXA x OVA/SALTW, $p < 0,001$) como era esperado. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre o tratamento com a DEXA e as doses de *E. mulungu* testadas.

Na análise diferencial de células, a resposta inflamatória do modelo de asma utilizado, mediado pela resposta T_H2 , resultou no aumento significativo do número de eosinófilos e linfócitos no LBA do grupo OVA/SALTW comparado com o controle (em ambos, OVA/SALTW x SAL/SAL, $p < 0,001$), como era esperado (**Figura 6 b e 6 c**). O número de eosinófilos foi reduzido nos tratamentos com *E. mulungu*, sendo significativa a diminuição nas doses de 600 e 800 mg/kg (OVA/SALTW x OVA/EV600, $p < 0,001$ e OVA/SALTW x OVA/EV800, $p < 0,05$, respectivamente). O tratamento com a planta também inibiu significativamente o aumento do número de linfócitos nas doses de 200, 400 e 600 mg/kg (**Figura 6 c**) comparado grupo asmático (OVA/SALTW x OVA/EV200 e OVA/EV400, $p < 0,05$; (OVA/SALTW x OVA/EV600, $p < 0,001$). O número de macrófagos e neutrófilos não diferiu entre os grupos. A dexametasona demonstrou efeito semelhante à *E. mulungu* na inibição do aumento do número de eosinófilos e linfócitos no LBA (em ambos, OVA/SALTW x OVA/DEXA, $p < 0,001$) (**Figura 6 b e 6 c**).

Figura 6. Efeitos do tratamento de 7 dias com as doses de 200, 400, 600 e 800 mg/kg do extrato etanólico das flores de *Erythrina mulungu* Benth. (EV) no número de células totais (A) e na contagem diferencial absoluta de células (B) no lavado bronquio-alveolar (LBA) de camundongos asmáticos. Os dados estão expressos em média e erro padrão da média. n=7 SAL/SAL, OVA/SALTW, OVA/EV200, OVA/EV400 e OVA/DEXA; n=11 OVA/EV600; n=5 OVA/EV800. Um símbolo único significa p<0,05; dois símbolos repetidos, p<0,01; três símbolos, p<0,001. *diferença de OVA/SALTW.

4.3 Efeito de *E. mulungu* sobre os níveis de IgE sérico

Na Figura 7 pode ser visualizado o efeito de *E. mulungu* sobre a concentração sérica de IgE para ovalbumina. A indução da resposta alérgica com ovalbumina elevou a concentração no grupo OVA/SAL, comparado ao grupo SAL/SAL ($p<0,05$) como era esperado.

Houve uma aparente diminuição da produção de IgE nos grupos de tratados com 200, 400 e 600 mg/kg do extrato etanólico de *E. mulungu*, porém essa diminuição não foi confirmada estatisticamente. O tratamento com a dexametasona não demonstrou efeito sobre a diminuição da produção de IgE.

Figura 7. Efeito do tratamento de 7 dias com as doses de 200, 400, 600 mg/kg do extrato etanólico das flores de *Erythrina mulungu* (EV) e de dexametasona (DEXA) sobre os níveis de IgE sérico. Os dados estão expressos em média e erro padrão da média. n=5 SAL/SAL; n=4 OVA/SALTW; n=6 EV200, OVA/EV400, OVA/EV600 e OVA/DEXA. Um símbolo único significa $p<0,05$; dois símbolos repetidos, $p<0,01$; três símbolos, $p<0,001$. *diferença de OVA/SALTW.

4.4 Efeito de *E. mulungu* sobre os níveis de citocinas do tecido pulmonar

O efeito de *E. mulungu* sobre as citocinas inflamatórias mediadas pelas respostas do tipo T_H1 e T_H2 pode ser observado na **Figura 8**.

Como observado, a indução da resposta alérgica com ovalbumina levou ao aumento da expressão proteica por células inflamatórias de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e INF- γ), o que era esperado; entretanto, o aumento foi significativo somente para IL-13 (OVA/SALTW x SAL/SAL, $p<0,01$).

A administração intraperitoneal do extrato etanólico das flores de *E. mulungu* na dose de 600 mg/kg, durante 7 dias concomitantemente aos desafios, resultou em uma diminuição significativa do aumento de IL-4 e IL-5 comparado ao grupo asmático (IL-4 OVA/SALTW x EV600, $p<0,01$; IL-5 OVA/SALTW x EV600, $p<0,05$) (**Figura 8 a e b**). Os níveis de IL-10 e INF- γ diminuíram com o tratamento de 600 mg/kg, porém sem diferença estatística (**Figura 8 c e e**).

Curiosamente, a administração de *E. mulungu* induziu, em uma concentração dose-dependente, a maior expressão proteica de IL-13 no tecido pulmonar asmático (OVA/SALTW x EV400, $p<0,05$; OVA/SALTW x EV600, $p<0,001$; OVA/SALTW x EV800, $p<0,001$) (**Figura 8 d**). O mesmo estímulo à expressão de maior concentração de citocinas foi observado em IL-4, IL-5, IL10 e INF- γ , porém nas concentrações de 200 e 400 mg/kg, sugerindo que, para *E. mulungu*, talvez haja uma dose ideal para ser considerada anti-inflamatória ou pró-inflamatória (IL-10, OVA/SALTW x EV400, $p<0,05$; INF- γ , OVA/SALTW x EV200, $p<0,05$; OVA/SALTW x EV400, $p<0,001$).

