



**Universidade Federal da Bahia**  
**Instituto de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos**  
**dos Órgãos e Sistemas**

**TATIANE DE OLIVEIRA TEIXEIRA**

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DA *ALLIUM CEPA* L. E DO  
FLAVONOIDE QUERCETINA EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE ALERGIA RESPIRATÓRIA**

Salvador

2011

**TATIANE DE OLIVEIRA TEIXEIRA**

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DA *ALLIUM CEPA* L. E DO  
FLAVONOIDE QUERCETINA EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE ALERGIA RESPIRATÓRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. Área de Concentração: Distúrbio dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Profa. Dra. Camila A. Viana de Figueiredo.

Co-orientadora: Profa. Dra. Darizy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos

Salvador  
2011

T266p

Teixeira, Tatiane de Oliveira.

Potencial terapêutico da *Allium cepa* L. e do Flavonóide quercetina em modelo experimental de alergia respiratória / Tatiane de Oliveira Teixeira.

– Salvador: 2011.

82f.: Il.; 30cm.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Alexandrina Viana de Figueiredo

Co-Orientadora: Profa. Dra. Darizy Flávia S. A. de Vasconcelos

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

1. Asma – *Blomia Tropicalis*. 2. *Allium cepa* L. 3. Quercetina.

I. Figueiredo, Camila Alexandrina Viana de. II. Vasconcelos, Darizy Flávia S. A. de. III. UFBA. IV. Título.

CDU 616.248-053.2

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Aos seis dias do mês de dezembro de dois mil e onze, reuniu-se em sessão pública o Colegiado do Programa de Pós-Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas com a finalidade de apreciar a Defesa Pública da Dissertação da Pós-graduanda **Tatiane de Oliveira Teixeira**, através da Comissão Julgadora composta pelos Professores **Darizy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos**, **Eudes da Silva Velozo** e **Karina Carla de Paula Medeiros**. O título da Dissertação apresentado foi **POTENCIAL TERAPÊUTICO DA *Allium cepa* L. E DO FLAVONÓIDE QUERCETINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE ALERGIA RESPIRATÓRIA**. Ao final dos trabalhos os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:


Profa. Dra. Darizy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos APROVADA


Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo APROVADO

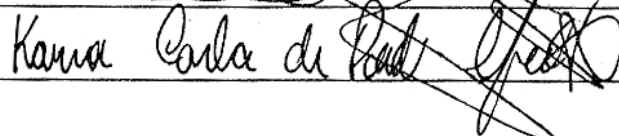
Profa. Dra. Karina Carla de Paula Medeiros APROVADO

Franqueada a palavra, como não houve quem desejasse fazer uso da mesma lavrou-se a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada por todos.

Salvador, 06 de dezembro de 2011

Profa. Dra. 

Prof. Dr. 

Profa. Dra. 

**TATIANE DE OLIVEIRA TEIXEIRA**

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DA *ALLIUM CEPA* L. E DO  
FLAVONOIDE QUERCETINA EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE ALERGIA RESPIRATÓRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. Área de Concentração: Distúrbio dos Órgãos e Sistemas.

**Comissão Examinadora**

---

**Darizy Flávia Silva Amorim de Vasconcelos**  
(Co-orientadora)

Doutora em Produtos Naturais e sintéticos Bioativos – Farmacologia, pela Universidade Federal da Paraíba, Brasil (2008)  
Professor Adjunto I da Universidade Federal da Bahia (UFBA)

---

**Eudes Silva Velozo**

Doutor em Química pela Universidade Federal de São Carlos, Brasil (1995)  
Professor Associado II da Universidade Federal da Bahia (UFBA)

---

**Karina Carla de Paula Medeiros**

Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba, Brasil (2009)  
Professor Adjunto II da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Salvador  
2011

Dedico este trabalho à minha família, sempre muito presente e essencial na minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda a minha família por ter acreditado em mim, permitindo que hoje eu tenha mais um sonho realizado.

A minha mãe, Tânia Lúcia e ao meu pai, Gilberto agradeço pelo apoio e amor incondicional.

