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

LEANDRA DA SILVA ZANETTI

**Avaliação do uso do extrato da planta medicinal brasileira *Uncaria guianensis* no
tratamento de asma em um modelo animal**

Ribeirão Preto

2017

LEANDRA DA SILVA ZANETTI

Avaliação do uso do extrato da planta medicinal brasileira *Uncaria guianensis* no tratamento de 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

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.

Zanetti, Leandra da Silva

Avaliação do uso do extrato da planta medicinal brasileira *Uncaria guianensis* no tratamento de asma em um modelo animal, 2017.

86 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Carmona, Fabio.

1. Asma. 2. Fitoterápicos. 3. Inflamação. 4. Rubiaceae.

FOLHA DE APROVAÇÃO

LEANDRA DA SILVA ZANETTI

Avaliação do uso do extrato da planta medicinal brasileira *Uncaria guianensis* no tratamento de 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.

Aprovado em: _____/_____/_____

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

À minha amada mãe, que diariamente me ensina o verdadeiro sentido da palavra amor, o meu agradecimento eterno.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro e maior agradecimento, à Deus, pois sem ele nada seria possível.

À minha mãe, a pessoa mais forte, guerreira e generosa que existe em minha vida; este trabalho foi feito para você e por você.

À minha família, obrigada a todos pelo apoio e incentivo, e por entenderem as minhas inúmeras ausências.

Ao meu orientador, o professor Fabio Carmona, por ter me permitido o ingresso nesse mundo novo da pesquisa. Obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos, dedicação, comprometimento, humildade, generosidade e confiança em meu trabalho. Quando a insegurança chegava, e sentia que não era capaz, você sempre me encorajou e acreditou em minha capacidade, e hoje, estamos aqui, juntos, com a sensação de dever cumprido, e cientes de que fizemos o nosso melhor. À você, professor Fabio Carmona, o meu sincero e eterno muito obrigada!

Ao meu co-orientador, professor Marcos de Carvalho Borges, que sempre esteve comigo, me guiando, me orientando, me ajudando e incentivando ao longo dessa caminhada. Obrigada por todos os ensinamentos (de profissionalismo, acadêmicos, técnicos, de postura, ética, humildade, paciência, generosidade...). Este trabalho com certeza é o resultado também de todo seu empenho, comprometimento e dedicação. Muito obrigada, hoje e sempre!

À professora Ana Maria e ao Laboratório de Biotecnologia da Unaerp, por todo apoio, suporte, dedicação e carinho.

Aos meus amigos, que não são muitos, mas com certeza, são verdadeiros. Vocês fizeram parte dessa jornada, sempre me motivando com palavras de incentivo e força; me encorajando quando o cansaço chegava, exaltando minha capacidade quando a insegurança surgia, me

ouvindo quando precisava desabafar e entendendo a minha ausência. Vocês são especiais, obrigada por fazerem parte da minha vida!

À minha amiga especial, Andiamira, um outro presente que a pós-graduação me proporcionou. Obrigada por toda ajuda, desde o início, pela disponibilidade em tempo integral, por praticar a palavra “compartilhar”. Começamos essa caminhada juntas, e espero que possamos perpetuar nossa amizade!

À minha amiga e colega de profissão, Luciane Pompolo, que com sua generosidade e flexibilidade nas minhas escalas de trabalho, permitiu a realização desse sonho.

A todos os meus colegas e amigos do Laboratório de Fisiopatologia Pulmonar. Obrigada por fazerem parte dessa minha jornada, que se tornou nossa. Com a ajuda e dedicação de todos vocês, o meu sonho se tornou realidade! Levarei todos em meu coração, sou e serei eternamente grata à toda equipe!

Aos animais, que cederam suas vidas para que o nosso trabalho fosse feito.

Agradeço à Ceci e ao Renato, que sempre disponível, me ajudaram com seu conhecimento e experiência, para que esse projeto se tornasse realidade.

A todos os funcionários da USP, que de uma maneira ou de outra, em algum momento dessa jornada, cedeu um tempo do seu dia, um material de laboratório, um pouco de seu conhecimento; permitindo assim, a realização dessa pesquisa.

Agradeço à FAPESP e ao CNPq, pelo apoio e incentivo na pesquisa.

Enfim, obrigada a todos que participaram direta ou indiretamente para que o meu sonho se tornasse realidade. O trabalho levará meu nome, mas em cada página desse sonho, o nome e a lembrança de cada um de vocês estará impressa nas folhas de minha memória e de meu coração. Obrigada por tudo!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

ZANETTI, L.S. **Avaliação do uso do extrato da planta medicinal brasileira *U. guianensis* no tratamento de asma em um modelo animal.** 2017. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Ribeirão Preto, 2017.

A asma é uma doença inflamatória crônica com alta prevalência e caracterizada por hiper-responsividade da via aérea, inflamação, e remodelamento brônquico, e é responsável por considerável morbimortalidade em todo mundo. Os tratamentos disponíveis para a asma podem apresentar diferentes respostas e vários efeitos colaterais. Por isso, o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da asma é muito importante. A *Uncaria guianensis* (Aubl.) J. F. Gmel. (“unha de gato”, Rubiaceae) (UG), é uma planta encontrada principalmente na Amazônia e na América Central, e apresenta atividade anti-inflamatória e antioxidante. Até o momento, não há relato de estudos da *U. guianensis* no tratamento da asma. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração de dois extratos das folhas da *U. guianensis* no tratamento da asma em um modelo animal, e os mecanismos envolvidos. Camundongos Balb/c foram sensibilizados duas vezes com ovalbumina (OVA) por via interperitoneal (ip) com uma semana de intervalo entre as sensibilizações, após uma semana, os camundongos foram desafiados com OVA via intranasal por três dias consecutivos e tratados com os extratos aquoso ou hidroetanólico da *U. guianensis* (100 mg/kg) via intraperitoneal por três dias consecutivos, durante os desafios com OVA. Os camundongos controles receberam solução salina nos mesmos dias. Após a sensibilização e desafios, os animais foram ventilados e medidas *in vivo* da hiper-responsividade brônquica foram realizadas com a administração de aerossóis com concentrações crescentes de metacolina. Após, o lavado broncoalveolar (LBA) foi coletado para contagem de células totais e diferenciais. Sangue foi colhido para dosagem de IgE específica para OVA e os pulmões foram retirados para quantificação de citocinas inflamatórias no homogenato, além de determinação da capacidade

antioxidante total e análise histológica. A administração do extrato hidroetanólico diminuiu significativamente o número de células totais e diferenciais no LBA e a hiper-responsividade brônquica, quando comparados ao grupo que não recebeu o tratamento. O extrato aquoso não foi capaz de diminuir a contagem de células totais e diferenciais e mostrou uma pequena diminuição na hiper-reatividade brônquica. Tanto o extrato aquoso quanto o hidroetanólico diminuíram as concentrações de interleucina (IL)-13 no homogenato pulmonar, mas não foram capazes de diminuir os níveis de IgE no soro, o número de células inflamatórias no tecido pulmonar, nem foram capazes de aumentar a capacidade antioxidante total. Com isso, concluímos que a administração dos dois extratos (aquoso e hidroetanólico) das folhas da espécie *U. guianensis* foi efetiva no tratamento da asma em um modelo animal, tanto em termos de mecânica pulmonar quanto em marcadores inflamatórios, com superioridade terapêutica do extrato hidroetanólico.

Palavras-chave: Asma. Fitoterápicos. Inflamação. Rubiaceae.

ABSTRACT

ZANETTI, L.S. **Evaluation of the use of extract from the Brazilian medicinal plant *Uncaria guianensis* 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.

Asthma is a highly prevalent chronic inflammatory disease characterized by airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling, with considerable morbidity and mortality worldwide. Available asthma treatments can elicit different responses and numerous side effects. Therefore, the development of new drugs for asthma treatment is highly desirable. *Uncaria guianensis* (Aubl.) J. F. Gmel. ("cat's claw", Rubiaceae) (UG), a plant found mainly in the Amazon and the Central America, has anti-inflammatory and antioxidant activities. To date, there is no study of *U. guianensis* in the treatment of asthma. The aim of the study was to evaluate the effects of the administration of two extracts from leaves of *U. guianensis* in the treatment of asthma in an animal model and the mechanisms involved. Balb/c mice were sensitized twice with ovalbumin (OVA) intraperitoneally (ip) one week apart. After one week, mice were challenged with intranasal OVA for three consecutive days and treated with either aqueous or hydroethanolic extract of *U. guianensis* (100 mg/kg) ip for three consecutive days, during OVA challenges. Control mice received saline solution on the same days. After sensitization and challenge, the animals were ventilated and *in vivo* measurement of bronchial hyperresponsiveness was performed with increasing concentrations of aerosolized methacholine. After, bronchoalveolar lavage (BAL) was collected for total and differential cell count. The blood was collected to measure OVA specific IgE, and the lungs were removed for measurement of cytokine levels and total antioxidant capacity in the pulmonary homogenate, and for histological analysis. The hydroethanolic extract

administration significantly reduced total and differential cells number and bronchial hyperresponsiveness, compared to the group that received no treatment. The aqueous extract did not decrease the total and differential cell count and showed a small decrease in bronchial hyperresponsiveness. Both extracts decreased interleukin (IL)-13 levels in the pulmonary homogenate, but did not decrease serum IgE levels nor the number of inflammatory cells in lung tissue, nor were they able to increase total antioxidant capacity. We concluded that the administration of two extracts (aqueous and hydroethanolic) from leaves of *U. guianensis* was effective in the treatment of asthma in animal models, both in pulmonary mechanics and in inflammatory markers, with therapeutic superiority of the hydroethanolic extract.

Keywords: Asthma. Herbal medicine. Inflammation. Rubiaceae.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Transições de íons, configurações do instrumento e tempos de retenção para cada composto quantificado.....	30
Tabela 2 – Transição de íon, configurações do instrumento e tempo de retenção para quantificação de mitrafilina.	31
Tabela 3 – Escore para quantificação da inflamação no tecido pulmonar.	37
Tabela 4 – Quantificação dos componentes isolados a partir dos extratos aquoso e hidroetanólico da <i>U. guianensis</i>	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resumo da fisiopatologia da asma.	20
Figura 2 – Protocolo de sensibilização e desafio dos camundongos com ovalbumina	33
Figura 3 - Contagem de células totais e diferenciais no LBA com a administração do extrato aquoso na dose de 100 mg/kg.....	40
Figura 4 - Contagem de células totais e diferenciais no LBA com a administração do extrato hidroetanólico na dose de 100 mg/kg.....	41
Figura 5 – Avaliação da hiper-responsividade brônquica com a administração do extrato aquoso da <i>U. guianensis</i> na dose de 100 mg/kg.....	42
Figura 6 - Avaliação da hiper-responsividade brônquica com a administração do extrato hidroetanólico da <i>U. guianensis</i> na dose de 100 mg/kg	44
Figura 7 - Níveis de citocinas no homogenato pulmonar.....	46
Figura 8 – Níveis de IgE específica para OVA no soro	47
Figura 9 . Dosagem da capacidade antioxidante total (CAT) no tecido pulmonar	48
Figura 10 – Quantificação das células inflamatórias no tecido pulmonar.....	49

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	14
SUMÁRIO	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Definição e Epidemiologia da Asma	17
1.2 Fisiopatologia da Asma	18
1.3 Tratamento da asma.....	20
1.4 Fitoterápicos	22
1.5 <i>Uncaria guianensis</i>	24
1.6 Hipótese.....	26
1.7 Relevância do Estudo	26
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivos específicos.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Desenho do estudo.....	28
3.2 Material.....	28
3.3 Análise dos constituintes químicos dos extratos aquoso e hidroetanólico da <i>U. guianensis</i>	29
3.4 Quantificação do extrato aquoso e hidroetanólico de <i>U. guianensis</i> por HPLC-MS-MS.....	30
3.5 Quantificação dos extrato brutos hidroetanólico e aquoso de <i>U. guianensis</i> por UPLC-MS / MS.....	31
3.6 Controle de qualidade.....	32
3.7 Delineamento do estudo	32
3.8 Medida dos parâmetros <i>in vivo</i> da função pulmonar	34
3.9 Coleta do lavado broncoalveolar, sangue e pulmões.....	35
3.10 Contagem total e diferencial de células no LBA.....	35
3.11 Dosagem de citocinas inflamatórias no homogenato pulmonar	36
3.12 Dosagem sérica de anticorpos (IgE) específicos para ovalbumina	36
3.13 Análise histológica do pulmão	36
3.14 Análise capacidade antioxidante total (CAT).....	37
3.15 Análise dos resultados	38

4	RESULTADOS	39
4.1	Identificação e quantificação dos componentes isolados a partir dos extratos aquoso e hidroetanólico de <i>U. guianensis</i>	39
4.2	Contagem de células totais e diferenciais.....	39
4.3	Medida dos parâmetros <i>in vivo</i> da função pulmonar	41
4.4	Dosagem de citocinas inflamatórias no homogenato pulmonar.....	45
4.5	Níveis de IgE específica para ovalbumina com administração do extrato aquoso e hidroetanólico da <i>U. guianensis</i>	47
4.6	Análise da capacidade antioxidante no homogenato pulmonar com administração dos extratos aquoso e hidroetanólico da <i>U. guianensis</i>	47
4.7	Quantificação das células inflamatórias no tecido pulmonar com a administração do extrato aquoso e hidroetanólico da <i>U. guianensis</i>	48
5	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÃO.....	64
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
	ANEXOS	77
	APÊNDICES	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição e Epidemiologia da Asma

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

Considerada uma das doenças crônicas mais comuns, a asma acomete crianças e adultos em todos os países, independentemente do nível de desenvolvimento (3). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), há cerca de 300 milhões de pessoas no mundo que sofrem com asma e estimam-se 250 mil mortes por ano decorrentes dessa doença (4).

Estudos mostram que a asma afeta de 5 a 16% da população mundial (5), e sua prevalência aumentou acentuadamente em todo mundo na segunda metade do século, mas parece ter atingido um platô depois disso, especialmente em países com alta prevalência de asma, como é o caso da Inglaterra; no entanto, os EUA são exceção, onde houve um aumento na prevalência da asma de 7,3% para 8,4% entre 2001 e 2010, e continua a afetar principalmente as crianças e a população mais carente (6). Dados indicam que 11,6% das crianças entre 6 e 7 anos de idade em todo mundo relatam sintomas relacionados à asma (7). Em 2010, somente nos Estados Unidos, houve uma estimativa de que 18,7 milhões de adultos e 7 milhões de crianças sofriam com a asma (5).

A prevalência da doença no Brasil gira em torno de 19 a 24,3% (8). Somente em 2014, de Janeiro a Novembro, foram 105,5 mil internações pela doença, gerando um custo de R\$ 57,2 milhões para a rede pública de saúde, segundo dados do SIH (Sistema de Informações Hospitalares) (9).