Como esperado, a dexametasona diminuiu a expressão de proteína comparado ao grupo asmático, sendo esta significativa para IL-4 e IL-13 (OVA/SALTW x DEXA, $p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente).

Figura 8. Efeito do tratamento de 7 dias com as doses de 200, 400, 600 e 800 mg/kg do extrato etanólico das flores de *Erythrina mulungu* (EV) e de dexametasona (DEXA) sobre os níveis de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e INF- γ . Os dados estão expressos em média e erro padrão da média. n=5 SAL/SAL, OVA/EV800; n=6 OVA/SALTW, EV200, OVA/EV400, OVA/EV600 e OVA/DEXA. Um símbolo único significa $p < 0,05$; dois símbolos repetidos, $p < 0,01$; três símbolos, $p < 0,001$. *diferença de OVA/SALTW.

4.5 Efeito de *E. mulungu* sobre a infiltração por células inflamatórias no tecido

O escore da avaliação das lâminas histológicas para quantificação da infiltração de células inflamatórias é apresentado na **Figura 9**.

A infiltração de células inflamatórias foi significativamente maior no grupo OVA/SAL comparado ao grupo controle SAL/SAL (OVA/SAL x SAL/SAL, $p<0,001$). Este aumento foi significativamente atenuado pela administração do extrato etanólico das flores de *E. mulungu* nas doses de 400, 600 e 800 mg/kg comparado ao grupo OVA/SALTW (OVA/SALTW x EV 400, $p<0,001$; EV600 $p<0,001$; EV800 $p<0,001$). Como esperado, a dexametasona também diminuiu significativamente o infiltrado celular (OVA/SAL x OVA/DEXA, $p<0,001$). Fotos das lâminas histológicas podem ser observadas na **Figura 9**.

Figura 9. Efeito do tratamento com *Erythrina mulungu* Benth. sobre a infiltração de células inflamatórias no tecido pulmonar: 0 normal; 1 poucas células; 2 um anel de células inflamatórias; 3 um anel de células inflamatórias de 2 a 4 camadas; 4 um anel de células inflamatórias com mais de 4 camadas. Valores representam a média do escore e o EPM de 7 animais por grupo. *** $p<0,001$. *diferença de OVA/SALTW. **a** SAL/SAL; **b** OVA/SALTW; **c** OVA/DEXA; **d** OVA/EV200; **e** OVA/EV400; **f** OVA/EV600; **g** OVA/EV800.

4.6 Identificação dos componentes de *E. mulungu*

A partir do extrato etanólico foi obtido um cromatograma (**Figura 10 d**) e espectros de massa dos constituintes majoritários de *E. mulungu* utilizando a técnica de UPLC/MS-MS. A substância com tempo de retenção de 9,22 min foi identificada como sendo o alcaloide erisotrina, através da comparação com o tempo de retenção do padrão de 9,30 min e o espectro de massas do íon apresentou m/z 314 (**Figura 10 a**). O alcaloide N-óxido erisotrina, está presente no cromatograma do extrato com tempo de retenção de 9,75 min, o tempo de retenção do padrão foi de 9,78 min e do espectro de massas do íon apresentou m/z 330 (**Figura 10 b**). No extrato também foi identificado o alcaloide hipaforina, com tempo de retenção de 6,87 min, o padrão apresentou tempo de retenção de 6,85 min, e espectro de massas do íon m/z de 247 (**Figura 10 c**). A estrutura química destes compostos está apresentada na **Figura 11**.

Figura 10. Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-MS. a) Padrão de erisotrina, b) Padrão de N-Oxido Erisotrina, c) Padrão de hipaforina e d) Extrato bruto etanólico de flor de *Erythrina mulungu* Benth.

Figura 11. Desenho da estrutura química dos constituintes majoritários da *Erythrina mulungu* Benth. a) Erisotrina, b) N-Oxido Erisotrina, c) Hipaforina

5. DISCUSSÃO

Conjuntamente, nossos resultados demonstraram um potencial efeito anti-inflamatório (AI) de *E. mulungu* sobre a hiper-responsividade e a inflamação brônquica em um modelo animal de asma induzido por alérgeno, confirmando-se a hipótese do estudo. Até onde sabemos, essa foi a primeira vez em que se investigaram os efeitos de *E. mulungu* sobre esta doença.

Em trabalhos anteriores, a atividade AI da *E. mulungu* já havia sido demonstrada em modelos animais de peritonite aguda induzida por zymozan⁶⁶ e de edema de pata induzida por carragenina e dextran⁶⁵. Naquele trabalho, a administração por via oral de 100 mg/kg do extrato hidroetanólico da casca e da raiz de *E. mulungu*, 30 minutos antes da injeção de zymozan, reduziu significativamente o número de células recrutadas na cavidade peritoneal comparado com os controles não tratados, sugerindo a presença de componentes que interfiram na resposta inflamatória. Neste último trabalho, o pré-tratamento por via oral, com as doses de 200 e 400 mg/kg do extrato hidroalcoólico da casca de *E. mulungu* reduziu significativamente o edema de pata dos animais. Os autores sugeriram que *E. mulungu* possa influenciar na atividade dos leucócitos polimorfonucleares, por exemplo, modulando síntese, liberação e atividade de mediadores, tais como prostaglandinas, óxido nítrico e citocinas (TNF-alfa, IL-1 etc.). Não foram encontrados trabalhos avaliaram a atividade anti-inflamatória das flores, tampouco outros trabalhos sobre a atividade anti-inflamatória desta espécie com qualquer parte da planta.