As minhas irmãs Tínia e Thaísa, pela compreensão e aos meus sobrinhos Pedro, Júlia e a minha afilhada, Clara; pela alegria e coragem transmitidas, o que me ajudou a ter força para superar o cansaço e as limitações.

A minha avó Dilza, pelos ensinamentos da vida e o carinho.

Aos meus amigos, por compreenderem as minhas ausências e me apoiarem.

A Camila, minha orientadora, exemplo de coragem, perseverança e sucesso; obrigada pela confiança, incentivo e pela insistência na busca da excelência que um trabalho científico exige.

A Darizy, minha co-orientadora, por ter me apoiado. Seus ensinamentos e estímulo científico foram fundamentais.

A professora Neuza, pelo aprendizado que me propiciou e colaboração.

Aos meus colegas do LAA, pelo apoio e incentivo.

A minha amiga e dupla, Keina, que atravessou comigo esta fase importante, com companheirismo e paciência, principalmente nos momentos difíceis. A Ana Tereza, Tamires, Shirleide, Norma, Ryan e Marta pelo carinho e colaboração.

Aos meus colegas da turma do mestrado, pelo inestimável companheirismo.

A colaboração da FIOCRUZ e principalmente a Luciana.

Ao Prof. Eudes Velozo, por me receber e me guiar em seu laboratório, LAPEMM.

Agradeço também a Railda e a todos que, gentilmente, me auxiliaram.

Ao Laboratório de tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, na pessoa do Prof. Eduardo de J. Oliveira.

Ao programa de Pós-graduação dos Órgãos e Sistema, na pessoa do Prof. Roberto Paulo Correia de Araújo.

A FAPESB pelo financiamento e a Universidade Federal da Bahia, por me proporcionar aprendizado e crescimento científico.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi



TEIXEIRA, Tatiane de Oliveira. **Potencial terapêutico da *Allium cepa* L. e do flavonoide quercetina, em modelo experimental de alergia respiratória.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

## RESUMO

A asma é uma das doenças crônicas mais prevalentes em todo mundo, que se caracteriza por uma inflamação pulmonar crônica. É estimulada por alérgenos ambientais e, até o momento, não existem drogas que induzam a remissão definitiva dessa patologia. Os corticosteroides e broncodilatadores são as drogas mais utilizadas, pois agem no controle dos sintomas, embora produzam múltiplos efeitos colaterais. Algumas plantas, como a espécie *Allium cepa* L., são popularmente usadas para o tratamento da asma. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial terapêutico (anti-inflamatório e broncodilatador) do extrato metanólico da *Allium cepa* L. (*AcE*) e seu flavonoide quercetina (*Qt*), *in vitro* e *in vivo*. Nos ensaios *in vitro*, foram avaliados os efeitos da *AcE* e *Qt* sobre a produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-13 em cultura de esplenócitos, sobre a produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoneais e sobre a capacidade de relaxamento do músculo liso da traqueia isolada independente de epitélio de camundongos. Nos experimentos *in vivo*, camundongos AJ foram sensibilizados (100µg por animal - s.c.) e desafiados (10µg por animal - i.n) com extrato de ácaro de *Blomia tropicalis* (*BtE*). Os animais sensibilizados foram tratados ou não com *AcE* (100 ou 1000mg/Kg) ou *Qt* (30mg/Kg) para análise dos seguintes parâmetros: número de células totais no lavado broncoalveolar (BAL); atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) no pulmão; nível sérico total de IgE; níveis de IL-4, IL-5, IL-13 no BAL; e alterações histopatológicas no pulmão. *In vitro*, houve uma redução significativa em relação ao controle positivo, da produção de óxido nítrico e na produção de citocinas inflamatórias tratadas com diferentes concentrações de *AcE* ou *Qt*. Adicionalmente, pôde-se observar um relaxamento da traqueia tratada com *AcE* ou *Qt*. *In vivo*, houve uma redução no número total de células no BAL em animais sensibilizados que receberam tratamento com *AcE* (100 ou 1000mg/Kg), bem como com *Qt* (30mg/Kg), quando comparados aos animais alérgicos não tratados. A EPO, no pulmão, também sofreu supressão no tratamento com *AcE* (100 ou 1000mg/Kg). O tratamento com *AcE* (1000mg/Kg) ou *Qt* (30mg/Kg) conseguiu reduzir IL-4 e IL-5 no BAL. No entanto, não houve redução significativa dos níveis séricos de IgE e dos níveis de IL-13. O tratamento com *AcE* (100 ou 1000mg/Kg) reduziu a densidade de células no pulmão e a produção de muco. Os resultados obtidos nesta pesquisa sugerem que a *Allium cepa* L. e a quercetina possuem potencial como importantes drogas antiasmáticas, com propriedades imunomodulatória e broncodilatadora, podendo ser futuras candidatas a drogas para compor o arsenal terapêutico dessa patologia.