Populações específicas de pacientes com asma apresentam maior morbidade e mortalidade. Nos EUA, as mortes ocasionadas pela doença são 30% mais frequentes em mulheres do que em homens, 75% mais frequentes em afro-americanos do que em pessoas brancas, e sete vezes mais frequentes em pessoas acima de 65 anos do que em crianças (5). Outro dado importante, é de que pacientes com asma severa ou de difícil controle (que representam de 5 a 10% dos pacientes asmáticos) apresentam índices maiores de morbidade do que a população com asma em geral (10).

O tratamento e o manejo da asma têm impacto direto na vida financeira das pessoas que sofrem com a doença. Pesquisa realizada mostrou que o custo direto da asma (utilização

de serviços de saúde e medicações) foi o dobro entre pacientes com asma não controlada comparados com aqueles com asma controlada. No entanto, o gasto direto relacionado às medicações foi maior entre os portadores de asma controlada, sendo que 82,2% desses utilizavam corticosteroides inalatórios regularmente (2). Além disso, a asma também ocasiona absenteísmo escolar, perda de dias de trabalho, impactando de forma incisiva na qualidade de vida, assim como no desenvolvimento físico, intelectual e emocional (11).

1.2 Fisiopatologia da Asma

Para muitos pacientes que sofrem com a asma, a doença tem sua origem na infância, e tanto os fatores genéticos (atopia) como os fatores ambientais (vírus, alérgenos e exposição ocupacional) têm papel importante tanto no desenvolvimento como na evolução da doença (12).

A inflamação das vias aéreas é tida como um dos mecanismos fisiopatológicos mais importantes no desenvolvimento da asma. Várias células inflamatórias encontram-se envolvidas neste processo, entre elas destacam-se: os mastócitos, eosinófilos, linfócitos T, células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, além de células brônquicas epiteliais, como as células epiteliais, as musculares lisas, endoteliais, fibroblastos, miofibroblastos e nervos (2). Entre essas células, destaca-se a importância da associação entre a asma e os eosinófilos, onde pessoas asmáticas apresentam número elevado dessa célula inflamatória no sangue, no escarro e no lavado broncoaveolar (LAB). Além disto, estudos histológicos de pessoas que morreram devido à doença mostraram, na submucosa brônquica, um número também elevado de eosinófilos (13).

A asma tem sido considerada não somente uma doença inflamatória com aumento da responsividade brônquica, mas também uma doença caracterizada pela presença de alterações estruturais nas paredes das vias aéreas, conhecidas como remodelamento brônquico. O remodelamento apresenta como característica o espessamento da lâmina basal subepitelial, aumento no número de miofibroblastos, hiperplasia e hipertrofia de músculo liso, aumento de glândulas mucosas, aumento da área vascular e alteração da deposição e composição das proteínas e proteoglicanas da matriz extracelular (14).

Um outro componente importante no processo da instalação da asma é o epitélio da via aérea, que juntamente com as células dendríticas e os macrófagos respondem a fatores externos ambientais, como alérgenos e poluentes, e a agentes infecciosos, como os vírus. Esta resposta inicial leva à transmissão de sinais para outras células como as células T e B e os

mastócitos, com ativação de células estruturais da via aérea, como as células musculares lisas, células caliciformes e fibroblastos (15). As citocinas, por sua vez, também são importantes na promoção da inflamação crônica da via aérea e no remodelamento (16,17), pelas suas ações nas células inflamatórias e estruturais e por afetarem e promoverem interações células a células (18,19). As células Th2 e células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2s) são agora reconhecidas por terem um papel importante na asma alérgica eosinofílica. Elas produzem interleucinas 4, 5 e 13 (IL-4, IL-5 e IL-13) que, por sua vez, levam ao aumento da produção de IgE e inflamação eosinofílica, ao passo que as citocinas imunes inatas como as interleucinas 1, 25 e 33 (IL-1, IL-25 e IL-33) e a linfoproteína estromal tímica (TSLP) liberadas das células epiteliais da via aérea podem ativar células Th2 ou ILC2s, ou ambas (16).

Ao longo das últimas décadas, muito se tem estudado sobre a fisiopatologia da asma, e estudos descrevem a importância e a forte associação das células Th2 e da IgE no desenvolvimento da doença (6). Com isso, diferentes subtipos de células Th têm sido identificadas, assim como as citocinas que elas produzem. A produção de células Th1 é promovida principalmente por IL-12, e a diferenciação em células Th2 ocorre na presença de IL-4; por sua vez, as células Th1 produzem Interferon-gama (IFN- γ), ao passo que as células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-13. Daí a asma ser associada a uma resposta Th2, já que as citocinas liberadas pelas mesmas são as responsáveis pela maioria das características da doença (20). Desta forma, uma das possíveis explicações para a patogênese da asma é o desequilíbrio da resposta imune Th1/Th2, com um desvio para a resposta do tipo Th2. A presença de linfócitos T CD4+, do subtipo Th2 ativado, e de suas citocinas e quimiocinas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-16), induzem um padrão de resposta típico Th2, ocasionando, como dito anteriormente, a ativação de células B, produção de IgE, supressão de células Th1, crescimento e diferenciação de eosinófilos e aumento na atividade de mastócitos (21). Esse desequilíbrio altera a homeostase do organismo levando a um quadro alérgico, como a asma.

Abaixo, na **Figura 1**, temos um esquema da fisiopatologia da asma.

formoterol e salmeterol), que devem ser usados juntamente com os corticosteroides inalatórios (23). Os antagonistas de leucotrienos (como o montelukast) também são efetivos para o tratamento da asma, sozinho ou combinado com outras terapias de controle, especialmente em pacientes com doença alérgica ou sintomas asmáticos relacionados aos exercícios (24). Como uma outra opção ao tratamento, temos também os antagonistas muscarínicos de longa ação, que atuam através da broncodilatação, mostrando uma eficácia modesta como adjunto à terapia com corticosteroides e β agonistas de longa ação (25,26). Já o omalizumab, um anticorpo monoclonal anti-IgE, é atualmente recomendado para uso no tratamento à asma grave refratária em pacientes atópicos, com base em dados de vários estudos controlados e randomizados (22); no entanto, seu uso é limitado devido o alto custo desse medicamento (27). E finalmente, temos a termoplastia brônquica, um procedimento realizado através de um endoscópio, disponível em centros especializados, que utiliza a energia térmica para “romper” a musculatura lisa brônquica (28).

A terapia “padrão” para a asma é eficaz e controla os sintomas da doença na maioria dos casos, mas não em todos. Estima-se que 90-95% dos pacientes atingem o controle preconizado por meio de cessação do tabagismo, prescrição adequada dos medicamentos, otimização da disponibilidade de medicamentos (produção de medicamentos genéricos), além da adesão e técnica de administração. Como dito anteriormente, a prevalência da asma está aumentando, e até o momento, não existe uma estratégia preventiva efetiva ou uma cura conhecida; os efeitos dos corticosteroides inalatórios em asma desaparecem rapidamente quando a droga é interrompida; e os medicamentos não revertem ou retardam a maior parte do remodelamento brônquico (4).

Outro ponto importante a ser ressaltado no que diz respeito ao tratamento e controle da asma são os efeitos adversos advindos do uso dos corticosteroides, que apesar de serem geralmente seguros e eficazes, seu uso prolongado, especialmente em altas doses, podem levar a efeitos colaterais como: osteoporose, supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, susceptibilidade aumentada à infecções, infecções frequentes do trato respiratório superior em crianças, faringites, desenvolvimento de catarata em idosos e mudanças de humor, tornando-se urgente a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento da asma (29).

1.4 Fitoterápicos

A utilização de plantas para prevenção, tratamento e cura de doenças confunde-se com o próprio surgimento da humanidade (30). Os registros mais antigos do uso de plantas datam da era paleolítica, e este uso é extensamente difundido em diversos países como, por exemplo, China, Índia, Alemanha e Estados Unidos (31,32). Sua principal vantagem em relação à terapia convencional é o sinergismo do fitocomplexo, onde a atividade biológica da planta medicinal pode ser o resultado da ação de vários dos seus compostos químicos, sendo essa ação, ocasionalmente, muito maior do que aquela do composto isolado (33).

A utilização de medicamentos fitoterápicos vem sendo estimulada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1978 (Declaração de Alma-Ata). Em 22 de Junho de 2006 ocorreu a aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos através do Decreto nº 5.813, e da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, contemplando o tratamento com Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Sistema Único de Saúde – SUS, conforme disposto na Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006, do Ministério da Saúde, criando e legalizando dessa maneira, um incentivo à pesquisa e ao uso de fitomedicamentos no mercado interno sem precedentes na história do país (34).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define os fitoterápicos como sendo medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais, obtidos empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco e outros). A eficácia e a segurança dos fitoterápicos devem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em bibliografia e/ou publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos (35–37). O Ministério da Saúde dispensa o registro de produtos cujas fórmulas estejam inscritas na Farmacopeia Brasileira, no códex ou nos formulários aceitos pelo Ministério da Saúde (Alemã, Americana, Argentina, Britânica, Europeia, Francesa e Internacional [OMS]) (38,39), ou ainda aqueles constantes na Lista de Registro Simplificado do Ministério da Saúde (40).

Dentre as terapias existentes para a asma, os medicamentos fitoterápicos podem assumir grande importância como medidas alternativas ou adjuvantes (41). É importante ressaltar que muitos medicamentos utilizados para tratar a asma, como β_2 -agonistas, anticolinérgicos, metilxantinas e cromona foram desenvolvidos a partir de fontes de plantas medicinais (42).

Inúmeros estudos e experimentos em laboratórios têm mostrado a variedade de efeitos farmacológicos dos extratos de plantas. Entre esses efeitos, temos: atividade anti-inflamatória, vasodilatadora, antimicrobiana, anticonvulsivante, sedativa e antipirética (43). Estima-se que cerca de 80% da população mundial faça uso de plantas ou de suas preparações na atenção primária à saúde.

Atualmente, o número de espécies vegetais investigadas assim como seus efeitos terapêuticos vêm ganhando um grande impulso em função do elevado custo de desenvolvimento de novas drogas sintéticas, que ultrapassam a cifra de 800 milhões de dólares (44), dos efeitos colaterais de medicamentos sintéticos e do aprofundamento de estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com espécies vegetais, os quais têm confirmado os efeitos terapêuticos divulgados por pesquisas etnofarmacológicas.

Dados mostram que nos Estados Unidos, aproximadamente 26% das crianças usam atualmente a medicina alternativa e complementar (CAM) para tratar a asma, especialmente crianças com um controle não adequado da doença e com dificuldades ao acesso a tratamentos convencionais (45). Até 80% dos adolescentes (46) e cerca de 40% dos adultos (47) com asma atualmente, utilizam a CAM para o manejo e tratamento da doença. No Reino Unido, 60% das pessoas que sofrem com asma moderada e 70% das que sofrem com a asma grave utilizam a CAM (48).

Diante desse quadro, é notório o espaço e atenção que os medicamentos fitoterápicos vêm ganhando nas últimas décadas, com inúmeros estudos sendo publicados sobre os mais variados extratos vegetais e suas propriedades anti-inflamatórias e broncodilatadoras (49). Um estudo americano realizado sobre o uso da CAM para o tratamento da asma e da sinusite mostrou que 42% da população estudada usou alguma forma de CAM nos últimos 12 meses, sendo o uso de fitoterápicos a forma de tratamento alternativo ou complementar mais utilizada (50), o que reforça a importância do estudo e de um conhecimento mais profundo acerca desses compostos.

No Brasil, atualmente, a ANVISA regulamentou o uso de algumas espécies vegetais como anti-inflamatórias (35,36,51) e outras como broncodilatadoras (35,36,51). No entanto, ainda existem várias outras espécies em potencial que necessitam de investigação quanto a sua eficácia no tratamento da asma.

1.5 *Uncaria guianensis*

Os países em desenvolvimento, onde localizam-se as maiores florestas tropicais, como é o caso do Brasil, são as maiores fontes de biodiversidade existentes, e possuem aproximadamente um terço de toda a flora mundial. No entanto, países desenvolvidos como EUA, Japão e alguns da Europa são os responsáveis pela obtenção do lucro advindo da comercialização dos produtos naturais oriundos dessas florestas (52). Estima-se que metade das 500.000 espécies de plantas existentes em todo o mundo encontra-se nas florestas tropicais; e dessas 500.000 espécies, menos de 1% delas foram pesquisadas para avaliação de suas atividades farmacológicas (53).

As espécies do gênero *Uncaria* são encontradas nas florestas tropicais, principalmente na Amazônia, e estão entre as plantas com maior potencial econômico e terapêutico. Entre os especialistas, não existe ainda um consenso em relação ao número de espécies que compõem o gênero *Uncaria*; mas acredita-se, de acordo com pesquisadores da área, que existam entre 50 e 60 espécies. A *Uncaria guianensis* foi a primeira espécie do gênero *Uncaria*, descrita em 1775 por Aublet e recebeu o nome de *Orouparia guianensis*; somente 20 anos depois, é que sua nomenclatura mudou para *U. guianensis* (54).

O gênero *Uncaria* pertence à família Rubiaceae, sendo as duas espécies mais comuns a *Uncaria guianensis* e a *Uncaria tomentosa*. São encontradas principalmente em regiões tropicais, como o Sudeste Asiático, África e América do Sul e seu uso tem se tornado bastante difundido devido às ações comprovadamente anti-inflamatórias e imuno-estimulatórias, além de atividades anticancerígena e antioxidante. As partes mais utilizadas dessas plantas são as suas cascas, raízes e folhas, na forma de chá; e são utilizadas na medicina popular no tratamento de doenças como o reumatismo, artrite, distúrbios gastrointestinais, infecções, feridas, asma e hipertensão. Entre os componentes identificados e já isolados do gênero *Uncaria* estão os alcaloides, triterpenos, flavonoides, fenilpropanoides, entre outros (55,56); sendo os alcaloides, o grupo de metabólitos secundários mais importante presentes nas plantas do gênero *Uncaria* (54).

No Brasil, a *U. guianensis* é encontrada nos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins; ao passo que, a *U. tomentosa* é encontrada principalmente nos estados do Acre, Amapá, Amazonas e Pará (57). Como podemos observar, a *U. guianensis* pode ser encontrada e cultivada com muito mais facilidade do que a *U. tomentosa*. A *U. guianensis* cresce nas florestas, margens de rios e rodovias;

sendo considerada uma espécie invasora de áreas de pastagem abandonadas (54).

A *U. guianensis* é conhecida popularmente como “unha de gato”, e isso se deve ao formato curvo dos espinhos que a planta apresenta, que lembram muito a unha de um gato (58). Já existem nos EUA produtos contendo *U. tomentosa* sendo utilizados comercialmente, sob regulamentação local, como suplemento dietético (59), e nos últimos 20 anos, a “unha de gato” (“cat’s claw”) em diferentes formulações tem sido introduzida na Europa para o tratamento de pacientes com câncer e algumas doenças virais (60).