A hiper-responsividade brônquica é um estado patológico no qual o estreitamento da via aérea é rapidamente disparado por estímulos diversos e reflete uma das principais características *in vivo* da asma⁹. Neste trabalho a administração do extrato etanólico de *E. mulungu* nas doses de 200, 400, 600 e 800 mg/kg resultou na diminuição do aumento da hiper-responsividade do animal durante o teste de provocação brônquica com metacolina. Ainda não são bem esclarecidos todos os mecanismos que modulam a hiper-responsividade brônquica, mas sugere-se uma atividade importante de eosinófilos e mastócitos na exacerbação do processo⁸¹. Sabe-se, por exemplo, que pacientes com asma grave possuem maior número de eosinófilos nas vias aéreas do que indivíduos com asma leve². Os linfócitos T parecem exercer efeitos sobre a hiper-responsividade brônquica tendo em vista um estudo *in vivo*, de 1994, que demonstrou que a depleção de linfócitos CD4⁺ em modelo animal de

hiper-reatividade e inflamação induzida por antígenos preveniu completamente a hiper-responsividade e a infiltração por eosinófilos, evidenciando a dependência da hiper-responsividade sob linfócitos T CD4⁺; os resultados foram consistentes também com o fato de os eosinófilos serem as células efetoras dessa resposta ⁸². Além disso, dentre as citocinas produzidas por linfócitos T CD4⁺, referências mais recentes mostram que a IL-13 tem um importante papel na fase efetora da resposta alérgica, estando envolvida nas principais manifestações clínicas da doença, como a hiper-responsividade, hipersecreção de muco, alteração de músculo liso da via aérea e a fibrose subepitelial. O mecanismo preciso pelo qual a IL-13 regula a hiperresponsividade não está completamente esclarecido, mas está associado à ativação do seu receptor tipo 2 (IL-4R α /IL-13R α 1) e a ativação do fator de transcrição STAT-6, o qual tem se mostrado essencial para as principais características da asma ⁸³.

Neste trabalho, *E. mulungu* diminuiu o número de células totais e o número de eosinófilos no LBA, com diferença significativa na dose de 600 mg/kg. Assim, sugere-se que o extrato de *E. mulungu* possa ter diminuído a exacerbação da hiper-responsividade brônquica nos animais através da menor maturação e migração dos eosinófilos. Além disso, neste trabalho observou-se um efeito supressivo do extrato na infiltração de células inflamatórias no tecido pulmonar, reforçando o resultado.

Os eosinófilos são provenientes da medula óssea e a sua maturação de precursores mieloides é induzida por GM-CSF, IL-3 e IL-5 ¹³; por sua vez, o recrutamento de eosinófilos do sangue para o tecido é aumentado em condições inflamatórias mediadas por IL-4 e IL-5 ⁸⁴. Sabe-se que a IL-4 promove a expressão de moléculas de adesão VCAM-1 (molécula de adesão celular-vascular-1) pelo endotélio vascular; e por meio da interação VCAM-1, a IL-4 direciona as células para o local inflamado. Nesse trabalho, o tratamento com *E. mulungu* atenuou o aumento da concentração de IL-4 e IL-5 em tecido pulmonar de animais ova-sensibilizados, principalmente na dose de 600 mg/kg, bem como reduziu o número de eosinófilos no LBA. Observados os dados, sugere-se que a redução do recrutamento de eosinófilos pode ter ocorrido, em parte, pela inibição da expressão de IL-4 e IL-5, semelhante à resposta observada com a dexametasona. A dosagem de citocinas pró-inflamatórias no homogenato pulmonar mostra que *E. mulungu* suprimiu a expressão de IL-4 e IL-5, significativamente, e de IL-10, sugerindo que a atividade anti-inflamatória da planta na asma possa ser associada à menor produção de citocinas por linfócitos T_H2. Mecanismos moleculares da ação do extrato sobre a sinalização intracelular de linfócitos T não foram

estudados e precisam ser aprofundados para se elucidar o mecanismo de ação para inibir a expressão proteica. Mais recentemente, estudos em camundongos Rag2^{-/-}, deficientes de linfócitos T e B, quando estimulados com IL-25 (citocina indutora de resposta T_H2) produziram IL-5 e IL-13. Em outros modelos, de populações de células não-T e não-B, também foi encontrada a produção de citocinas T_H2, mediante o tratamento com IL-25. Esses achados mostraram que outros tipos celulares, nesse caso, as ILC-2 (*Innate Lymphoid Cell 2*), são igualmente capazes de promover funções pró-inflamatórias, semelhantes aos linfócitos T_H2⁸⁵. Assim, questiona-se este tipo celular como outro possível local de atuação de *E. mulungu*.

As citocinas IL-4 e IL-13 têm um papel chave na estimulação de linfócitos B para a produção de IgE. Dentre os efeitos da IL-4 está a indução da mudança da cadeia pesada da IgM para IgE¹³. A produção aumentada de ambas citocinas por células T-específicas é responsável pela síntese de IgE e o desenvolvimento de doenças alérgicas em certos indivíduos⁸⁶. Neste trabalho, *E. mulungu* reduziu a expressão de IL-4, porém aumentou gradativamente a expressão de IL-13 de acordo com as doses testadas. A menor expressão de IL-4 pode ser considerada aspecto positivo na melhora da resposta inflamatória na asma. Observou-se que houve uma diminuição de IgE anti-ova sérico nos grupos tratados com *E. mulungu*, embora não confirmado pela estatística, sugerindo que a inibição de IL-4 possa ter influenciado nesta menor produção de IgE, contribuindo para melhora da asma. Outras repetições da análise poderiam ser feitas para comprovar esta afirmação.