**Palavras-chave:** asma, *Blomia tropicalis*, produtos naturais, *Allium cepa* L., quercetina.

TEIXEIRA, Tatiane de Oliveira. **Therapeutic potential of *Allium cepa* L. and the flavonoid quercetin in an experimental model of respiratory allergy.** Thesis (Master) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2011.

## ABSTRACT

Asthma is one of the most prevalent chronic diseases worldwide, which is characterized by chronic pulmonary inflammation. It is stimulated by environmental allergens and, so far there are no drugs that induce permanent remission of this disease. Corticosteroids and bronchodilators are the most commonly used drugs, because they act in controlling symptoms, however producing multiple side effects. Some plants, such as species *Allium cepa* L., are popularly used for the treatment of asthma. In this context, the objective of this study was to assess the therapeutic potential (anti-inflammatory and bronchodilator) of the methanol extract of *Allium cepa* L. (*AcE*) and its flavonoid quercetin (Qt) *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, were evaluated the effects of *AcE* and Qt on the production of IL-4, IL-5, IL-13 cytokines, in cultures of splenocytes on the nitric oxide production in culture of peritoneal macrophages and the ability to relaxation of tracheal smooth muscle isolated independent epithelium of mice.. In *in vivo* experiments, AJ mice were sensitized (100µg per animal - sc) and challenged (10mg per animal - in) with extract of mite *Blomia tropicalis* (*BtE*). The sensitized animals were treated or not with *AcE* (100 or 1000mg/Kg) or Qt (30mg/Kg) to analyze the following parameters: total number of cells in the bronchoalveolar lavage (BAL), activity of eosinophil peroxidase (EPO) in the lung; total serum IgE levels, levels of IL-4, IL-5, IL-13 in BAL, and histopathological changes in the lung. *In vitro*, there was a significant reduction compared to positive control, the production of nitric oxide and the production of inflammatory cytokines treated with different concentrations of *AcE* or Qt. Additionally, it was observed a relaxation of tracheal treated with *AcE* or Qt. *In vivo*, there was a reduction in the total number of BAL cells in sensitized animals that were treated with *AcE* (100 or 1000mg/Kg) and Qt (30mg/Kg) when compared to untreated allergic animals. EPO, in lung, also suffered deletion in the treatment with *AcE* (100 or 1000mg/Kg). Treatment with *AcE* (1000mg/Kg) or Qt (30mg/Kg) was able to reduce IL-4 and IL-5 in BAL. However, there was no significant reduction in serum IgE levels and levels of IL-13. The treatment with *AcE* (100 or 1000mg/Kg) reduced density of cells in the lung and mucus production. The results of this research suggest that *Allium cepa* L. and quercetin have significant potential as drugs Antiasthma with immunomodulatory and bronchodilatory properties and may be future candidates for drugs to make up the therapeutic arsenal of this pathology.