Infelizmente, tanto a *U. guianensis* quanto a *U. tomentosa* são exploradas de forma extrativista, não tendo sido encontrados até o momento, relatos de manejo sustentável, nem tampouco estratégias de conservação ou plantios em larga escala que sejam capazes de atender de maneira contínua a demanda mundial e crescente da indústria farmacêutica. Juntando-se a esses fatores, ainda existe o fato de que não há quantidade suficiente dessa planta para abastecer o programa nacional do Ministério da Saúde, que pretende disponibilizar fitoterápicos produzidos a partir de *Uncaria* a todos os municípios brasileiros (54), o que torna a questão preocupante e urgente.

Embora a atividade anti-inflamatória da *U. guianensis* tenha sido bem menos estudada do que a *U. tomentosa*, resultados *in vitro* mostraram que a *U. guianensis* inibiu a produção da quimiocina CXCL8 e de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos, a síntese de IL-5 induzida por ovalbumina (OVA) em células esplênicas previamente sensibilizadas, e em um modelo animal, inibiu o edema da pata de rato induzido por zymosan, assim como o número de leucócitos e neutrófilos no exsudato pleural (61).

Até o momento, não temos conhecimento de nenhum estudo onde a *U. guianensis* tenha sido utilizada para avaliação de sua eficácia no tratamento da asma.

Sendo assim, os medicamentos fitoterápicos surgem como uma alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias, como a asma, uma vez que, nem todos os pacientes alcançam o controle desejado da doença, além de sofrerem com os efeitos colaterais indesejáveis ocasionados pelos medicamentos disponíveis atualmente no mercado. No entanto, para que isso aconteça, a realização de novos estudos torna-se necessária.

1.6 Hipótese

Extratos da espécie *U. guianensis* apresentam atividade anti-inflamatória e reduzem a inflamação e a hiper-responsividade brônquica em modelo experimental de asma.

1.7 Relevância do Estudo

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

2 OBJETIVOS

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

2.1 Objetivos específicos

Foram avaliados, em resposta ao tratamento, como objetivos específicos:

- Alterações celulares (contagem celular total e diferencial) no lavado broncoalveolar;
- Dosagem sérica de anticorpos IgE específica para ovalbumina;
- Alterações na responsividade brônquica;
- Produção de citocinas por células do tipo Th1 e Th2 no homogenato pulmonar;
- Capacidade antioxidante;
- Quantificação da inflamação pulmonar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

O estudo foi dividido em duas etapas:

1. Verificação da atividade terapêutica: os extratos (aquoso e hidroetanólico) foram testados na dose de 100 mg/kg;
2. Verificação das alterações celulares, citocinas e hiperresponsividade brônquica.

3.2 Material

3.2.1 Camundongos

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

3.2.2 Obtenção e preparo da droga vegetal

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

A planta foi coletada às 9 horas da manhã, e uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). As folhas foram as partes utilizadas da planta.

A planta foi lavada e o excesso de água foi removido com folhas de papel. A seguir, a planta foi seca em estufa de ar circulante a 45 °C por 24 horas. Depois, foram trituradas em moinho de facas até a granulometria de 40 mesh. O pó resultante é chamado de droga vegetal.

3.2.3 Extratos

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

1. Extrato aquoso: em 1 L de água fervente foram adicionados 100 g de droga vegetal, deixando em infusão (folhas) por 1 hora. A seguir, o extrato foi filtrado em papel de filtro e em seguida, liofilizado.

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

3.3 Análise dos constituintes químicos dos extratos aquoso e hidroetanólico da *U. guianensis*

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

Já os alcaloides mitrafilina e isomitrafilina presentes nos extratos hidroetanólico e aquoso de folha de *U. guianensis* foram analisados 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 Ionização Química de Pressão Atmosférica (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 0,2% de acetato de amônio (solvente A) e acetonitrila (solvente B) em um fluxo

de 0,6 mL.min⁻¹. O programa de gradiente de eluição começou com 35% de B e manteve nessa porcentagem até 18 min., posteriormente B foi elevada para 50% por 14 min., manteve-se em 50% de B durante 3 min., no final a condição de análise retornou para 35% de B, nos últimos 5 min. da análise. Os parâmetros de origem e de funcionamento foram otimizadas como se segue: voltagem de corona = 3,2 kV, temperatura da fonte = 150 °C, temperatura de dessolvatação (N2) = 350 °C, fluxo de gás de dessolvatação = 600 L.h⁻¹, e a gama de massa de m / Z 100 e 600 no modo de varrimento total (Full-scan).

3.4 Quantificação do extrato aquoso e hidroetanólico de *U. guianensis* por HPLC-MS-MS

Os experimentos para quantificação de ácido quínico (1) e ácido clorogênico (2) foram realizados por meio de HPLC-MS / MS no modo reação múltipla de monitorização (MRM), com os extratos aquoso e hidroetanólico de *U. guianensis*. O ácido quínico (catálogo n° 46944-U, Supelco) foi adquirido da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil); o ácido clorogênico (catálogo n° 00.500.590, HWI Analytik GmbH) foi adquirido da Pharma Solutions. As soluções padrão foram preparadas pela diluição da solução estoque (1,0 mg/mL) dos compostos-alvo nas seguintes concentrações: 5, 10, 50, 250, 1.250, 2.500 e 5.000 ng/mL para 1 e 2.

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

Composto	Precursor íon (m/z)	Produto íon (m/z)	DP ^a (V)	CE ^b (eV)	RT ^c (min)
1	191.1	85.2	40	25	1.92
2	353.2	191.3	40	25	2.11

^a DP = Potencial de descompactação

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

^c RT = Tempo de retenção

3.5 Quantificação dos extrato brutos hidroetanólico e aquoso de *U. guianensis* por UPLC-MS / MS

A quantificação foi realizada em UPLC-MS / MS a partir da solução padrão de mitrafilina, a qual foi preparada por meio de diluições seriadas em metanol nas concentrações de 5, 25, 50, 125, 250, e 500 ng/mL.

A amostra do extrato bruto foi pesada com precisão (1,0 mg) e dissolveu-se em 1,0 mL de metanol, resultando numa concentração de 1,0 mg/mL. Em seguida, esta solução foi filtrada através de um filtro Milipore (0,45 µm) e uma diluição em série em metanol foi realizada, para se obter as concentrações de 10, 1, 0,1 e 0,01 µg/mL. Dez microlitros da solução de extrato bruto foi injetada numa coluna Ascentis expresso C18 (100 x 4,6 mm I.D. ; 2,7 µm de tamanho de partícula) de SUPELCO analítica. A fase móvel utilizada consistiu de um gradiente de eluição de ácido fórmico a 0,1% como sistema A e acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico como o sistema B. O fluxo foi 0,5 mL/min e o programa de gradiente de eluição começou com 30% de B, posteriormente B foi elevado à 90% em 3 minutos, a seguir, manteve-se em 90% de B durante 2 minutos, e depois retornou para a condição inicial de 30% nos últimos 5 min da análise. Foram realizadas injeções em triplicatas. Determinou-se a condição ótima de análise, como mostrado na Tabela 2. A curva de calibração obtida foi usada para quantificação de mitrafilina e a concentração na amostra dos extratos brutos foram expressas em µg/mL. O fator de diluição foi (20, 100, 1.000, 10.000 e 100.000 vezes) da solução estoque na concentração de 1.000 µg/mL. Os dados foram obtidos e processados usando software TargetLynx Aplicação™ Manager (Waters, Corporation).

Tabela 2 – Transição de íon, configurações do instrumento e tempo de retenção para quantificação de mitrafilina.

Substância	Precursor íon (<i>m/z</i>)	Produto íon (<i>m/z</i>)	DP ^a (V)	CE ^b (eV)	RT ^c (min)
Mitrafilina	421.4	201.1	2	26	4.95

^a DP = Potencial de descompactação

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

^c RT = Tempo de retenção

3.6 Controle de qualidade

A droga vegetal e os extratos foram submetidos a controle de qualidade de acordo com a legislação brasileira vigente (33). O controle de qualidade do extrato foi feito no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UNAERP, sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Ana Maria Soares Pereira.

3.6.1 Dose

Os extratos foram administrados aos animais nas doses 100 mg/kg, uma vez ao dia, por via intraperitoneal, nos dias 15, 16 e 17 do protocolo.

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

3.7 Delineamento do estudo

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

3.7.1 Protocolo de sensibilização e desafio

O protocolo de sensibilização e desafio encontra-se abaixo na **Figura 2**, com duração de 18 dias. Os camundongos foram sensibilizados no primeiro e oitavo dias do protocolo (D1 e D8) através de injeção intraperitoneal (i.p.) de 10 µg de ovalbumina (OVA) diluídos em 0,2 mL de solução salina isotônica estéril. Nos dias 15, 16 e 17 os camundongos foram submetidos aos desafios (D15, D16 e D17) com instilação intra-nasal de 10 µg de OVA diluídos em 50 µL de solução salina isotônica estéril, sob leve anestesia, 100 µL de uma solução de ketamina (2 mg/mL) e xilazina (2 mg/mL). O grupo controle foi submetido aos mesmos procedimentos, nos mesmos dias, porém a sensibilização e os desafios foram realizados somente com solução salina isotônica. Os experimentos foram realizados no decimo oitavo dia do protocolo (D18).

Figura 2 – Protocolo de sensibilização e desafio dos camundongos com ovalbumina (OVA).

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

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

3.8 Medida dos parâmetros *in vivo* da função pulmonar

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

Esse ventilador permite a realização de medidas *in vivo* de diversos parâmetros fisiológicos através da técnica de oscilação forçada, com o modelo de compartimento simples e o modelo de impedância complexo. Esses dois modelos permitem a separação das alterações nos diferentes compartimentos pulmonares, como vias aéreas e parênquima. Para isso, antes da coleta dos dados de mecânica respiratória, os pulmões são insuflados até uma pressão de 27 cm H₂O para homogeneização pulmonar. Após, durante a técnica de oscilação forçada, o pistão, controlado por um computador, aplica 13 componentes senoides com frequências primas que vão de 1 a 20,5 Hz, durante um período de 3 s (quick prime-3 perturbation). Regressão linear múltipla foi então utilizada para ajustar os dados no modelo de fase constante do pulmão, descrito por Hantos et al. (62) usando a seguinte equação: $Z_{RS}(f) = R_{aw} + j2\pi fI + (G_{ti} - jH_{ti}) / (2\pi f)^\alpha$, onde Z_{RS} é a impedância do sistema respiratório, R_{aw} é a resistência das vias aéreas, j representa a unidade imaginária, I é a inertância das vias aéreas, G_{ti} reflete a dissipação de energia e está intimamente relacionado com a resistência das vias aéreas periféricas, H_{ti} reflete a energia acumulada no tecido do pulmão e está intimamente relacionado com a elastância tecidual, $\alpha = (2/\pi)\tan^{-1}(H/G)$, e f a frequência respiratória.

A hiper-responsividade brônquica foi mensurada através de medidas da condição basal e após a provocação com a administração de concentrações crescentes de aerossóis com metacolina (6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL), durante 10 segundos cada, através de um nebulizador ultrassônico (*Hudson RCI, Teleflex Medical, Temecula, CA, USA*). Os parâmetros respiratórios foram selecionados das curvas que apresentarem um coeficiente de determinação maior ou igual a 0,85 (COD $\geq$ 0,8). Foram analisados e comparados os

seguintes parâmetros: resistência total (RRS), elastância total (ERS), resistência das vias aéreas centrais (Rn), resistência tecidual (G) e elastância tecidual (H).

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

3.9 Coleta do lavado broncoalveolar, sangue e pulmões

Foram colhidos lavado broncoalveolar (LBA) afim 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 mililitro (mL) de solução salina pela cânula traqueal, obtendo LBA 1 e LBA 2. As duas amostras do LBA foram centrifugadas em uma centrífuga (*Eppendorf* 5804R) a 3000 rpm por 5 minutos com temperatura de 4°C. Os precipitados LBA 1 e LBA 2 foram ressuspensos e colocados em 500 µL de solução salina, para posterior contagem celular.

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

3.10 Contagem total e diferencial de células no LBA

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

3.11 Dosagem de citocinas inflamatórias 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 foram pesados numa balança de precisão e foram adicionados em 1 mL de uma solução contendo inibidor de proteases (Complete EDTA-free, ROCHE). O órgão foi processado utilizando um homogeneizador de tecido (OMNI(TH)-International-Kennesaw, GA, EUA) e após foi centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -70 °C para dosagem de citocinas. No ANEXO B, encontramos um detalhamento maior do protocolo utilizado na preparação do homogenato.

Foram quantificadas as citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ e TGF- β no sobrenadante do homogenato pulmonar pelo método ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences BD OptEIA™, San Diego, CA e eBioscience, San Diego, CA, EUA).

3.12 Dosagem sérica de anticorpos (IgE) específicos para ovalbumina

Brevemente, em cada poço de uma placa de 96 poços foi adsorvido 100 μ L de OVA (10 μ g/mL) e a placa foi incubada em duplicata por 12 horas a 4 °C. Após, os poços foram lavados com PBS contendo 0,05% de Tween 20. As reações inespecíficas foram bloqueadas com a incubação por 1 hora a 37 °C com PBS contendo 10% de soro fetal bovino. Os poços foram lavados e 100 μ L das amostras de soro foram adicionadas. Após 2 horas a 37 °C, os poços foram lavados e 100 μ L dos anticorpos biotinilados foram adicionados. Decorrido 1 hora a 37 °C, os poços foram lavados e 100 μ L de estreptavidina HRP (diluída 1:10.000; BD Bioscience, EUA) foram adicionados e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. Os poços foram então lavados e a reação foi revelada decorrido 30 minutos da incubação com 100 μ L de TMB (BD Bioscience, EUA). A reação foi interrompida com adição de 50 μ L 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.

3.13 Análise histológica do pulmão

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 200 vezes e transferidas para um computador. Para quantificar a inflamação do tecido, delimitamos a área após a membrana da via aérea (membrana basal), identificando a quantidade de células inflamatórias, através de método semiquantitativo, estabelecendo um escore de inflamação (63), de acordo com a **Tabela 3**.

Tabela 3 – Escore para quantificação da inflamação no tecido pulmonar.

Escore	Células inflamatórias
0	Ausência células inflamatórias
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

A contagem de células inflamatórias foi realizada pela autora do estudo, e por mais 2 colaboradores de maneira duplo-cego.

3.14 Análise capacidade antioxidante total (CAT)

A CAT foi avaliada a partir do método descrito por Ozcan Erel (64) em que foi analisado a oxidação de 2,2V-azinobis(3-ethylbenzothiazoline- 6-sulfonate) (ABTS +). A molécula de ABTS é oxidada para ABTS⁺ usando peróxido de hidrogénio em meio ácido de tampão de acetato (pH 3,6 30 mmol/L). Essa solução diluída em um tampão mais concentrado de acetato (0,4 mol/L, pH 5,8) faz com que ocorra mudança de cor durante a produção do cátion ABTS⁺. A adição desse radical a um meio contendo antioxidantes, permite avaliar, através do grau de descoloração, a capacidade antioxidante do mesmo a um grau proporcional à sua concentração. O percentual de oxidação de ABTS⁺ é determinado em função da concentração e do tempo, expressa pela reatividade do trolox, como padrão (mmol/L).