Foi demonstrado também a influência da IL-4 no recrutamento de células T_H2 para os pulmões e na indução da inflamação⁷. Fisiologicamente, há uma baixa produção de muco pelas células de *goblet* (caliciformes) e o aumento na produção deste é reflexo de hiperestimulação. A IL-13 compartilha muitas atividades biológicas com a IL-4; em modelos animais geneticamente modificados para superexpressar IL-13 nas vias aéreas, uma importante inflamação e hiperplasia foram observadas⁸⁷. Como já foi apresentado, poucos trabalhos estudaram o papel imunomodulador de *E. mulungu*, e pouco se sabe sobre a via de resposta preferencial, se seria T_H1 ou T_H2. Neste modelo de inflamação das vias aéreas houve um aumento de IL-13, podendo assim favorecer o desenvolvimento da inflamação do tipo T_H2. Análises histológicas poderiam auxiliar em um maior esclarecimento deste efeito.

IFN- γ é uma das principais citocinas produzidas pelas células T_H1 e característica da resposta imunológica tipo 1⁹. O desequilíbrio entre a produção das citocinas efetoras T_H1/T_H2

é característico na asma, e a ação de citocinas T_H1 exerce ação moduladora negativa na inflamação alérgica ²⁷. Neste trabalho, o modelo alérgico de indução com ovalbumina aumentou a concentração de IFN- γ nos animais asmáticos, comparado ao grupo controle negativo. Este comportamento difere do trabalho de Shen *et al* (2008) com animais C57BL6, no qual obtiveram-se menores concentrações de IFN- γ nos animais asmáticos, também em um modelo induzido com ovalbumina. Segundo o autor, camundongos Balb/c têm uma resposta T_H2 superior do que C57BL6 ²⁷. Neste trabalho *E. mulungu* aumentou a expressão proteica de IFN- γ nas doses de 200 e 400 mg/kg, parecendo potencializar a resposta T_H1 , e diminuiu na dose de 600 mg/kg. Podemos especular que o desvio da inflamação para um padrão T_H1 e, conseqüentemente, redução do padrão T_H2 , tenha sido responsável, ao menos em parte, pelos resultados que obtivemos.

Estudos que utilizaram modelos animais de asma induzida por ovalbumina observaram com outras plantas efeitos semelhantes à modulação da *E. mulungu* neste trabalho. Entre essas plantas estão:

Saururus chinensis (planta nativa da China/Coreia): Quan, *et al* (2010) utilizaram o extrato etanólico das partes aéreas da planta, nas doses de 10 à 100 mg/kg (v.o.) e obtiveram diminuição da expressão proteica de IL-4, IL-5 e IL-13; IgE; menor infiltrado de células inflamatórias no tecido e hiperplasia de células caliciformes; e diminuição nos níveis de PGE2 e LTC4, potentes mediadores lipídios inflamatórios ²⁶.

Astragalus Membranaceus (planta nativa da China): Shen, *et al* (2008) utilizaram o extrato aquoso das raízes da planta fervida por 1 hora, na dose de 10g/kg/d (i.p.) por 28 dias. Observaram diminuição da expressão proteica de IL-5, IL-13, (nenhum efeito sobre IL-4) e aumento de IFN- γ ; redução no número de leucócitos totais e eosinófilos no LBA; menor infiltrado de células inflamatórias no tecido e hiperplasia de células caliciformes; diminuição ao aumento da hiper-responsividade brônquica ²⁷.

Scropularia striata (planta nativa do Irã): Azadmerh *et al* (2013) utilizaram o extrato hidroetanólico das partes aéreas da planta, macerada por 3 dias, nas doses de 100 e 200mg/kg (i.p) por 7 dias e obtiveram diminuição da expressão proteica de IL-4 e IL-5; IgE total e IgE ova específica; redução no número de leucócitos totais e eosinófilos no LBA; redução da infiltração de células inflamatórias no tecido ²⁸.

Em nosso estudo, inicialmente, observamos a morte de 45% dos animais que receberam o tratamento com a dose 800 mg/kg do extrato de *E. mulungu* seguido da anestesia.

Esta dose pode ter causado depressão do sistema nervoso central (SNC), possivelmente interagindo ou potencializando os efeitos do anestésico inalatório, o que é indesejável. A observação corrobora com dados da literatura em que são comprovados os efeitos desta planta sobre o SNC ⁴¹⁻⁴⁴. Quanto à toxicidade salienta-se que apesar da morte dos animais, De Bona *et al* (2012) estabeleceu a dose letal média (DL₅₀) da inflorescência de *E. mulungu* em 1,37 g/kg, portanto segura ao uso em doses inferiores.

O perfil cromatográfico do extrato de *E. mulungu* revelou a presença de erisotrina, N-óxido erisotrina e hipaforina. Essas substâncias são alcaloides e se destacam pela presença nas plantas da família Fabaceae ⁸⁸. Ao total, são conhecidos mais de 110 alcaloides eritrianos, sendo que nas flores também são encontrados: (+)-11a-hidroxi-erithravina, (+)-eritravina e (+)-a-hidroxierisotrina, eritartrina e eritristemina ^{44, 50}.