**Keywords:** asthma, *Blomia tropicalis*, natural products, *Allium cepa* L., quercetin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Drogas anti-inflamatórias e broncodilatadoras e suas estruturas químicas, usadas na terapia antiasmática.....	23
Figura 2 – Cronograma de medicamentos para a asma.....	24
Figura 3 – Estrutura química das principais classes de flavonoides.....	31
Figura 4 – Estrutura básica dos flavonóis e quercetina .....	32
Figura 5 – Preparo do extrato metanólico da <i>Allium cepa</i> L.(AcE).....	41
Figura 6 – Desenho experimental do protocolo de sensibilização e desafio.....	42
Figura 7 – Desenho experimental do protocolo de sensibilização e tratamento com AcE e quercetina.....	43
Figura 8 – Aparato utilizado para os experimentos com anéis traqueia isolada de camundongos.....	46
Figura 9 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de contrações de traqueia isolada. ....	46
Figura 10 – Efeito do tratamento de AcE e quercetina sobre a produção de IL-4 em cultura de esplenócitos.....	51
Figura 11 – Efeito do tratamento de AcE e quercetina sobre a produção de IL-5 em cultura de esplenócitos.....	52
Figura 12 – Efeito do tratamento de AcE e quercetina sobre a produção de IL-13 em cultura de esplenócitos.....	53
Figura 13 – Efeito do tratamento de AcE e quercetina sobre a produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoneais. ....	54
Figura 14 – Efeito do tratamento de AcE sobre a musculatura lisa das vias aéreas de camundongos.....	55
Figura 15 – Efeito do tratamento de quercetina sobre a musculatura lisa das vias aéreas de camundongos. ....	56
Figura 16 – Efeito do tratamento de AcE e quercetina sobre a contagem total de células BAL e na produção da peroxidase eosinofílica do pulmão.....	57
Figura 17 – Efeito do tratamento de AcE e quercetina sobre a produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-13.....	59
Figura 18 – Efeito do tratamento de AcE e quercetina sobre a dosagem de IgE anti- <i>BtE</i> .. ..	60

Figura 19 – Efeito do tratamento de <i>AcE</i> e quercetina sobre arquitetura pulmonar de camundongos AJ, com aumento de 40X. ....	62
Figura 20 – Efeito do tratamento de <i>AcE</i> e quercetina sobre a produção de muco de camundongos AJ, com aumento de 40X. ....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS, NOTAÇÕES E SIGLAS

- AcE* – Extrato metanólico da *Allium cepa* L.
- BtE* – Extrato de *Blomia tropicalis*
- BAL – Lavado broncoalveolar
- Bk – Bradicinina
- CD4 – Grupamento de diferenciação de linfócito T auxiliar
- Cch – Carbacol
- ELISA – Ensaio imunoenzimático
- EPO – Peroxidase eosinofílica
- $E_{m\acute{a}x}$  – Relaxamento máximo
- GATA-3 – Fator de transcrição
- HRB – Hiper-reatividade brônquica
- HBSS – Hanks' balanced salt solution
- IFN- $\gamma$  – Interferon gama
- IL – Interleucina
- i.n. – Via intranasal
- IgE – Imunoglobulina tipo E
- LPS – Lipopolissacarídeo
- NF-kB – Fator nuclear potencializador de células B ativadas
- OVA – Ovalbumina
- PAS – Ácido periódico Schiff
- PBS – Solução fosfato tamponada bissódica
- PWM – Pokweed (mitógeno)
- Qt – Quercetina
- RPM – Rotações por minuto
- s.c. – Via subcutânea
- Th2 – Linfócito T auxiliar do tipo 2
- Th1 – Linfócito T auxiliar do tipo 1
- TGF- $\beta$  – Fator  $\beta$  de transformação do crescimento tumoral
- v.o. – Via oral