3.15 Análise dos resultados

Os resultados encontrados decorrentes da administração do extrato da espécie *U. guianensis* após a sensibilização e desafios com OVA foram avaliados utilizando os testes 1-way ANOVA e 2-way ANOVA de medidas repetidas, conforme apropriado, com pós-teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação e quantificação dos componentes isolados a partir dos extratos aquoso e hidroetanólico de *U. guianensis*

Foram identificadas quatro substâncias presentes majoritariamente nos extratos aquoso e hidroetanólico de *U. guianensis*, entre elas: ácido quínico, ácido clorogênico, mitrafilina e isomitrafilina.

A quantidade de ácido quínico foi maior do que as outras substâncias tanto no extrato aquoso ($288 \pm 20.8 \mu\text{g/mL}$) como no extrato hidroetanólico ($141.3 \pm 20.1 \mu\text{g/mL}$), ao passo que o ácido clorogênico apresentou-se em quantidades menores em ambos os extratos, sendo sua concentração no valor de $9.9 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$ no extrato aquoso e de $15.0 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$ no extrato hidroetanólico. Já o alcaloide mitrafilina foi encontrado também em ambos os extratos de *U. guianensis*, sendo a concentração obtida no extrato hidroetanólico de $9.7 \pm 0.6 \text{ mg/mL}$, e no extrato aquoso de $4.6 \pm 1.0 \text{ mg/mL}$. Na **Tabela 4** encontram-se a quantificação dos componentes isolados dos extratos aquoso e hidroetanólico da *U. guianensis*.

Tabela 4 – Quantificação dos componentes isolados a partir dos extratos aquoso e hidroetanólico da *U. guianensis*.

	Extrato aquoso	Extrato hidroetanólico
Ácido quínico	$288 \pm 20.8 \mu\text{g/mL}$	$141.3 \pm 20.1 \mu\text{g/mL}$
Ácido clorogênico	$9.9 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$	$15 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$
Mitrafilina	$4.6 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$	$9.7 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$

4.2 Contagem de células totais e diferenciais

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

A **Figura 3** apresenta a contagem de células totais e diferenciais no LBA com a utilização do extrato aquoso da *U. guianensis*. Resumidamente, o modelo de asma resultou em aumento significativo da celularidade no LBA (OVA-SAL vs. SAL-SAL, $p < 0,05$), porém, o tratamento com UGA não reduziu significativamente essa celularidade (OVA-SAL vs.

OVA-UGA). Com relação à contagem de células diferenciais, o modelo de asma obteve sucesso quando mais uma vez observamos diferenças significativas entre os grupos SAL-SAL e OVA-SAL na contagem de eosinófilos ($p < 0,001$); no entanto, o extrato aquoso (UGA) não foi capaz de modificar a contagem diferencial de células (OVA-SAL vs OVA-UGA).

Figura 3 - Contagem de células totais e diferenciais no LBA com a administração do extrato aquoso na dose de 100 mg/kg. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA via i.p. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam via i.p. tratamento com extrato aquoso de *U. guianensis* por três dias durante os desafios. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. (n=8). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

A **Figura 4** nos mostra a contagem de células totais e diferenciais quando utilizado o extrato hidroetanólico da *U. guianensis*. Podemos observar mais uma vez, o aumento do número de células totais, mostrando o sucesso do modelo, quando comparamos os grupos SAL-SAL vs. OVA-SAL, $p < 0,01$) e que o tratamento com o extrato hidroetanólico da *U. guianensis* foi capaz de reduzir significativamente a celularidade total do LBA (OVA-SAL vs. OVA-UGH, $p < 0,05$). Com relação a contagem de células diferenciais, notamos aumento importante no número de eosinófilos quando comparamos os grupos SAL-SAL vs. OVA-SAL, $p < 0,001$) e com o uso do extrato hidroetanólico (UGH) alcançamos uma diminuição significativa no número de eosinófilos, quando comparado com o grupo asmático não tratado (OVA-SAL vs. OVA-UGH, $p < 0,001$).

Figura 4 - Contagem de células totais e diferenciais no LBA com a administração do extrato hidroetanólico na dose de 100 mg/kg. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA via i.p. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n. diariamente por três dias consecutivos. Os camundongos receberam via i.p. tratamento com extrato hidroetanólico de *U. guianensis* por três dias durante os desafios. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. (n=8). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.3 Medida dos parâmetros *in vivo* da função pulmonar

4.3.1 Avaliação da hiper-responsividade brônquica com o uso do extrato aquoso da *U. guianensis*

Os resultados obtidos das medidas dos parâmetros da função pulmonar estão expostos nas figuras a seguir. Os resultados referentes à hiper-responsividade brônquica com a utilização do extrato aquoso da *Uncaria guianensis* (UGA) encontram-se na **Figura 5**

Figura 5 – Avaliação da hiper-responsividade brônquica com a administração do extrato aquoso da *U. guianensis* na dose de 100 mg/kg. Os camundongos foram desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato aquoso (UGA) de *U. guianensis* na dose de 100 mg/kg. A hiper-responsividade brônquica foi mensurada através de medidas da condição basal (Basal) e salina (Salina) e após provocação com administração de concentrações crescentes de aerossóis com metacolina (6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Na resistência pulmonar total (RRS), elastância pulmonar total (ERS) observamos o sucesso do modelo animal de asma quando notamos diferenças entre os grupos SAL-SAL e OVA-SAL na concentração de 25 mg/mL de metacolina; já na resistência tecidual (G), o modelo obteve sucesso na dose de 25 e 50 mg/mL de metacolina, sendo que na elastância tecidual (H), alcançamos aumento da hiper-responsividade somente com a dose de 50 mg/mL de metacolina. Quando comparamos os grupos asmáticos não tratados (OVA-SAL) com o grupo asmático tratado com o extrato aquoso da planta *U. guianensis* (OVA-UGA), a figura nos mostra que obtivemos sucesso com o uso do fitoterápico nos parâmetros de resistência e elastância total, quando utilizada dose de 25 mg/mL de metacolina e com o uso de 50 mg/mL de metacolina, obtivemos uma redução da hiper-responsividade brônquica avaliada através da elastância tecidual (H).

4.3.2 Avaliação da hiper-responsividade brônquica com o uso do extrato hidroetanólico da *U. guianensis*

Como mostraremos na **Figura 6**, obtivemos uma resposta ainda melhor na hiper-responsividade brônquica com a utilização do extrato hidroetanólico da *U. guianensis*.

Mais uma vez, os gráficos nos mostram o funcionamento do modelo, com aumento da hiper-responsividade quando comparamos os camundongos controle (SAL/SAL) *versus* os camundongos asmáticos (OVA/SAL), com aumento significativo em todos os parâmetros (resistência e elastância total, resistência e elastância tecidual e resistências das vias aéreas centrais), atingidas com doses variadas de metacolina, que vão desde a menor dose (6,25 mg/mL até a maior dose de 50 mg/mL). E comprovando a eficácia e superioridade em relação ao extrato aquoso, a utilização do extrato hidroetanólico da *U. guianensis* foi capaz de alcançar uma diminuição significativa em todos os parâmetros (RRS, ERS, G, H e Rn) da hiper-responsividade brônquica, quando comparamos os grupos asmáticos não tratados, com os asmáticos tratados (OVA-SAL vs. OVA-UGH).

Figura 6 - Avaliação da hiper-responsividade brônquica com a administração do extrato hidroetanólico da *U. guianensis* na dose de 100 mg/kg. Os camundongos foram desafiados com ovalbumina (OVA) ou solução salina (SAL), e tratados com SAL ou extrato hidroetanólico (UGH) de *Uncaria guianensis* na dose de 100 mg/kg. A hiper-responsividade brônquica foi mensurada através de medidas da condição basal (Basal) e salina (Salina) e após provocação com administração de concentrações crescentes de aerossóis com metacolina (6,25; 12,5; 25 e 50 mg/mL). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.4 Dosagem de citocinas inflamatórias no homogenato pulmonar

Os níveis das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ e TGF- β são mostradas na Figura 7. Os gráficos nos mostram que não obtivemos um aumento significativo na dosagem das citocinas entre os grupos controle (SAL/SAL) e os grupos asmáticos (OVA/SAL). Em contrapartida, quando analisamos os dados referentes à dosagem de IL-13, podemos observar quando comparamos os grupos SAL/SAL com os grupos OVA/SAL o funcionamento e sucesso do modelo ($p < 0,001$), e com a utilização tanto do extrato aquoso (UGA) como do extrato hidroetanólico (UGH), conseguimos uma redução significativa da dosagem de IL-13 quando comparamos os grupos asmáticos não tratados com os grupos asmáticos tratados ($p < 0,001$).

Figura 7 - Níveis de citocinas no homogenato pulmonar. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA via i.p. com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n. por quatro dias alternados. Um grupo de camundongos recebeu via i.p. tratamento com extrato hidroetanólico de *U. guianensis* na dose de 100 mg/kg e um outro grupo recebeu tratamento com extrato aquoso, ambos os grupos com tratamento de três dias ao início do desafio. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. (n=8). ***p <0,001.

4.5 Níveis de IgE específica para ovalbumina com administração do extrato aquoso e hidroetanólico da *U. guianensis*

Como nos mostra a **Figura 8**, não houve aumento significativo nos níveis de IgE específica para OVA no grupo OVA/SAL quando comparado com o grupo SAL/SAL. A administração dos extratos aquoso e hidroetanólico na dose de 100 mg/kg também não alteraram significativamente os níveis de IgE anti-ovalbumina.

Figura 8 – Níveis de IgE específica para OVA no soro. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA via i.p, com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n. por 3 dias consecutivos. Os camundongos receberam via i.p. tratamento com extrato aquoso e hidroetanólico de *U. guianensis* na dose de 100 mg/kg por 3 dias durante os desafios. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. (n=8).

4.6 Análise da capacidade antioxidante no homogenato pulmonar com administração dos extratos aquoso e hidroetanólico da *U. guianensis*

A **Figura 9** representa a atividade da capacidade antioxidante total no homogenato pulmonar. Podemos observar que a administração tanto do extrato aquoso como do hidroetanólico da *U. guianensis* não foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante quando comparamos o grupo asmático não tratado (OVA/SAL) com o grupo asmático tratado (OVA/UGA e OVA/UGH).

Figura 9. Dosagem da capacidade antioxidante total (CAT) no tecido pulmonar. Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA via i.p, com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n. por 3 dias consecutivos. Os camundongos receberam via i.p. tratamento com extrato aquoso e hidroetanólico de *U. guianensis* na dose de 100 mg/kg por 3 dias durante os desafios. Os camundongos do grupo controle receberam salina nos mesmos dias. (n=8).

4.7 Quantificação das células inflamatórias no tecido pulmonar com a administração do extrato aquoso e hidroetanólico da *U. guianensis*

Como podemos observar na **Figura 10**, não houve um aumento significativo no número de células inflamatórias no grupo asmático (OVA/SAL), quando comparado com o grupo controle (SAL/SAL). A administração dos dois extratos, aquoso e hidroetanólico da *U. guianensis*, também não foi capaz de diminuir significativamente o número de células inflamatórias no pulmão, quando comparamos os grupos asmáticos (OVA/SAL) com os grupos asmáticos tratados (OVA/UGA e OVA/UGH). Entretanto, podemos verificar na figura que o número de células inflamatórias retornou ao valor “basal” (SAL/SAL).

Figura 10 – Quantificação das células inflamatórias no tecido pulmonar. A, B, C e D: fotomicrografias representativas dos grupos SAL/SAL (A), OVA/SAL (B), OVA/UGH (C) e OVA/UGA (D). Os camundongos foram sensibilizados duas vezes com OVA via i.p com uma semana de intervalo, e desafiados com OVA i.n por três dias consecutivos. Os camundongos receberam por via i.p tratamento com extrato aquoso e hidroetanólico do extrato de *U. guianensis* na dose de 100 mg/kg por três dias consecutivos ao início do desafio. Os camundongos do grupo controle receberam solução salina nos mesmos dias (n=6 a 8).

5 DISCUSSÃO

Com a realização deste estudo, onde tivemos como objetivo avaliar os efeitos anti-inflamatórios da planta medicinal *U. guianensis*, obtivemos resultados interessantes e promissores. Com a utilização dos extratos obtidos das folhas da *U. guianensis*, pela primeira vez, foi possível demonstrar a eficácia desse tratamento contra a asma em um modelo animal.

Os primeiros estudos em modelos animais de asma foram desenvolvidos com uma variedade de espécies (65) e tiveram seus esforços focados no fenômeno da hiper-reatividade da via aérea (AHR); definida como uma excessiva broncoconstrição em resposta a um estímulo/desafio padronizado, sendo o desafio feito geralmente por um agente agonista da musculatura lisa, como a metacolina ou a histamina (20).

Estes estudos em modelos animais constituem a base do conhecimento que temos hoje sobre a fisiopatologia da asma, e são extremamente importantes para o desenvolvimento pré-clínico de terapias medicamentosas, apesar do modelo animal não reconstituir completamente todas as características das doenças em humanos. Os pesquisadores focaram primeiramente em maneiras de ocasionar uma inflamação alérgica através da sensibilização e desafio dos animais com uma variedade de proteínas, levando a um aumento do entendimento de fatores imunológicos que mediam a resposta inflamatória e suas expressões na forma de hiper-responsividade da via aérea (20). Nestes modelos, onde ocorre o estreitamento exagerado das vias aéreas, pesquisadores também apoiam a ideia de que a asma pode representar uma anormalidade da musculatura lisa dessas vias aéreas; sendo os camundongos a espécie de escolha para a pesquisa envolvendo animais na asma (20).

No modelo alérgico de asma animal utilizado atualmente, a sensibilização do animal é realizada com a ovalbumina; este procedimento é feito geralmente pela injeção intraperitoneal (realizada duas vezes, com intervalo de uma semana), juntamente com um adjuvante, sendo o mais comum, o hidróxido de alumínio, utilizado para potencializar a imunogenicidade da OVA. No entanto, este mecanismo de potencialização ainda não é completamente compreendido (66). Após o sistema imune reagir contra a OVA, o que leva vários dias, o animal recebe uma segunda exposição diretamente nos pulmões, na forma de aerossol ou via intra-nasal; gerando uma reação inflamatória nos pulmões, caracterizada por influxo de eosinófilos, espessamento epitelial e hiper-responsividade (67). As características típicas da inflamação alérgica atingem seu pico 1 ou 2 dias após a exposição final, embora o tempo desse processo ainda não seja completamente entendido (20). Vale ressaltar que em

alguns modelos animais de asma, a utilização da OVA, pode ser substituída por ácaros ou espécies de *Aspergillus* (68,69).