A literatura mostra a presença também de flavanonas, flavonóis, chalconas, estilbenos, isoflavonas, isoflavonóis, isoflavonoides, pterocarpanos, coumestanos, 3-fenil-coumarinas, lignanas, triterpenos e sesquiterpenos em *E. mulungu*. Alguns destes compostos têm, documentadas, atividade antimicrobiana, antiinflamatória, inibição da tirosinase, da fosfolipase A2 e da enzima ciclooxigenase (COX) ³⁷. É possível, portanto, que o extrato vegetal possa ter atuado por diferentes mecanismos, causando efeitos sinérgicos para a melhora da asma, e o fitocomplexo é até onde os estudos mostram, a principal vantagem atribuída ao uso de fitoterápicos, comparado aos medicamentos alopáticos ⁸⁹.

Coletivamente esses resultados sugerem que *E. mulungu* tem potencial para uso na asma, através da modulação da resposta inflamatória, apresentando efeitos de imunomodulador e anti-inflamatório.

O estudo da asma em modelos murinos apresenta grandes críticas na literatura. Entre os motivos estão a evidente diferença na composição celular da via aérea humana com a dos animais e por se utilizarem dosagens de compostos, até mesmo adjuvantes, que extrapolam a realidade na indução da asma. No entanto, este modelo é largamente utilizado na literatura, inclusive foi utilizado no estudo para o desenvolvimento de broncodilatores, garantindo a viabilidade dos resultados nesse trabalho.

Além desta, outras limitações deste estudo incluem:

- Um período de tratamento mais prolongado poderia mostrar resultados mais expressivos sobre a produção de IgE e sobre os marcadores inflamatórios.

- A utilização da ovalbumina (uma proteína) para indução da inflamação gerou um padrão de resposta característico de asma alérgica. No entanto, o uso de *E. mulungu* em outros subtipos de asma, marcado pela ativação de outros tipos celulares, precisa ser estudado.
- A via de administração para testar o extrato foi intraperitoneal. Ou seja, não houve a interferência da barreira intestinal, bem como do metabolismo de primeira passagem do fígado sobre os compostos; o que pode levar à ativação ou desativação dos mesmos. Assim é necessário ser avaliado pela administração oral, que se assemelha ao uso tradicional em humanos.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, os animais asmáticos tratados com *E. mulungu* apresentaram melhora na hiper-responsividade brônquica, melhora na inflamação tecidual e melhora no perfil de produção de citocinas T_H2, principalmente na dose de 600 mg/kg.

7. REFERÊNCIAS

1. Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1(15025):1-22.
2. Fahy J V. Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):57-65.
3. By O, Goldberg M, Doughty D, Lawrence K. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2016.
4. World Health Organization (WHO). Asthma. 2016. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/>.
5. Naghavi M, Wang H, Lozano R, Davis A, Liang X, Zhou M, et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015;385(9963):117-171.
6. SBPT. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma - 2012. *J Bras Pneumol e Tisiol.* 2012;38(suplemento 1):S1-46.
7. Steinke JW. Anti-interleukin-4 therapy. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2004;24:599-614.
8. Fujimura KE, Sitarik AR, Havstad S, Lin DL, Levan S, Fadrosch D, et al. Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation. *Nat Med.* 2016;22(10):1187-1191.
9. Iwasaki A, Foxman EF, Molony RD. Early local immune defences in the. *Nat Publ Gr.* 2016.

10. Holt PG, Strickland DH, Wikström ME, Jahnsen FL. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(2):142-152.
11. David, G; Tashjian Jr, AH.; Armstrong, EJ.; Armstrong AW. *Princípios de Farmacologia*. 3ª Edição. Guanabara Gookan; 2013.
12. Georas SN, Guo J, De Fanis U, Casolaro V. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. *Eur Respir J*. 2005;26(6):1119-1137.
13. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular E Molecular*. Vol 7ª. Elsevier Ltda; 2012.
14. Lourenzi, H, Matos FJA. Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2ª edição. Saraiva; 2008.
15. Ferro D. Fitoterapia: Conceitos Clínicos. Atheneu; 2008.
16. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Menz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: Da Planta Ao Medicamento. 6ª edição. UFRGS/UFSC; 2007.
17. McChesney JD, Venkataraman SK, Henri JT. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry*. 2007;68(14):2015-2022.
18. Calixto J. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc Cult*. 2003;200:37-39.
19. Ministério da Saúde. *Política Nacional De Plantas Medicinais E Fitoterápicos*. 2006. 1-60p.
20. ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 26 de 13 de maio de 2014. Registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. 2014;34.

21. Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LCM. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1997;37(8):693-704.
22. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr.* 2004;134(12 Suppl):3479S-3485S.
23. Williams DH, Stone MJ, Hauck PR, Rahman SK. Why Are Secondary Metabolites (Natural Products) Biosynthesized? *J Nat Prod.* 1989;52(6):1189-1208.
24. Elfawal MA., Towler MJ, Reich NG, Golenbock D, Weathers PJ, Rich SM. Dried whole plant *Artemisia annua* as an antimalarial therapy. *PLoS One.* 2012;7(12):1-7.
25. Elfawal MA, Towler MJ, Reich NG, Weathers PJ, Rich SM. Dried whole-plant *Artemisia annua* slows evolution of malaria drug resistance and overcomes resistance to artemisinin. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(3):821-6.
26. Quan Z, Lee YJ, Yang JH, Lu Y, Li Y, Lee YK, et al. Ethanol extracts of *Saururus chinensis* suppress ovalbumin-sensitization airway inflammation. *J Ethnopharmacol.* 2010;132(1):143-149.
27. Shen HH, Wang K, Li W, Ying YH, Gao GX et al. *Astragalus Membranaceus* prevents airway hyperreactivity in mice related to Th2 response inhibition. *J Ethnopharmacol.* 2008;116(2):363-369.
28. Azadmehr A, Hajiaghaee R, Zohal MA, Maliji G. Protective effects of *Scrophularia striata* in ovalbumin-induced mice asthma model. *Daru J Pharm Sci.* 2013;21(1):56.
29. 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- κ B inhibition. *J Ethnopharmacol.* 2011;136(3):414-421.