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA ASMA .....	19
2.2 FISIOPATOLOGIA DA ASMA .....	20
2.3 FARMACOTERAPIA DA ASMA .....	22
2.3.1 Drogas broncodilatadoras .....	24
2.3.3 Produtos naturais .....	29
2.3.3.1 <i>Allium cepa</i> L. ....	30
2.3.3.2 <i>Quercetina</i> .....	32
2.4 MODELO EXPERIMENTAL DE ALERGIA RESPIRATÓRIA .....	34
3 OBJETIVOS .....	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
4 METODOLOGIA.....	38
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	39
4.2 ANIMAIS .....	39
4.3 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO DE ÁCARO ( <i>Blomia tropicalis</i> ) .....	39
4.4 OBTENÇÃO E PREPARO DO EXTRATO DE <i>Allium cepa</i> L. E DA QUERCETINA.....	40
4.5 MODELO EXPERIMENTAL (SENSIBILIZAÇÃO, DESAFIO E TRATAMENTO) .....	41
4.5.2 Tratamento com <i>AcE</i> ou com a quercetina .....	42
4.6 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....	43
4.6.1 Protocolo experimental para investigar o potencial modulador do <i>AcE</i> e quercetina sobre a produção de citocinas de IL-4, IL-5 e IL-13, em cultura de esplenócitos .....	43
4.6.2 Protocolo experimental para investigar o potencial modulador do <i>AcE</i> e quercetina sobre a produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais .....	44
4.6.3 Protocolo experimental para investigar o potencial broncodilatador da <i>AcE</i>	

e quercetina sobre musculatura lisa das vias aéreas de camundongos .....	45
4.7 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	47
4.7.1 Protocolo experimental para investigar o potencial imunomodulador do <i>AcE</i> e quercetina em modelo murino de asma.....	47
4.7.1.1 Obtenção do lavado bronco alveolar ( <i>BAL</i> ) .....	47
4.7.1.2 Atividade de peroxidase do pulmão.....	48
4.7.1.3 Análise histopatológica do pulmão .....	48
4.7.1.4 Determinação de <i>IgE</i> específica para <i>B. tropicalis</i> .....	49
4.7.1.5 Ensaio imunoenzimático para a detecção de <i>IL-4</i> , <i>IL-5</i> e <i>IL-13</i> , no <i>BAL</i> . .....	49
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5 RESULTADOS .....	50
5.1 Efeito do <i>AcE</i> e quercetina sobre a produção de citocinas <i>IL-4</i> , <i>IL-5</i> e <i>IL-13</i> na cultura de esplenócitos.....	51
5.2 EFEITO DO <i>ACE</i> E QUERCETINA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS .....	54
5.3 EFEITO DO <i>ACE</i> E QUERCETINA SOBRE MUSCULATURA LISA DAS VIAS AÉREAS DE CAMUNDONGOS. ....	55
5.4 EFEITO DO <i>ACE</i> E QUERCETINA SOBRE A CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS NO LAVADO BRONCOALVEOLAR ( <i>BAL</i> ) E AVALIAÇÃO DA PEROXIDASE EOSINOFÍLICA ( <i>EPO</i> ) NO PULMÃO.....	56
5.5 EFEITO DO TRATAMENTO DE <i>ACE</i> E QUERCETINA SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS ( <i>IL-4</i> , <i>IL-5</i> E <i>IL-13</i> ) NO <i>BAL</i> . ....	57
5.6 EFEITO DO TRATAMENTO DE <i>ACE</i> E QUERCETINA SOBRE A DOSAGEM DE <i>IGE</i> ANTI- <i>BTE</i> NO SORO.....	60
5.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO PULMÃO .....	61
6 DISCUSSÃO .....	64
7 CONCLUSÕES .....	71
REFERÊNCIAS.....	74

# 1 INTRODUÇÃO



A asma é um problema de saúde pública que acomete mundialmente pessoas de todas as idades e cuja incidência é bastante significativa no Brasil. É responsável por grande parte do absenteísmo ao trabalho e, quando não controlada, pode se tornar fator importante com relação à piora da qualidade de vida dos pacientes. Apesar de muito estudadas, as bases da asma ainda não estão completamente compreendidas. Sabe-se que fatores genéticos e ambientais contribuem para a susceptibilidade das vias aéreas a poluentes ambientais e para a sensibilização por aeroalérgenos.

Trata-se de uma doença inflamatória crônica, cujo processo inflamatório característico é complexo e envolve múltiplas células e mediadores. Caracteriza-se por episódios reversíveis de broncoconstrição, recrutamento de células inflamatórias, lesão epitelial e remodelamento das vias aéreas. Pacientes acometidos por essa enfermidade comumente apresentam episódios recorrentes de tosse, falta de ar e sibilos na ausculta pulmonar.