O modelo de asma acima descrito é bastante agudo, enquanto a asma em humanos é tipicamente uma doença crônica que exhibe características claras de remodelamento em seu estágio mais tardio (70). Isto levou pesquisadores a utilizar modelos de asma crônica, com tempos maiores de exposição ao antígeno. No entanto, a extensão da exposição à OVA em aerossol, pelo menos em algumas espécies de camundongos, como BALB/c, levaram à tolerização, caracterizada por uma diminuição nos fenótipos inflamatórios e de hiper-responsividade (71,72).

Com o que foi descrito acima, podemos perceber que reproduzir um modelo animal de asma representa um grande desafio, devido o tamanho bastante reduzido desses animais; no entanto, métodos modernos de imagens, juntamente com a utilização da técnica de oscilação forçada, têm permitido que o fenótipo da asma em camundongos seja precisamente caracterizado (20).

O modelo experimental usado em nosso trabalho reproduz algumas das características observadas em pacientes asmáticos. Este modelo consiste da realização de duas fases: uma onde a sensibilização é induzida por injeção intraperitoneal (i.p) e uma outra, onde os desafios com antígenos são feitos por via intra-nasal. Conseguimos mostrar que os animais sensibilizados com ovalbumina apresentaram aumento da hiper-responsividade brônquica, inflamação eosinofílica e níveis elevados de IL-13 no homogenato pulmonar.

Os animais asmáticos tratados com ambos os extratos da planta *U. guianensis* apresentaram diminuição das características inflamatórias, no entanto, o extrato hidroetanólico demonstrou superioridade em sua ação, quando comparado ao extrato aquoso.

Essa superioridade do extrato UGH pode ser explicada pelo fato de que os diferentes métodos de extração resultam em conjuntos de moléculas com diferentes polaridades e propriedades. Como já é bem estabelecido, quando utiliza-se uma mistura alcóolica (extrato hidroetanólico) como sistema de extração, é possível conseguirmos metabólitos secundários com as mais diferentes polaridades; ao passo que, quando a água (extrato aquoso) é utilizada como meio de extração, só conseguimos extrair compostos de alta polaridade (73). Tal fato vai ao encontro de estudo realizado com subfrações da *U. guianensis*, onde a fração A (hidroetanólica e mais apolar), rica em flavonoides e alcaloides, mostrou-se mais potente que a fração B (fração insolúvel e mais polar) (74). Como mostrado pela análise de cromatografia, encontramos no extrato hidroetanólico das folhas da *U. guianensis*, majoritariamente, duas substâncias: o composto fenólico ácido clorogênico e o alcaloide pentacíclico mitrafilina. Isto

nos leva a sugerir que, possivelmente, o ácido clorogênico e a mitrafilina, individual ou sinergicamente, possuam maior capacidade anti-inflamatória e possam explicar os efeitos observados em nosso estudo.

Atualmente, mais de 200 compostos já foram isolados do gênero *Uncaria*, incluindo os alcaloides, triterpenos, uncarinos, flavonoides, fenilpropanoides, entre outros. Devido à complexidade e variedade de compostos existentes em um único gênero da planta, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de identificá-los e conhecer seus mecanismos de ação.

Resultados semelhantes foram alcançados em dois experimentos; no modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina, onde utilizou-se o extrato liofilizado aquoso e hidroetanólico do gênero *Uncaria*, ambos mostrando ações anti-inflamatórias, porém o último demonstrou uma atividade significativamente maior, produzindo com uma dosagem de 50 mg/kg um efeito similar a 7 mg/kg de indometacina. O extrato aquoso produziu efeito semelhante somente em uma alta dosagem (200 mg/kg). *In vitro*, células foram pré-tratadas com 500 µg/mL do extrato hidroetanólico, ocasionando uma redução quase completa da ativação do NF-κB, enquanto o extrato aquoso somente diminuiu levemente a ativação do NF-κB (73).

A inflamação pulmonar é uma característica marcante de muitas doenças respiratórias como a asma. Várias dessas condições são tratadas com anti-inflamatórios com o objetivo de reduzir a inflamação. Com esse intuito, muitos produtos naturais derivados de plantas têm sido utilizados na medicina folclórica e estudos científicos tem sido realizados nesses últimos anos para avaliar o valor desses compostos. Muitas substâncias derivadas dessas plantas têm efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo*, entre estas atividades biológicas podemos citar atividades anti-inflamatória, antiviral, antiplaquetária, antitumoral, antialérgica e antioxidante (75).

A medicina tradicional chinesa (TCM) há muito tempo utiliza fitoterápicos no tratamento de várias doenças respiratórias, incluindo a asma. Evidências sugerem que os fitoterápicos utilizados na medicina tradicional chinesa (TCM) agem diretamente na inibição da ativação e migração de células inflamatórias, regulando as respostas Th₁/Th₂ (que encontram-se em desequilíbrio na asma), e suprimindo a hiper-reatividade alérgica através da indução de células T regulatórias ou atenuando a função das células dendríticas (76).

Extratos aquosos ou hidroetanólicos de um único fitoterápico ou de compostos fitoterápicos mostraram a redução de IL-4, IL-5, IL-13, TNF-α e IgE, assim como a hiper-responsividade das vias aéreas em um modelo animal de asma, induzido por ovalbumina (76).

Outros estudos, mostraram que os extratos inibem a atividade do NF- κ B, o qual pode ser responsável pela mediação do decréscimo de citocinas Th₂ (77,78).

Jayaprakasam et al., em 2013, compararam os efeitos individuais de 3 extratos: Lingzhi (*Ganoderma Lucidum*), Kushen (*Sophora flavescens*) e Gancão (*Glycyrrhiza uralensis*) e o ASHMI (combinação dos extratos individuais) na inibição da produção de citocinas Th₂ por células de memória Th₂ e secreção de eotaxina por fibroblastos pulmonares de humanos. Eles encontraram que os constituintes do composto ASHMI atuaram sinergicamente inibindo a produção de eotaxina-1 assim como a produção de IL-4 e IL-5. No entanto, ainda não está totalmente claro, se a utilização da medicina tradicional chinesa e o uso de seus fitoterápicos atuam somente através da inibição de resposta Th₂, ou através do aumento da resposta Th₁, ou ambas (76).

Reforçando os efeitos dos flavonoides na asma, Jung et al., demonstraram que o *kuwanon*, um flavonoide isolado da casca da raiz de *Morus alba* L., diminuiu os níveis de IgE na asma alérgica de camundongos induzidos por ovalbumina, além de também diminuir os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 no soro e LBA dos camundongos asmáticos (79). Em outro estudo, utilizando o flavonoide kaempferol-3-O-rhamnoside e kaempferol, demonstrou-se a redução do número de células inflamatórias no LBA e também a inibição no aumento de citocinas Th₂ (IL-4, IL-5 e IL-13) e de TNF- α (80).

Já a atividade antialérgica do extrato de *Cymbopogon citratus* foi avaliada em um modelo animal de asma, onde os animais foram tratados via oral por 7 dias e o extrato reduziu o número de eosinófilos no LBA, número de leucócitos no tecido pulmonar, produção de muco no trato respiratório e o nível de IL-4 no LBA, além de inibir a expressão de NF- κ B (81).

Esses estudos supracitados, representam uma pequena amostra, do universo bibliográfico existente, os quais enfocam e demonstram as diversas atividades, entre elas, a atividade anti-inflamatória e consequente efetividade dos diversos complexos fitoterápicos existentes; que merecem atenção especial e enfatizam a necessidade de novos, maiores e aprofundados estudos.

Através de análise de cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), como já descrito anteriormente, detectamos compostos majoritários presentes tanto no extrato aquoso como no extrato hidroetanólico da *U. guinensis*, entre eles: a mitrafilina, o ácido quínico e o ácido clorogênico. A seguir, mostraremos alguns estudos e ensaios que nos mostram a ação

anti-inflamatória dessas substâncias, e que podem embasar os resultados positivos obtidos com o nosso trabalho.

A mitrafilina, um alcaloide pentacíclico encontrado tanto no extrato aquoso como no extrato hidroetanólico da *U. guianensis*, já demonstrou sua atividade anti-inflamatória em alguns estudos. Em um estudo realizado *in vivo*, com camundongos, mostrou ser capaz de inibir IL-1 α e β , além da produção de TNF- α . Por sua vez, compostos polifenólicos, como proantocianidinas, ácido quínico e ácido clorogênico, possuem atividade anti-inflamatória, e vários triterpenos já foram identificados por possuírem alta capacidade anti-inflamatória, agindo, como no caso do ácido quinóvico, através da inibição do NF- κ B (82–84).

Em estudo muito recente de 2016, os efeitos da mitrafilina foram avaliados em neutrófilos humanos ativados por LPS, incluindo a ativação de marcadores de superfície por FACS (separador de células ativado por fluorescência) e a expressão de citocinas inflamatórias. Como resultado, encontraram que a mitrafilina reduziu os neutrófilos ativados CD16 (+) CD62L (-) e a expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 ou IL-8) à níveis semelhantes à condições basais (85).

Com relação a outro componente, o ácido quínico, encontrado no extrato da *U. guianensis*, foi realizado um estudo, onde se avaliou a atividade biológica dessa substância, que está presente em um composto aquoso disponível comercialmente, à base de *U. tomentosa*, o C-Med 100®. Neste estudo, camundongos foram expostos ao ácido quínico e apresentaram um aumento no número de células esplênicas, reproduzindo os mesmos efeitos *in vivo* decorrentes da administração do composto C-Med 100®. Além disso, o ácido quínico também foi capaz de inibir a atividade do NF- κ B em cultura de tecidos. Os dados encontrados nesse estudo mostram que o ácido quínico pode ser o componente responsável por algumas das atividades biológicas atribuídas à *U. tomentosa* (na forma comercial C-Med 100®), tanto *in vivo* como *in vitro* (82).

Outro componente que encontramos em nosso extrato de *U. guianensis* foi o ácido clorogênico. O ácido clorogênico é um ester do ácido cafeico com o ácido quínico, e é um dos compostos polifenólicos mais abundantemente encontrados em vários tipos de alimentos, como mirtilo, feijão, batata, café e maçã, e possui propriedades biológicas importantes, como atividades anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, antivirais e antioxidantes (86,87).

Há inúmeros estudos que comprovam as mais variadas atividades do ácido clorogênico, entre eles podemos citar: importante efeito anti-inflamatório através da diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-6 em células Caco-2

estimuladas com TNF- α , LPS, IL-1 β e IFN- γ em estudo conduzido com a administração do chá de *Artemisia annua* (rica em ácido clorogênico) (88); diminuição da produção de IL-1 β , TNF- α e IL-6 em macrófagos RAW 264.7 de camundongos estimulados com LPS e em células microgliais BV2 através da efetiva regulação da via NF- κ B (89). Já em estudo realizado com a administração oral de ácido clorogênico, o mesmo protegeu contra a colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em camundongos através da redução de infiltração neutrofílica e inibição da via NF- κ B (90); a administração por via oral do ácido clorogênico reduziu a isquemia hepática e o dano ao fígado induzido pela reperfusão através da diminuição da resposta inflamatória e aumento da defesa antioxidante (91); e por fim, Chauhan et al., (92) observaram que a administração também por via oral de 40 mg/kg de ácido clorogênico, suprimiu efetivamente as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β em um modelo animal de inflamação do joelho.

Em 2010, outro estudo, utilizando o modelo de asma alérgica animal induzido por OVA, o ácido clorogênico utilizado nas doses de 0,5, 5 e 25 mg/kg de peso, diminuiu significativamente a eosinofilia e a expressão das citocinas IL-4, IL-5 e TNF- α nos pulmões, assim como também diminuiu os níveis no soro de IgE total e específica para OVA, ao passo que conseguiu aumentar os níveis totais e de OVA específica de IgG3. Já no mesmo estudo, mas com resultados *in vitro*, a produção de IgE por esplenócitos estimulados por LPS/IL-4 também foi acentuadamente diminuída com a utilização do ácido clorogênico, enquanto os níveis de IgG3 foram aumentados. Os fatores de transcrição, como o C ϵ , importantes para a troca do isótopo de IgE mediada por IL-4, assim como as moléculas STAT-6 e JNK, também foram inibidas após o uso do ácido clorogênico (86), mostrando assim, sua capacidade anti-inflamatória.

Diante do exposto até aqui, é possível constatar a existência de um número bastante grande de estudos de plantas e de seus extratos para o tratamento de várias doenças inflamatórias, e com resultados bastante interessantes e promissores. Esses estudos fortalecem e corroboram os resultados encontrados em nosso trabalho, que mostraram ação anti-inflamatória importante do extrato da *U. guianensis* (evidenciada pela diminuição do número de células totais e número de eosinófilos no LBA, diminuição de IL-13 no homogenato, além da diminuição da hiper-reatividade das vias aéreas). Com isso, podemos inferir, que talvez, a presença de tais compostos (mitrafilina, ácido quínico e ácido clorogênico) possam ser isoladamente, ou em conjunto, o elemento “chave”, responsável pela atividade anti-inflamatória do extrato de *U. guianensis*.

Como podemos constatar, a *U. guianensis*, possivelmente, através de substâncias encontradas em sua constituição, é capaz de exercer atividade anti-inflamatória importante, através da inibição da ação de algumas citocinas, quimiocinas, fatores de transcrição e vias de transdução. Abaixo, mostraremos alguns outros estudos *in vivo*, *in vitro* e em modelo animal que comprovam a atividade anti-inflamatória da *Uncaria* e que podem ratificar os resultados encontrados em nosso estudo.

Em estudo realizado *in vivo*, o extrato da *U. guianensis* mostrou inibir o TNF- α e o óxido nítrico (NO), além da diminuição da produção de PGE₂, fato este que pode ser atribuído à inibição da expressão de COX-2. Também diminuiu a expressão da IL-6, o edema da pata de rato induzido por carragenina em 86%, além de inibir o crescimento tumoral e a metástase pulmonar (74). Um fator em comum na ativação desses mediadores é o NF- κ B, já que existem estudos onde a atividade anti-inflamatória da planta *U. tomentosa* seja devido à inibição do NF- κ B e consequentemente dos genes-alvo, como iNOS, COX-2, TNF- α e IL-6, entre outros (93,94).

A eficácia da planta *U. guianensis* também foi comprovada em estudo clínico duplo-cego, mostrando sua eficácia no tratamento da osteoartrite de joelho, onde a dor associada à atividade e escores de avaliação foram significativamente reduzidos, com benefícios ocorrendo dentro das primeiras semanas de terapia. Já os resultados *in vitro* comprovaram a efetividade da *U. guianensis* na eliminação dos radicais livres, assim como na inibição na produção de TNF- α e PGE₂. Vale ressaltar que a inibição do TNF- α foi alcançada em concentrações muito menores do que as necessárias para se alcançar a ação antioxidante (95). Fato semelhante ocorrido com a possível ação antioxidante da planta *U. tomentosa*, foi observado em estudo realizado por Sandoval et al., onde a planta foi muito mais potente na supressão da síntese de TNF- α , do que em sua atividade antioxidante (60). Talvez, como nestes estudos, o quesito dose, possa ser o responsável pela falta de ação do extrato no estresse oxidativo observado em nosso trabalho; sendo possivelmente necessária uma dose maior do extrato de *U. guianensis* para podermos obter uma ação antioxidante efetiva.