30. Fierro IM, da Silva ACB, da Lopes CS, de Moura RS, Barja-Fidalgo C. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. *J Ethnopharmacol*. 1999;66(1):19-24.
31. Napimoga MH, Yatsuda R. Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. *J Pharm Pharmacol*. 2010;62(7):809-820.
32. Brasil. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. *Agencia Nac Vigil Sanitária*. 2011.
33. Brasil. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Brasília; 2009.
34. Lorenzi H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação E Cultivo Das Plantas. 6ª edição. Plantarum; 2014, 384 p.
35. Faggion SA, Cunha AOS, Fachim HA, Gavin AS, dos Santos, WF, Pereira MAS, et al. Anticonvulsant profile of the alkaloids (+)-erythravine and (+)-11-a-hydroxy-erythravine isolated from the flowers of *Erythrina mulungu* Mart ex Benth (Leguminosae-Papilionaceae). *Epilepsy Behav*. 2011;20(3):441-446.
36. Jiri P. Mulungu – Rainforest Anxiolytic. *Anxiety Relat Disord*, 2011:290.
37. Majinda RRT, Wanjala CCW, Juma BF. Bioactive non-alkaloidal constituents from the genus *Erythrina*. *Stud Nat Prod Chem*. 2005;32(PART L):821-853.
38. De Lima MRF, de Souza JL, dos Santos AF, de Andrade MCC, Sant'Ana AE, Genet JP et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2006;105(1-2):137-147.
39. Rodrigues, VEG; Carvalho DA. Plantas Medicinais no Domínio dos Cerrados. Lavras: UFLA; 2001.
40. de Albuquerque UP, de Medeiros PM, de Almeida AL, Monteiro JM, Lins Neto EMF,

de Melo JG, et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J Ethnopharmacol*. 2007;114(3):325-354.

41. Onusic GM, Nogueira RL, Pereira AMS, Viana MB. Effect of acute treatment with a water-alcohol extract of *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. *Brazilian J Med Biol Res*. 2002;35(4):473-477.
42. Onusic GM, Nogueira RL, Pereira MAS, Flausino Júnior OA, Viana MB. Effects of Chronic Treatment with a water – alcohol extract from *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. *Biol Pharm Bull*. 2003;26(11):1538-1542.
43. Ribeiro MD, Onusic GM, Poltronieri SC, Viana MB. Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. *Brazilian J Med Biol Res*. 2006;39(2):263-270.
44. Flausino Júnior, OA, Santos LA, Verli H, Pereira AMS, Bolzani VS, Nunes-de-Souza RL. Anxiolytic effects of erythrinian alkaloids from *Erythrina mulungu*. *J Nat Prod*. 2007;70(1):48-53.
45. Flausino-Júnior OA, Pereira AMS, Bolzani VS, Nunes-de-Souza RL. Effects of erythrinian alkaloids isolated from *Erythrina mulungu* (Papilionaceae) in mice submitted to animal models of anxiety. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(2):375-378.
46. Vieira SCH, Sólón S, Vieira MC, Zárate NAH. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. *Brazilian J Pharmacogn*. 2010;20(1):28-34.
47. Silveira-Souto ML, São-Mateus CR, de Almeida-Souza LM, Groppo FC. Effect of *Erythrina mulungu* on anxiety during extraction of third molars. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014;19(5).
48. Fiss E, Paris EG, Brandão DC, Ghorayeb N. Avaliação clínica da eficácia e tolerabilidade do uso associado de *Passiflora alata*, *Crataegus oxyacantha* L. e *Erythrina mulungu* comparado à associação de *Passiflora incarnata*, *Crataegus*

- oxyacantha* L. e *Salix alba* L. em portadores de insônia e ansiedades leves. *Rev Bras Med.* 2006;63(9):489-496.
49. Rodrigues E, Tabach R, Galduróz JCF, Negri G. Plants with possible anxiolytic and/or hypnotic effects indicated by three Brazilian cultures - Indians, Afro-Brazilians, and river-dwellers. *Stud Nat Prod Chem.* 2008;35:549-595.
 50. Sarragiotto MH., Filho HL., Marsaioli AJ. Erysotrine-N-oxide and erythartine-N-oxide, two novel alkaloids from *Erythrina mulungu*. *Can J Chem.* 1981;59(13):2771-2775.
 51. de Bona AP, Batitucci MCP, Andrade MA, Riva JAR, Perdigão TL. Estudo fitoquímico e análise mutagênica das folhas e inflorescências de *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.) através do Teste de Micronúcleo em roedores. *Rev Bras Plantas Med.* 2012;14(2):344-351.
 52. Coqueiro A, Lee L, Bolzani VS, Verpoorte R. Development of a temperature-pressure controlled extraction method for the alkaloids of *Erythrina mulungu*. [Congress Abstract]. 2014.
 53. Callejon DR, Riul TB, Feitosa LGP, Guaratini T, Silva DB, Adhikari A et al. Leishmanicidal evaluation of tetrahydroprotoberberine and spirocyclic erythrina-alkaloids. *Molecules.* 2014;19(5):5692-5703.
 54. Rambo DF, Vignoli-Silva M, Dresch RR, Biegelmeyer R, Passos CS, Moreno PRH et al. Morphoanatomical identification and physicochemical parameters of the drug *Erythrina verna* Vell. trunk bark. *Bol Latinoam Y Del Caribe Plantas Med Y Aromat.* 2013;12(3):243-256.
 55. Feitosa, LGP, Guaratini T, Lopes JLC, Lopes NP, Bizaro AC, e al. Aplicação de espectrometria de massas com ionização por elétron na análise de alcalóides do mulungu. 2012;35(11):2177-2180.