A espécie *U. guianensis*, como dito anteriormente, é uma planta medicinal muito utilizada pelas populações da América Central e do Sul para o tratamento do câncer, artrite, diabetes e inflamações em geral (74). No entanto, apesar da existência de vários estudos com fitoterápicos e asma já terem sido realizados (tanto em modelos animais como em ensaios clínicos), até onde sabemos, em nenhum deles, foi utilizada a planta medicinal *U. guianensis*,

o que torna a realização do nosso trabalho, uma pesquisa inédita, capaz de nos proporcionar dados valiosos e resultados encorajadores.

O número aumentado de eosinófilos mostrados no LBA de nosso estudo sinaliza que ocorreu uma reação inflamatória nos camundongos sensibilizados e desafiados com OVA, confirmando dessa maneira, o sucesso do modelo. O recrutamento eosinofílico para via aérea é regulado por uma variedade de citocinas Th₂ (IL-4, IL-5, IL-13), quimiocinas e também por moléculas de adesão. A inflamação eosinofílica pode ser observada em pacientes asmáticos (96,97), e também está presente na maioria dos modelos de asma (96,98,99). O tratamento com extrato hidroetanólico da *U. guianensis*, obteve sucesso na diminuição tanto do número de células totais, como na diminuição de eosinófilos. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que mostraram que o tratamento com determinados fitoterápicos também são capazes de inibir a inflamação eosinofílica (100).

Em um desses estudos, utilizou-se a quercetina (um flavonoide derivado de plantas), amplamente conhecido por suas atividades anti-inflamatórias e antioxidantes, em um modelo experimental de inflamação alérgica das vias aéreas. Neste trabalho, os camundongos receberam doses orais de quercetina do 18º ao 22º dia após a primeira sensibilização com ovalbumina (OVA), sendo a dexametasona usada como controle positivo. Como resultado, a quercetina inibiu de maneira dose dependente, o recrutamento eosinofílico para o lavado broncoalveolar (LBA); mostrando sua propriedade anti-inflamatória, corroborando assim, os dados referentes à diminuição de eosinófilos encontrado também em nosso trabalho (101).

Em estudo realizado por Carvalho et al., usando a *U. guianensis*, eles também encontraram diminuição de 41% do número de eosinófilos para dentro da cavidade pleural, 24 horas após a administração de LPS, utilizando para isso, uma dose de 100 mg/kg de *U. guianensis*. Já em um modelo alérgico de pleurisia em camundongos, o pré-tratamento com as folhas de *U. guianensis*, na mesma dose acima descrita, também foi capaz de diminuir em 77% a migração eosinofílica para dentro da cavidade pleural, valor este, muito próximo à capacidade da dexametasona, que foi de 80%; comprovando mais uma vez, as atividade anti-inflamatória e antialérgica desse composto (61).

A redução do número de eosinófilos, bem como a hiper-responsividade brônquica, são achados importantes, visto que eles desempenham um papel central na patogênese da asma. O número de células eosinofílicas está aumentado em indivíduos asmáticos, principalmente no pulmão e no trato respiratório superior, e contribuem para a broncoconstrição, secreção de muco, dano ao tecido das vias aéreas (102), aumento da hiper-reatividade e da permeabilidade vascular, além de causar degranulação de mastócitos e

basófilos (12,102). Portanto, a atenuação dessas principais características da asma em modelos animais é de suma importância, para que o mesmo possa ser considerado para futuros ensaios clínicos.

Esses dados nos sugerem que ambos os extratos de *U. guianensis* utilizados podem apresentar potencial anti-inflamatório para o tratamento da asma, sendo o extrato hidroetanólico (UGH) mais eficaz com relação à diminuição da eosinofilia.

Quando analisamos os parâmetros *in vivo* da função pulmonar, fica evidente que o modelo animal de asma aqui utilizado também obteve sucesso, quando comparados os grupos controle (não asmáticos) com o grupo OVA (asmáticos); já que em todos os parâmetros avaliados: resistência total (RRS), elastância total (ERS), resistência tecidual (G) e elastância tecidual (H), notamos um aumento importante da hiper-responsividade da via aérea. Porém, o extrato hidroetanólico (UGH) apresentou uma efetividade anti-inflamatória maior que o extrato aquoso, uma vez que, através deste extrato, atingimos uma diminuição significativa na hiper-responsividade das vias aéreas em todos os parâmetros avaliados, quando comparamos os grupos asmáticos não tratados (OVA-SAL) com os grupos asmáticos tratados (OVA-UGH).

Vale ressaltar que a avaliação *in vivo* da mecânica respiratória realizada por um ventilador mecânico (como utilizado em nosso estudo), é considerada uma medida direta, sendo um parâmetro mais fidedigno de alterações na função pulmonar, diferentemente do que ocorre quando se usa a avaliação da hiper-responsividade por pletismografia, cuja técnica avalia de forma indireta a mecânica respiratória e, conseqüentemente, estão sujeitas à intervenções do meio externo, como o estresse do camundongo, o que pode acarretar em medidas não tão confiáveis ou exatas das alterações fisiológicas analisadas.

A hiper-responsividade brônquica é uma medida efetiva e muito utilizada em estudos de modelo animal, e é capaz de nos mostrar, de maneira bastante exata medidas da função pulmonar e suas respectivas respostas aos mais diferentes tratamentos, entre eles, as intervenções realizadas com fitoterápicos. Sendo então, a avaliação da função pulmonar, uma medida importante e bastante eficaz, mostraremos abaixo, alguns estudos que demonstraram a atividade anti-inflamatória através da inibição da hiper-reatividade das vias aéreas.

Em estudo recente, de 2016, os efeitos de diferentes doses (100, 250 e 500 mg/kg) do extrato de *Eclipta prostrata*, uma planta muito utilizada no tratamento da asma e de outras doenças respiratórias, rica em alcaloides e flavonoides, foi utilizado em um modelo animal de asma alérgica. Neste estudo, os camundongos foram sensibilizados duas vezes com ovalbumina (OVA) (i.p) e desafiados por 4 dias (em dias alternados) com instilação nasal de

OVA; sendo o extrato de *E. prostrata* administrado concomitantemente ao longo de 7 dias, por via intraperitoneal. Os animais controles foram tratados com dexametasona ou salina. Como resultado, este trabalho encontrou com a utilização desse extrato, diminuição significativa da hiper-responsividade brônquica após administração de doses crescentes de metacolina (avaliadas através da resistência e da elastância total, com o uso do respirador FlexiVent (*Scireq*, Montreal, QC, Canadá)); além de diminuição importante também no número de células totais e de eosinófilos no LBA e nas concentrações de IL-4, IL-5 e IL-13 no homogenato pulmonar (103); nos mostrando dados bastante semelhantes aos encontrados em nossa pesquisa.

Um outro estudo, de 2012, também avaliou a eficácia do *sakuranetin* (um flavonoide encontrado em frutas e vegetais) na inflamação e remodelamento das vias aéreas em um modelo animal de asma. Camundongos BALB/c receberam (OVA) (i.p) nos dias 0 e 14 e então foram desafiados com aerossol de (OVA) nos dias 24, 26 e 28. Os animais sensibilizados com (OVA) receberam salina, sakuranetin ou dexametasona diariamente, do dia 24 até o dia 29. No 29º dia, foi avaliada a hiper-responsividade brônquica (também pelo FlexiVent (*Scireq*, Montreal, QC, Canadá)), inflamação e remodelamento, assim como anticorpos específicos de IgE. Como resultados, entre outros dados, obteve-se diminuição na hiper-reatividade da via aérea e diminuição do número de células totais e de eosinófilos no LBA (100); (resultados estes, que vão ao encontro, mais uma vez, daqueles encontrados em nosso trabalho). Estes efeitos poderiam ser atribuídos à redução do estresse oxidativo e de citocinas pró-inflamatórias Th₂, assim como o controle da ativação do NF-κB (100).

Mostrando também a efetividade da ação anti-inflamatória do flavonoide Chrysin (conhecido por suas várias atividades biológicas, entre elas, a atividade anti-inflamatória e anti-oxidante), outro estudo bastante recente, de 2016, analisou se essa substância era capaz de diminuir o remodelamento e a inflamação alérgica da via aérea em um modelo animal de asma crônica e seus mecanismos envolvidos. Criaram-se 4 grupos: controle, OVA, Dexametasona e Chrysin. Os camundongos foram sensibilizados via intraperitoneal (dias 1 e 14) e desafiados com OVA (a partir do 21º com aerossol, 30 minutos por dia, 3 vezes por semana, durante 8 semanas). O grupo dexametasona recebeu a substância por via i.p 30 minutos antes do desafio e o grupo Chrysin recebeu o flavonoide diluído em solução de carboximetilcelulose. A partir do dia 21, os camundongos do grupo Chrysin receberam 100 mg/kg por via intra-gástrica diariamente por 8 semanas e o grupo controle recebeu o mesmo esquema de sensibilização e desafios utilizando PBS. Após a sensibilização e desafios, 6 animais de cada grupo foram utilizados para verificação da resistência da via aérea (por

pletismografia), e os outros 6 camundongos foram utilizados para coleta de LBA e análise histológica de tecido pulmonar. Como resultado, os pesquisadores comprovaram que os camundongos sensibilizados e desafiados com OVA desenvolveram hiper-responsividade brônquica da via aérea, inflamação e remodelamento, e que o flavonoide Chrysin foi capaz de diminuir a hiper-responsividade brônquica, o número de células inflamatórias, especialmente, eosinófilos, IL-4, IL-13 e IFN- γ no LBA e diminuiu também os níveis de IgE no soro; além da supressão de células inflamatórias (104).

Na análise das dosagens de IL-13 no homogenato pulmonar, comprovamos mais uma vez a eficácia do modelo de asma aqui proposto, já que aumento significativo ocorreu entre o grupo controle (OVA-SAL) e o grupo asmático (OVA-UGA e UGH). Além disso, a esperada diminuição da dosagem de IL-13 após administração do fitoterápico nos camundongos asmáticos foi alcançada; sendo os dois extratos (aquoso e hidroetanólico) capazes de diminuir consideravelmente a dosagem dessa citocina no homogenato pulmonar.

Estudos acerca da importância de IL-4 e IL-13 na asma alérgica são produzidos frequentemente. Ambas as citocinas podem ser produzidas tanto por células T como por uma infinidade de outras células do sistema imune inato. No entanto, a contribuição e o papel dessas citocinas para a inflamação alérgica e a hiper-reatividade da via aérea ainda não está totalmente clara (105). Corroborando nossos dados, estudo de 2015 avaliou a intensidade da inflamação alérgica pulmonar induzida por ovalbumina (OVA) em camundongos Balb/c selvagens e em camundongos com ausência da expressão de IL-4 e IL-13 somente nas células T (4-13Tko) ou em todos os outros tipos de células (4-13ko). Nesse estudo, os camundongos foram sensibilizados com injeção (i.p) de ovalbumina nos dias 0 e 7, acompanhados de 3 desafios (i.n) também com OVA nos dias 14, 15 e 16. Os controles receberam somente alumínio ou PBS, sendo os animais sacrificados no dia 17 (105). Como resultados, o estudo evidenciou: análise das concentrações das citocinas (IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- γ) aumentadas no sobrenadante dos camundongos selvagens, ao passo que nos camundongos 4-13Tko e 4-13ko houve diminuição dessas citocinas; redução no número de eosinófilos, basófilos e ILC2s (células linfoides inatas do tipo 2) nos pulmões dos camundongos com ausência da expressão de IL4 e IL-13 quando comparados com camundongos selvagens e diminuição dos eosinófilos e ILC2s no sangue do grupo de camundongos com ausência de expressão de IL-4 e IL-13 nas demais células do sistema imune (105). Após a realização do protocolo acima descrito, a hiper-responsividade da via aérea foi avaliada utilizando-se do método de pletismografia com doses crescentes de metacolina, mostrando como resultados aumento da resistência das vias aéreas dos camundongos selvagens sensibilizados com OVA quando comparados com os

demais camundongos (4-13Tko e 4-13ko). Observou-se uma baixa resistência das vias aéreas nesses dois últimos grupos de camundongos, que não foi dependente da sensibilização com OVA, como também observado nos camundongos controles (PBS); o que nos mostra o papel crítico de IL-4 e IL-13 derivados de células T para a hiper-responsividade da via aérea (105).

A citocina IL-13 desempenha um papel muito importante na fase efetora da resposta alérgica e é capaz de induzir as principais características das doenças alérgicas incluindo, a hiper-responsividade brônquica, produção de muco, alterações na musculatura lisa das vias aéreas e fibrose sub-epitelial; além de também ser diretamente responsável pela sobrevida e proliferação eosinofílica para dentro do tecido pulmonar, assim como a liberação de mediadores responsáveis por tais características (106,107).

Diante dessa ligação, comprovada por estudos, entre a citocina IL-13 e sua importância na indução e desenvolvimento de várias características das doenças alérgicas; podemos estabelecer um paralelo entre essa conexão e os achados do nosso trabalho; onde podemos comprovar que alguns desses aspectos (como a hiper-reatividade da via aérea e o número de eosinófilos), encontraram-se diminuídos; possivelmente, decorrentes da também diminuída dosagem de IL-13, com a utilização do extrato de *U. guianensis*.

Tais achados se mostram extremamente importantes e valiosos e corroboram a eficácia e a importância dos resultados obtidos em nossa pesquisa, já que obtivemos com a utilização da *U. guianensis*, diminuição de contagem de células totais e diferenciais, diminuição da citocina IL-13, além da diminuição da hiper-responsividade brônquica das vias aéreas.

Com relação às citocinas restantes (IL-4, IL-5 e IL-10) não obtivemos os mesmos resultados, não havendo diferença entre os grupos tratados e não tratados. Uma possível explicação para essa aparente inefetividade pode ser o curto tempo de execução do protocolo, ou talvez, vias de ações diferentes dessas citocinas; onde marcadores, quimiocinas ou fatores de transcrição não sofram ação direta e anti-inflamatória do fitoterápico do gênero *Uncaria*.

Com relação à toxicidade da planta *U. guianensis*, a quantidade de dados acerca dessa questão é bastante restrita. Encontramos, no entanto, trabalhos realizados com o extrato aquoso da casca da *U. tomentosa*, onde avaliaram-se seus efeitos tóxicos. Sheng et al., utilizando ratas W/Fu demonstraram que o extrato não apresentou sinais de toxicidade crônica, com LD₅₀ > 8g/kg e MDT > 8g/kg após administração oral dos extratos nas doses de 10-80 mg/kg/dia por 8 semanas ou 160 mg/kg/dia por 4 semanas (108). Literatura relacionada a patentes contém estudos acerca da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Uncaria*, o qual administrado a camundongos em doses de até 5 g/kg não causaram nenhum sintoma tóxico (109). Já em estudos *in vitro* realizados com células do ovário de

camundongos e culturas de *Photobacterium phosphoreum*, o extrato aquoso da *U. tomentosa*, mais uma vez não demonstrou a presença de substâncias tóxicas (110). Vale ressaltar no entanto que, embora os extratos do gênero *Uncaria* não exibam toxicidade mesmo em altas doses, alguns componentes isolados da planta podem ser tóxicos em altas concentrações (111).

Apesar da falta de consenso da dosagem oral efetiva para utilização como medicamento fitoterápico do extrato da planta *U. tomentosa*, pesquisadores recomendam doses diárias de 0,5 a 1 g do extrato, como imunoestimulante (112). Extratos padronizados da raiz da *U. tomentosa*, na forma de pó são usados na Europa de 2 a 3 vezes ao dia nas doses de 20 a 60 mg/kg (56). Diante desse quadro, sem dúvida alguma, investigações e estudos mais detalhados acerca dos efeitos tóxicos da planta do gênero *Uncaria* se fazem necessários.

Sabemos que os tratamentos hoje disponíveis para o controle da asma são efetivos, mas não em todos os casos, especialmente nos casos de asma grave, o controle da doença é bem difícil de ser atingido; além dos efeitos colaterais advindos do uso prolongado e em altas doses dos corticosteroides. Sendo assim, existe uma necessidade real e urgente no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da asma (29).

Apesar da existência de inúmeros compostos fitoterápicos comprovadamente eficazes no tratamento da asma, até onde sabemos, nenhum deles resultou em um medicamento comercial para o manejo da doença. Isso se deve possivelmente ao fato de essas plantas frequentemente apresentarem inúmeros componentes desconhecidos, tornando assim, a padronização, o processo de produção e a obtenção de um produto final (comercial), um processo bastante complexo. Somando-se a essas dificuldades, temos também que nos preocuparmos com os dados relativos à segurança do fitoterápico e a identificação da presença de metais pesados serem componentes chaves para obtenção de aprovação para comercialização desses extratos (76). Além disso, as variações na composição química de diferentes lotes da mesma planta, influenciados por fatores genéticos, climáticos, relacionados ao cultivo, colheita, armazenamento e extração, somam-se ainda a resistência ainda presente por parte da comunidade médica e científica em “aceitar” e acreditar na eficácia e efetividade do medicamento fitoterápico (14).

Diante do exposto até aqui, podemos constatar a eficácia e a ação anti-inflamatória da planta brasileira *U. guianensis*, apoiada por estudos já realizados e confirmado pelo nosso trabalho. Portanto, o estudo de fitoterápicos, sem dúvida, vem ganhando cada vez mais espaço na comunidade científica e ratificando sua importância e necessidade em maiores estudos; para quem sabe, em um futuro não muito distante, sejamos capazes de produzir um

medicamento fitoterápico comercial para o tratamento da asma. Não pretendemos com esse trabalho, enfatizar superioridade deste em relação aos medicamentos atualmente disponíveis no mercado; mas sim, disponibilizarmos uma opção a mais, uma alternativa diferente ou até mesmo complementar às pessoas que precisam conviver com essa doença.

Precisamos ressaltar que, apesar dos resultados alcançados em nosso estudo, pudemos observar que a quantidade de trabalhos e publicações sobre a *U. guianensis* ainda é limitado, sendo os dados referentes à *U. tomentosa*, muito maiores sob todos os aspectos avaliados em nossa pesquisa. Portanto, cabe a nós, da comunidade científica, acreditarmos e focarmos nossos esforços para uma produção bibliográfica muito maior e de qualidade, utilizando a *U. guianensis* como objeto de estudo. Como dito anteriormente, no Brasil, a *U. guianensis* pode ser encontrada e cultivada muito mais facilmente que a *U. tomentosa*, o que reforça nosso incentivo no cultivo e pesquisas acerca dessa importante planta brasileira.

As limitações deste estudo incluem:

- Curto período de tratamento. Um tratamento mais prolongado poderia levar a resultados mais expressivos em relação aos marcadores inflamatórios no homogenato pulmonar.
- Falta de curva dose-resposta. O estudo de outras doses dos extratos poderia auxiliar na determinação da dose ideal. O uso de doses maiores poderia levar a resultados mais expressivos em relação aos marcadores inflamatórios no homogenato pulmonar.
- Ausência do uso de um medicamento anti-inflamatório (dexametasona), que poderia ser utilizada como comparativo entre o grupo asmático tratado com o extrato da planta *U. guianensis* e o grupo asmático tratado com esse corticosteroide.
- Ausência de dados acerca dos efeitos citotóxicos do extrato de *U. guianensis*.

6 CONCLUSÃO

A administração de dois extratos (aquoso e hidroetanólico) das folhas da espécie *Uncaria guianensis* foi eficaz no tratamento da asma em modelo animal, tanto em medidas da mecânica pulmonar (com diminuição da hiper-responsividade brônquica) como em marcadores inflamatórios (com diminuição de IL-13, número de células totais e de eosinófilos), com superioridade terapêutica do extrato hidroetanólico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma, (GINA). 2016.
2. Sbpt. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma - 2012. J Bras Pneumol e Tisiol [Internet]. 2012;38(suplemento 1):S1-46. Recuperado de: http://www.sbpt.org.br/downloads/arquivos/COM_ASMA/SBPT_DIRETRIZES_MANEJO_ASMA_SBPT_2012.pdf
3. Anandan C, Nurmatov U, van Schayck OCP, Sheikh A. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies. Allergy. Denmark; fevereiro de 2010;65(2):152–67.
4. Olin JT, Wechsler ME. Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment. BMJ [Internet]. 2014;349(nov24 8):g5517. Recuperado de: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.g5517> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25420994>
5. Akinbami LJ, Moorman JE, Bailey C, Zahran HS, King M, Johnson CA, et al. Trends in asthma prevalence, health care use, and mortality in the United States, 2001-2010. NCHS Data Brief. United States; maio de 2012;(94):1–8.
6. Martinez FD, Vercelli D. Asthma. Lancet [Internet]. 2013;382(9901):1360–72. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24041942>
7. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). Eur Respir J. England; agosto de 1998;12(2):315–35.
8. Solé D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK, Group I-B. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. J Pediatr (Rio J) [Internet]. 2006;0(0):341–6. Recuperado de: http://www.jped.com.br/conteudo/Ing_resumo.asp?varArtigo=1521&cod=&idSecao=1
9. Oliveira F. Asma atinge 6,4 milhões de brasileiros [Internet]. 2015 [citado 22 de dezembro de 2016]. Recuperado de: <http://www.blog.saude.gov.br/xdbv8c>

10. Chung KF, Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro M, Sterk PJ, et al. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J*. England; fevereiro de 2014;43(2):343–73.
11. Santos L a., Oliveira M a., Faresin SM, Santoro IL, Fernandes a. LG. Direct costs of asthma in Brazil: A comparison between controlled and uncontrolled asthmatic patients. *Brazilian J Med Biol Res*. 2007;40(7):943–8.
12. By A, In E, Neutropenias C. Review Articles Advances in Immunology. *Adv Immunol*. 2010;344(14):1703–14.
13. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at UNIVERSITY COLLEGE LONDON on October 16, 2013. For personal use only. No other uses without permission. Copyright © 1990 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. 1990;
14. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy*. England; junho de 2008;38(6):872–97.
15. Lambrecht BN, Hammad H. Allergens and the airway epithelium response: gateway to allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol*. United States; setembro de 2014;134(3):499–507.
16. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med*. United States; maio de 2012;18(5):673–83.
17. Erle DJ, Sheppard D. The cell biology of asthma. *J Cell Biol*. United States; junho de 2014;205(5):621–31.
18. Kips JC. Cytokines in asthma. *Eur Respir J Suppl*. 2001;34(1):24s–33s.
19. Schuijs MJ, Willart MA, Hammad H, Lambrecht BN. Cytokine targets in airway inflammation. *Curr Opin Pharmacol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;13(3):351–61. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2013.03.013>
20. Bates JHT, Rincon M, Irvin CG. Animal models of asthma. *AJP Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2009;297(3):L401–10. Recuperado de: <http://ajplung.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajplung.00027.2009>
21. Georas SN. T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. *Eur Respir J* [Internet]. 2005;26(6):1119–37. Recuperado de:

<http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.05.00006005>

22. Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary Report 2007. *J Allergy Clin Immunol*. United States; novembro de 2007;120(5 Suppl):S94-138.
23. Lemanske RFJ, Mauger DT, Sorkness CA, Jackson DJ, Boehmer SJ, Martinez FD, et al. Step-up therapy for children with uncontrolled asthma receiving inhaled corticosteroids. *N Engl J Med*. United States; março de 2010;362(11):975–85.
24. Joos S, Miksch A, Szecsenyi J, Wieseler B, Grouven U, Kaiser T, et al. Montelukast as add-on therapy to inhaled corticosteroids in the treatment of mild to moderate asthma: a systematic review. *Thorax*. England; maio de 2008;63(5):453–62.
25. Peters SP, Kunselman SJ, Icitovic N, Moore WC, Pascual R, Ameredes BT, et al. Tiotropium bromide step-up therapy for adults with uncontrolled asthma. *N Engl J Med*. United States; outubro de 2010;363(18):1715–26.
26. Kerstjens HAM, Engel M, Dahl R, Paggiaro P, Beck E, Vandewalker M, et al. Tiotropium in asthma poorly controlled with standard combination therapy. *N Engl J Med*. United States; setembro de 2012;367(13):1198–207.
27. Burch J, Griffin S, McKenna C, Walker S, Paton J, Wright K, et al. Omalizumab for the treatment of severe persistent allergic asthma in children aged 6-11 years: a NICE single technology appraisal. *Pharmacoeconomics*. New Zealand; novembro de 2012;30(11):991–1004.
28. Cox PG, Miller J, Mitzner W, Leff AR. Radiofrequency ablation of airway smooth muscle for sustained treatment of asthma: preliminary investigations. *Eur Respir J*. England; outubro de 2004;24(4):659–63.
29. Li X-M. Treatment of asthma and food allergy with herbal interventions from traditional chinese medicine. [Internet]. *The Mount Sinai journal of medicine*, New York. 2011. 697-716 p. Recuperado de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4118473&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
30. Fontenele RP, Sousa DMP de, Carvalho ALM, Oliveira F de A. Fitoterapia na Atenção Básica: olhares dos gestores e profissionais da Estratégia Saúde da Família de Teresina (PI), Brasil. *Cien Saude Colet*. 2013;18:2385–94.

31. Ferro D. Fitoterapia: Conceitos Clínicos. São Paulo: Editora Atheneu; 2008.
32. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2008.
33. Carmona F, Pereira AMS. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. Rev Bras Farm. 2013;23(2):379–85.
34. BRASIL. Plantas Medicinais: Orientações gerais para o cultivo – I. Boas Práticas Agrícolas (BPA) de plantas medicinais, aromáticas e condimentares. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); 2006. p. 48.
35. BRASIL. Farmacopeia Brasileira (Volume 1). 5ª. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); 2010. 523 p.
36. BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 10 de 09 de março de 2010. Notificação de drogas vegetais. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília: Diário Oficial da União; 2010 p. 8.
37. Carvalho ACB, Silveira D. Drogas vegetais: uma antiga forma de utilização de plantas medicinais. Bras Med. 2010;48(2):219–37.
38. BRASIL. Lei nº 6360 (23 de setembro de 1976). Brasília: Diário Oficial da União; 1976.
39. BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 37 de 06 de julho de 2009. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília: Diário Oficial da União; 2009.
40. BRASIL. Instrução Normativa (IN) nº 5 de 11 de dezembro de 2008. Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília: Diário Oficial da União; 2008 p. 9.
41. Ernst E. Complementary therapies for asthma: what patients use. J Asthma. England; 1998;35(8):667–71.
42. III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. J Pneumol. 2002;28 supl1.
43. WHO. WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneve; 2002.
44. Calixto JB. Biodiversidade como fonte de medicamentos. Cienc Cult. 2003;55(3):37–9.
45. Shen J, Oraka E. Complementary and alternative medicine (CAM) use among children

- with current asthma. *Prev Med (Baltim)*. United States; janeiro de 2012;54(1):27–31.
46. Cotton S, Luberto CM, Yi MS, Tsevat J. Complementary and alternative medicine behaviors and beliefs in urban adolescents with asthma. *J Asthma*. England; junho de 2011;48(5):531–8.
 47. Knoeller GE, Mazurek JM, Moorman JE. Complementary and alternative medicine use among adults with work-related and non-work-related asthma. *J Asthma*. England; fevereiro de 2012;49(1):107–13.
 48. Singh BB, Khorsan R, Vinjamury SP, Der-Martirosian C, Kizhakkeveetil A, Anderson TM. Herbal treatments of asthma: a systematic review. *J Asthma*. England; novembro de 2007;44(9):685–98.
 49. Clark CE, Arnold E, Lasserson TJ, Wu T. Herbal interventions for chronic asthma in adults and children: a systematic review and meta-analysis. *Prim Care Respir J* [Internet]. Primary Care Respiratory Society UK; 2010;19(4):307–14. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20640388>
 50. Arnold E, Clark CE, Lasserson TJ, Wu T. Herbal interventions for chronic asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2008;(1). Recuperado de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD005989.pub2/abstract%5Cnhttp://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/14651858.CD005989.pub2/asset/CD005989.pdf?v=1&t=hkclewsdv&s=43a92508a320096bc6543070042f914d59c82c36>
 51. BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 1ª. Brasília: ANVISA; 2011. p. 126.
 52. Klein T et al. Fitoterápicos: um Mercado promissor. *Rev Ciências Farm Básicas e Apl*. 2009;30(n.3):241–8.
 53. Martins ER. Plantas Medicinais. 2003. p. 220p.
 54. Honório ICG, Bertoni BW, Pereira AMS, Honório ICG, Bertoni BW, Pereira AMS. *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* an agronomic history to be written. *Ciência Rural* [Internet]. 2016;46(8):1401–10. Recuperado de: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782016000801401&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 55. Pereira JB, Dantas KGF. Evaluation of inorganic elements in cat's claw teas using ICP

- OES and GF AAS. Food Chem [Internet]. abril de 2016 [citado 30 de setembro de 2015];196:331–7. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615014004>
56. Zhang Q, Jiao Zhao J, Xu J, Feng F, Qu W. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Uncaria*. J Ethnopharmacol [Internet]. 17 de julho de 2015 [citado 31 de agosto de 2015];173:48–80. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874115004195>
 57. Pereira, R.C.A; Lopes JV. Aspectos botânicos, etnobotânicos, agronômicos e fitoquímicos de unha-de-gato. 2006. p. 34p.
 58. Shanley P, Medina G. Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica. 2005;300.
 59. Keplinger K, Laus G, Wurm M, Dierich MP, Teppner H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.—Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. J Ethnopharmacol [Internet]. janeiro de 1998 [citado 17 de setembro de 2015];64(1):23–34. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874198000968>
 60. Free S. Cat ' S Claw Inhibits Tnf α Production and Scavenges Free Radicals : Role in Cytoprotection. 2000;29(1):71–8.
 61. Carvalho M V., Penido C, Siani AC, Valente LMM, Henriques MGMO. Investigations on the anti-inflammatory and anti-allergic activities of the leaves of *Uncaria guianensis* (Aublet) J. F. Gmelin. Inflammopharmacology. 2006;14(1–2):48–56.
 62. Hantos Z, Daroczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. J Appl Physiol. United States; janeiro de 1992;72(1):168–78.
 63. Ford JG, Rennick D, Donaldson DD, Venkayya R, McArthur C, Hansell E, et al. IL-13 and IFN- γ : Interactions in Lung Inflammation. J Immunol [Internet]. 2001;167(3):1769–77. Recuperado de: <http://www.jimmunol.org/content/167/3/1769.full>
 64. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem.