56. de Omena MC, Navarro DMAF, de Paula JE, Luna JS, Ferreira de Lima MR, Sant'Ana AEG. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. *Bioresour Technol.* 2007;98(13):2549-2556.
57. Benth M, Quassia L, Plantago L, Mateus MAF, Duarte CM, Faria R et al. In vitro and foliar spray evaluation of *Verbena officinalis* (L.), *Erythrina mulungu* (Mart . ex Benth.), *Quassia amara* (L.), *Bidens pilosa* (L.) and *Plantago lanceolata* (L.), extracts on *Meloidogyne incognita*. *Idesia.* 2013;31(1):109-115.
58. Setti-Perdigão P, Serrano MAR, Flausino OA, Bolzani VS, Guimarães MZP, Castro NG. *Erythrina mulungu* alkaloids are potent inhibitors of neuronal nicotinic receptor currents in mammalian cells. *PLoS One.* 2013;8(12):8-13.
59. Mazzari ALDA, Milton F, Frangos S, Carvalho ACB, Silveira D, Neves FAR et al. In vitro effects of four native brazilian medicinal plants in CYP3A4 mRNA gene expression, glutathione levels, and P-glycoprotein activity. *Front Pharmacol.* 2016;7:265.
60. Guaratini T, Silva DB, Bizaro AC, Sartoli, LR, Humpf HU, Lopes NP et al. In vitro metabolism studies of erythraline, the major spiroalkaloid from *Erythrina verna*. *BMC Complement Altern Med.* 2014;14(1):61.
61. Marques LMM, Aguiar FA, da Silva DB, Callejon DR, do Oliveira ARM, Lopes NP et al. Microsomal metabolism of erythraline: An anxiolytic spiroalkaloid. *Brazilian J Pharmacogn.* 2015;25(5):529-532.
62. Vasconcelos SMM, Oliveira GR, Carvalho MM, Rodrigues AC, Silveira ER et al. Antinociceptive activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *E. Mulungu* in mice. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(7):946-949.
63. Vasconcelos SMM, Macedo DS, de Melo CT, Paiva MA, Rodrigues AC, Silveira ER, et al. Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. *J Pharm Pharmacol.* 2004;56(3):389-393.

64. Vasconcelos SMM, Lima NM, Sales GT, Cunha GM, Aguiar LM, Silveira ER et al. Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. *J Ethnopharmacol*. 2007;110(2):271-274.
65. Vasconcelos SMM, Sales GTM, Lima N, Lobato RFG, Macedo DS, Barbosa-Filho JM et al. Anti-inflammatory activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina Mulungu* in mice. *Brazilian J Pharmacogn*. 2011;21(6):1155-1158.
66. de Oliveira MSG, Aquino AB, da Silva DL, Aquino PGV, Santos MS, Porfírio APR et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts and fractions from *Erythrina mulungu*. *Brazilian J Pharmacogn*. 2012;22(1):157-161.
67. Santos Rosa D, Faggion SA, Gavin AS, Anderson de Souza M, Fachim HA, Ferreira dos Santos W, et al. Erysothrine, an alkaloid extracted from flowers of *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth: Evaluating its anticonvulsant and anxiolytic potential. *Epilepsy Behav*. 2012;23(3):205-212.
68. Proença GV, Silva MG, Sabha M, Vila MMDC, Gerenutti M. Toxicological effects of *Erythrina mulungu* Mart. on the reproductive performance of pregnant rats. *Pharmacologyonline*. 2012;2:23-28.
69. Mello FB, Langeloh A, Roberto J, Mello B. Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Passiflora alata*, *Erythrina mulungu*, *Leptolobium elegans* e *Adonis vernalis*. 2007;26(2):191-200.
70. Quintans LJ, Almeida JRGS, Lima JT, Nunes XP, Siqueira JS, de Oliveira LEG et al. Plants with anticonvulsant properties - A review. *Brazilian J Pharmacogn*. 2008;18(SUPPL.):798-819.
71. Sarris J, McIntyre E, Camfield DA. Plant-based medicines for anxiety disorders, part 1: A review of preclinical studies. *CNS Drugs*. 2013;27(3):207-219.

72. Zhu HL, Wan JB, Wang YT, Li BC, Xiang C, He J et al. Medicinal compounds with antiepileptic/anticonvulsant activities. *Epilepsia*. 2014;55(1):3-16.
73. Adeneye AA. Subchronic and chronic toxicities of african medicinal plants. Toxicological Survey of African Medicinal Plants. 1ª edição. Editora: Elsevier Science, 2014. pp.99-133. Olhar certinho a edição de ref para livros.
74. Balbani APS, Silva DHS, Montovani JC. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. *Expert Opin Ther Pat*. 2009;19(4):461-473.
75. Mateus MAF, Faria CMDR, Botelho RV, Dallemole-giaretta R, Ferreira SGM, Zaluski WL. Extratos aquosos de plantas medicinais no controle de *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949. *Biosci J*. 2014;30(3):730-736.
76. Duarte EMG, Cardoso IM, Stijnen T, Mendonça MAFC, Coelho MS, Cartarutti RB et al. Decomposition and nutrient release in leaves of Atlantic Rainforest tree species used in agroforestry systems. *Agrofor Syst*. 2013;87(4):835-847.
77. Pêgo RG, Grossi JAS, Queiroz IDS, Vasconcellos HC. Physiological responses of *Erythrina verna* seedlings on seed pre-germinative treatments and sowing depth. *Cienc. Florest*. 2015;25(1):59-66.
78. Gonçalves JF, Rezende RS, Martins NM, Gregório RS. Leaf breakdown in an Atlantic Rain Forest stream. *Austral Ecol*. 2012;37(7):807-815.
79. ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17 de 16 de abril de 2010. Dispões sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. 2014:1-65.
80. Sur S, Wild JS, Choudhury BK, Sur N, Alam R, Klinman DM. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 1999;162(10):6284-6293.

81. Lee M, Kim S, Kwon OK, Oh SR, Lee HK, Ahn K. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of resveratrol, a polyphenolic stilbene, in a mouse model of allergic asthma. *Int Immunopharmacol*. 2009;9(4):418-424.
82. Thomas BC, Melott AL, Fields BD, Al TET. Depletion of murine CD4⁺ T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. *Astrobiology*. 2008;8(1):9-17.
83. Gour N, Wills-Karp M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine*. 2015;75(1):68-78.
84. Hogan SP, Koskinen A, Matthaei KI, Young IANG, Foster PS. Interleukin-5-producing CD4⁺ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, Bronchial Hyperreactivity and lung damage mice. *Am J Respir Care Med*, 1998;157:2010-2018.
85. Lim, AI, Li Y, Lopez-Lastra S, Stadhouders R, Paul F, Casrouge A et al. Systemic human ILC precursors provide a substrate for tissue ILC differentiation. *Cell*, 2017;168(6):1086-1100.
86. de Vries JE, Novel fundamental approach to intervening in IgE-mediated allergic diseases. *J Invest Dermatol*, 1994;102(2):141-4.
87. Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, et al. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest*. 1999;103(6) 779-88.
88. Simões CMO, Schenkel EP, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia. Do produto natural ao medicamento*. 1ª edição. Artmed; 2017. 486p.
89. Carmona F, Pereira AMS. Herbal medicines: Old and new concepts, truths and misunderstandings. *Brazilian J Pharmacogn*. 2013;23(2):379-385.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP

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 utilizado no preparo do homogenato pulmonar

1. Preparar o Inibidor de Protease:

- a. Ligar o fluxo por 30 minutos (com UV)
- b. Colocar 50 mL de PBS 1X estéril GELADO em um tubo *falcon* ou garrafa estéril
- c. Retirar cuidadosamente um comprimido do inibidor de protease (complete, EDTA-*free*) que fica acondicionado na geladeira e colocar no PBS 1X
- d. Deixar dissolver totalmente o comprimido e guardar na geladeira até o uso.

PONTOS CRÍTICOS:

*Cuidado para não contaminar os comprimidos. Retirar com uma pinça ESTERILIZADA (passar álcool 70 %, deixar na UV por 30 minutos e flambar no fogo antes do uso).

2. Preparar o PBS 1x a partir do 10x

- a. Solução 10X:
80 g de NaCl (cloreto de sódio)
11,5 g de Na₂PO₄ (fosfato ...)
2,0 g de KCl (cloreto de potássio)
2,0 g de KH₂PO₄ (fosfato monopotássico)

Quantidade suficiente de água destilada ou Milli-Q[®] para 1,0 L.
Verificar pH (7,2 – 7,4).

- b. Solução 1X:
10mL de PBS 10X+ 90mL de água destilada.

*Não utilizar o PBS 10X se este estiver cristalizado. Caso isso ocorra, deixar chegar a temperatura ambiente, homogeneizar no agitador magnético e checar o pH (deve ser de 7,2-7,4) até que a solução esteja homogênea.

*Após autoclavar o PBS 1X, deixa-lo esfriar totalmente.

3. Preparar o Homogenato

- a. Retirar as amostras do pulmão do *freezer* e deixar no gelo.
- b. Pipetar 1 mL do inibidor em *eppendorfs* de 2mL (manter no gelo).
- c. Secar bem o pulmão em papel filtro. Só utilizar quando o mesmo não umedecer o papel.
- d. Pesar 50 mg do pulmão e colocar em 1mL do inibidor de protease. Manter o *eppendorf* no gelo durante o uso do homogeneizador, para não esquentar.
- e. Limpar o homogeneizador antes do uso:
- Separar 3 *falcons* de 50 mL: no 1º e no 3º, adicionar água destilada; no 2º, álcool 70 %

- Proceder limpando o homogeneizador sempre na seguinte ordem: água destilada, álcool, água destilada.
- Secar o homogeneizador com lenço de papel.
- f. Colocar o *eppendorf* pulmão + protease (inserido com gelo) no homogeneizador devagar para que o líquido não vaze. Proceder até que este esteja totalmente diluído.
- g. Limpar o homogeneizador como descrito antes do processamento de cada amostra.
- h. Colocar as amostras já homogeneizadas na centrífuga (1900 rpm – 10 minutos – 4 °C).
- i. Coletar o sobrenadante e acondicionar em novos *eppendorfs* (1,5mL).
- j. Manter no *freezer* a -80 °C (Dica: para garantir que o processo descongelamento-congelamento não deteriore as amostras, fazer alíquotas de cerca de 200 µL/*eppendorf*).