2004;37(4):277–85.

65. A JW, Abraham WM, JS D, JM D, HB R, Ram. Models of Airway Hyperresponsiveness. In: American Review of Respiratory Disease [Internet]. 1990. p. 253–7. Recuperado de: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm/141.1.253>
66. Kool M, Soullie T, van Nimwegen M, Willart MAM, Muskens F, Jung S, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*. United States; abril de 2008;205(4):869–82.
67. Wagers S, Lundblad LKA, Ekman M, Irvin CG, Bates JHT. The allergic mouse model of asthma: normal smooth muscle in an abnormal lung? *J Appl Physiol*. United States; junho de 2004;96(6):2019–27.
68. Fattouh R, Pouladi MA, Alvarez D, Johnson JR, Walker TD, Goncharova S, et al. House dust mite facilitates ovalbumin-specific allergic sensitization and airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. United States; agosto de 2005;172(3):314–21.
69. Haczku A, Atochina EN, Tomer Y, Cao Y, Campbell C, Scanlon ST, et al. The late asthmatic response is linked with increased surface tension and reduced surfactant protein B in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. United States; outubro de 2002;283(4):L755–65.
70. James AL, Wenzel S. Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. *Eur Respir J*. England; julho de 2007;30(1):134–55.
71. Bates JHT, Cojocaru A, Haverkamp HC, Rinaldi LM, Irvin CG. The synergistic interactions of allergic lung inflammation and intratracheal cationic protein. *Am J Respir Crit Care Med*. United States; fevereiro de 2008;177(3):261–8.
72. Yiamouyiannis CA, Schramm CM, Puddington L, Stengel P, Baradaran-Hosseini E, Wolyniec WW, et al. Shifts in lung lymphocyte profiles correlate with the sequential development of acute allergic and chronic tolerant stages in a murine asthma model. *Am J Pathol*. United States; junho de 1999;154(6):1911–21.
73. Aguilar JL, Rojas P, Marcelo A, Plaza A, Bauer R, Reininger E, et al. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *J Ethnopharmacol* [Internet]. julho de 2002 [citado 14 de janeiro de 2016];81(2):271–6. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874102000934>

74. Urdanibia I, Michelangeli F, Ruiz M-C, Milano B, Taylor P. Anti-inflammatory and antitumoural effects of *Uncaria guianensis* bark. *J Ethnopharmacol* [Internet]. Elsevier; 2013;150(3):1154–62. Recuperado de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874113007800>
75. Santana FPR, Pinheiro NM, Mernak MIB, Righetti RF, Martins MA, Lago JHG, et al. Evidences of herbal medicine-derived natural products effects in inflammatory lung diseases. *Mediators Inflamm*. 2016;2016.
76. Li J, Zhang F, Li J. The Immunoregulatory Effects of Traditional Chinese Medicine on Treatment of Asthma or Asthmatic Inflammation. *Am J Chin Med* [Internet]. 2015;43(6):1059–81. Recuperado de: <http://www.worldscientific.com/doi/10.1142/S0192415X15500615>
77. Chu X, Wei M, Yang X, Cao Q, Xie X, Guan M, et al. Effects of an anthraquinone derivative from *Rheum officinale* Baill, emodin, on airway responses in a murine model of asthma. *Food Chem Toxicol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;50(7):2368–75. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.03.076>
78. Lee M-Y, Shin I-S, Jeon W-Y, Lim H-S, Kim J-H, Ha H. *Pinellia ternata* Breitenbach attenuates ovalbumin-induced allergic airway inflammation and mucus secretion in a murine model of asthma. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. England; junho de 2013;35(3):410–8.
79. Jung HW, Kang SY, Kang JS, Kim AR, Woo E-R, Park Y-K. Effect of Kuwanon G isolated from the root bark of *Morus alba* on ovalbumin-induced allergic response in a mouse model of asthma. *Phytother Res*. England; novembro de 2014;28(11):1713–9.
80. Chung MJ, Pandey RP, Choi JW, Sohng JK, Choi DJ, Park Y Il. Inhibitory effects of kaempferol-3-O-rhamnoside on ovalbumin-induced lung inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Int Immunopharmacol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;25(2):302–10. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.01.031>
81. Santos Serafim Machado M, Ferreira Silva HB, Rios R, Pires de Oliveira A, Vilany Queiroz Carneiro N, Santos Costa R, et al. The anti-allergic activity of *Cymbopogon citratus* is mediated via inhibition of nuclear factor kappa B (Nf-Kb) activation. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. BMC Complementary and Alternative Medicine; 2015;15(1):168. Recuperado de:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4458008&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

82. Akesson C, Lindgren H, Pero RW, Leanderson T, Ivars F. Quinic acid is a biologically active component of the *Uncaria tomentosa* extract C-Med 100. *Int Immunopharmacol* [Internet]. janeiro de 2005 [citado 14 de janeiro de 2016];5(1):219–29. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576904003145>
83. Pilarski R, Zieliński H, Ciesiolka D, Gulewicz K. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 8 de março de 2006 [citado 14 de janeiro de 2016];104(1–2):18–23. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105005854>
84. Rojas-Duran R, González-Aspajo G, Ruiz-Martel C, Bourdy G, Doroteo-Ortega VH, Alban-Castillo J, et al. Anti-inflammatory activity of Mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 11 de outubro de 2012 [citado 7 de dezembro de 2015];143(3):801–4. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874112004849>
85. Montserrat-De La Paz S, Fernandez-Arche A, De La Puerta R, Quilez AM, Muriana FJ, Garcia-Gimenez MD, et al. Mitraphylline inhibits lipopolysaccharide-mediated activation of primary human neutrophils. *Phytomedicine*. 2016;23(2):141–8.
86. Kim HR, Lee DM, Lee SH, Seong AR, Gin DW, Hwang JA, et al. Chlorogenic acid suppresses pulmonary eosinophilia, IgE production, and Th2-type cytokine production in an ovalbumin-induced allergic asthma: Activation of STAT-6 and JNK is inhibited by chlorogenic acid. *Int Immunopharmacol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;10(10):1242–8. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2010.07.005>
87. KING A, YOUNG G. Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. *J Am Diet Assoc*. 1999;99(2):213–8.
88. Melillo De Magalhães P, Dupont I, Hendrickx A, Joly A, Raas T, Dessy S, et al. Anti-inflammatory effect and modulation of cytochrome P450 activities by *Artemisia annua* tea infusions in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chem*. 2012;134(2):864–71.
89. Hwang SJ, Kim Y-W, Park Y, Lee H-J, Kim K-W. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflamm Res* [Internet]. 2014;63(1):81–90. Recuperado de: <http://link.springer.com/10.1007/s00011->

90. Zatorski H, Sałaga M, Zielińska M, Piechota-Polańczyk A, Owczarek K, Kordek R, et al. Experimental colitis in mice is attenuated by topical administration of chlorogenic acid. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2015;388(6):643–51.
91. Yun N, Kang J-W, Lee S-M. Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. *J Nutr Biochem* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;23(10):1249–55. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286311002245>
92. Chauhan PS, Satti NK, Sharma P, Sharma VK, Suri KA, Bani S. Differential effects of chlorogenic acid on various immunological parameters relevant to rheumatoid arthritis. *Phyther Res*. 2012;26(8):1156–65.
93. Sandoval-Chacón M, Thompson JH, Zhang X, Liu X, Mannick EE. Antiinflammatory actions of cat ' s claw : the role of NF-kB. *Aliment Pharmacol Ther*. 1998;12:1279–89.
94. Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ, Hammond GB. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry* [Internet]. janeiro de 2005 [citado 16 de setembro de 2015];66(1):5–29. Recuperado de: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-11844297322&partnerID=tZOtx3y1>
95. Piscoya J, Rodriguez Z, Bustamante SA, Okuhama NN, Miller MJS, Sandoval M. Efficacy and safety of freeze-dried cat's claw in osteoarthritis of the knee: Mechanisms of action of the species *Uncaria guianensis*. *Inflamm Res* [Internet]. 2001;50(9):442–8. Recuperado de: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034834257&partnerID=tZOtx3y1>
96. Hogan SP. Recent advances in eosinophil biology. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;143(SUPPL. 1):3–14.
97. van Rensen ELJ, Evertse CE, van Schadewijk WAAM, van Wijngaarden S, Ayre G, Mauad T, et al. Eosinophils in bronchial mucosa of asthmatics after allergen challenge: effect of anti-IgE treatment. *Allergy*. Denmark; janeiro de 2009;64(1):72–80.
98. Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, et al. Effects of nitric oxide synthases in chronic allergic airway inflammation and

- remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. United States; outubro de 2006;35(4):457–65.
99. Angeli P, Prado CM, Xisto DG, Silva PL, Passaro CP, Nakazato HD, et al. Effects of chronic L-NAME treatment lung tissue mechanics, eosinophilic and extracellular matrix responses induced by chronic pulmonary inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. United States; junho de 2008;294(6):L1197-205.
 100. Toledo AC, Sakoda CPP, Perini A, Pinheiro NM, Magalhães RM, Grecco S, et al. Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Br J Pharmacol*. 2013;168(7):1736–49.
 101. Rogerio AP, Dora CL, Andrade EL, Chaves JS, Silva LFC, Lemos-Senna E, et al. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacol Res*. 2010;61(4):288–97.
 102. Davoine F, Lacy P. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: Emerging roles in immunity. *Front Immunol*. 2014;5(NOV):1–17.
 103. Morel LJ de F, Azevedo BC de, Carmona F, Contini SHT, Teles AM, Ramalho FS, et al. A standardized methanol extract of *Eclipta prostrata* (L.) L. (Asteraceae) reduces bronchial hyperresponsiveness and production of Th2 cytokines in a murine model of asthma. *J Ethnopharmacol* [Internet]. Elsevier; 2016; Recuperado de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874116323121>
 104. Yao J, Jiang M, Zhang Y, Liu X, Du Q, Feng G. Chrysin alleviates allergic inflammation and airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 15 de janeiro de 2016 [citado 5 de fevereiro de 2016];32:24–31. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576916300066>
 105. Oeser K, Maxeiner J, Symowski C, Stassen M, Voehringer D. T cells are the critical source of IL-4/IL-13 in a mouse model of allergic asthma. *Allergy* [Internet]. 2015;70(11):1440–9. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26214396>
 106. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. United States; dezembro de 1998;282(5397):2258–61.
 107. Emson CL, Bell SE, Jones A, Wisden W, McKenzie AN. Interleukin (IL)-4-independent induction of immunoglobulin (Ig)E, and perturbation of T cell

- development in transgenic mice expressing IL-13. *J Exp Med* [Internet]. 1998;188(2):399–404. Recuperado de: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=9670052&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/1B32EFA5-7F17-4597-A1DE-A575CF8CF821>
108. Sheng Y, Bryngelsson C, Pero RW. Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *J Ethnopharmacol*. Ireland; fevereiro de 2000;69(2):115–26.
 109. Mukhtar H, Wang ZY, Katiyar SK, Agarwal R. Tea components: antimutagenic and anticarcinogenic effects. *Prev Med (Baltim)*. United States; maio de 1992;21(3):351–60.
 110. Santa Maria A, Lopez A, Diaz M., Albán J, Galán de Mera A, Vicente Orellana J., et al. Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays in vitro. *J Ethnopharmacol* [Internet]. agosto de 1997 [citado 12 de fevereiro de 2016];57(3):183–7. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874197000676>
 111. Zhou W, Cheng X, Zhang Y. Effect of Liuwei Dihuang decoction, a traditional Chinese medicinal prescription, on the neuroendocrine immunomodulation network. *Pharmacol Ther*. England; junho de 2016;162:170–8.
 112. Falkiewicz B. Vilcacora [*Uncaria tomentosa* (Willd .) DC . and *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmel .] – a review of published scientific literature. 2001;2(4):305–16.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

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

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

Ribeirão Preto, 24 de junho de 2013.

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

ANEXO B – Protocolo de Homogenato Pulmonar

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

O preparo do inibidor de protease será de 1 comprimido em 50 ml de PBS 1x estéril, que deve ser preparado em fluxo laminar.

APÊNDICES

Apêndice A: (a) Perfil cromatográfico da amostra padrão de Ácido clorogênico obtido por UPLC-DAD. (b) Perfil cromatográfico da amostra padrão de Ácido clorogênico obtido por UPLC-MS

Apêndice B: (a) Perfil cromatográfico do extrato bruto aquoso de *Uncaria guianensis* obtido por UPLC-DAD. (b) Perfil cromatográfico do extrato bruto aquoso de *Uncaria guianensis* obtido por UPLC-MS (RT = 9.70 min – ácido clorogênico).

Apêndice C: (a) Perfil cromatográfico do extrato bruto hidroetanólico de *Uncaria guianensis* obtido por UPLC-DAD. (b) Perfil cromatográfico do extrato bruto hidroetanólico de *Uncaria guianensis* obtido por UPLC-MS (RT = 9.70 min – ácido clorogênico)

Apêndice D: Cromatogramas TIC obtidos por UPLC-MS em modo negativo de análise: **a)** Perfil cromatográfico do extrato bruto UGA; **b)** Perfil cromatográfico referente ao padrão de Ácido Quínico.

Apêndice E: Cromatogramas TIC obtidos por UPLC-MS em modo negativo de análise: **a)** Perfil cromatográfico do extrato bruto UGH; **b)** Perfil cromatográfico referente ao padrão de Ácido Quínico.

Apêndice F: Espectros de massas Full-Scan em modo negativo de análise obtido a partir da análise por UPLC-MS: **a)** Amostra padrão de Ácido Quínico ($T_R = 2.74$ min); **b)** Extrato bruto UGA ($T_R = 2.66$ min).

Apêndice G: Espectros de massas Full-Scan em modo negativo de análise obtido a partir da análise por UPLC-MS: **a)** Amostra padrão de Ácido Quínico ($T_R = 2.74$ min); **b)** Extrato bruto UGH ($T_R = 2.64$ min).

Apêndice H: a) e b) Perfil cromatográfico obtido por UPLC-MS dos padrões de mitrafilina e isomitrafilina, respectivamente. c) Perfil cromatográfico obtido por UPLC-MS do extrato bruto hidroetanólico de *Uncaria guianensis*, d) Perfil cromatográfico obtido por UPLC-MS do extrato bruto aquoso de *Uncaria guianensis*.