A patogenia da asma é caracterizada pelo envolvimento de células inflamatórias, como mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. Algumas dessas células, como os linfócitos CD4<sup>+</sup> do tipo T *helper* 2 (Th2), após estimuladas, liberam citocinas que estão intimamente relacionadas com a inflamação alérgica, incluindo as interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), e interleucina 13 (IL-13).

Até o momento, não existem drogas que induzam a remissão definitiva da asma. Os corticosteroides, drogas das mais utilizadas, são efetivos no controle dos sintomas asmáticos e na redução da intensidade da inflamação das vias aéreas, embora parte dos asmáticos tratados por longos períodos apresentem novamente os sintomas após a suspensão da medicação, em prazos variáveis. Além disso, essas drogas produzem muitos efeitos colaterais. Nesse contexto, há a necessidade de busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento dessa patologia. O estudo de produtos naturais, tendo como base os conhecimentos ancestrais da medicina tradicional, constitui uma importante ferramenta tanto na procura de novos fármacos como na validação científica das práticas populares.

Levando-se em conta a biodiversidade da flora brasileira e sabendo que as plantas apresentam uma enorme diversidade de compostos químicos, é certo que alguns desses compostos podem revelar-se como potenciais fármacos para o tratamento das doenças alérgicas. Dentre as espécies citadas em um inquérito popular realizado por

nosso grupo de pesquisa no município de Salvador, a *Allium cepa* L. é utilizada etnofarmacologicamente para o tratamento de doenças inflamatórias, tais como a asma.

Estudos têm mostrado, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o perfil imunomodulador da *Allium cepa* L. e de um dos seus flavonoides, a quercetina. Nesse contexto, investigou-se o potencial terapêutico dessas substâncias em modelo murino de alergia respiratória. Para isso, alguns parâmetros foram avaliados, tais como: migração de células para o lavado broncoalveolar (BAL), presença de peroxidase de eosinófilos no pulmão, produção de anticorpos específicos IgE para *BtE* no soro e produção de citocinas IL-5, IL-4, IL-13 no BAL e o potencial broncodilatador em ensaios com traqueia isolada de camundongo.

Diante do exposto e considerando a relevância de se estudarem importantes drogas antiasmáticas com propriedades imunomodulatórias e broncodilatadoras, o objetivo desta investigação é estudar o uso etnofarmacológico da *Allium Cepa* L. e do seu flavonoide isolado, quercetina, na tentativa de avaliar o potencial terapêutico dessas substâncias, almejando que elas possam se tornar drogas para compor o arsenal terapêutico para a asma.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

## 2.1 EPIDEMIOLOGIA DA ASMA

A asma é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por inflamação eosinofílica, hiper-responsividade das vias aéreas inferiores e limitação variável ao fluxo aéreo (O'BYRNE, 2009). Estima-se que 300 milhões de pessoas no mundo apresentem asma e que cerca de 250 mil pessoas no mundo morram por ano devido à asma (BATEMAN et al., 2008).

Essa doença constitui um importante problema de saúde pública, uma vez que tem alta prevalência mundial. Isso pode ser observado nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, em sociedades de alta renda e costumes ocidentais (LEE, 2010; EDER, 2006; MASOLI, 2004).

Embora existam diferenças na prevalência anual em diferentes regiões demográficas, como na Europa Ocidental, América Latina, América do Norte, África, Norte e Leste Europeu (LEE, 2010), o crescente desenvolvimento e a expectativa do aumento da população mundial urbana em até 59% em 2025 reforçam a estimativa de que haverá mais de 400 milhões de pessoas com asma em 2025 (BATEMAN et al., 2008).

Na América Latina 9,9% da população tem asma e, no Brasil, 11,4% das pessoas que aqui residem sofrem com essa patologia (BATEMAN et al., 2008; MASOLI, 2005). Ela representa a 3ª causa de hospitalizações no SUS, e tanto as taxas de hospitalização quanto de mortalidade mantêm-se estáveis em níveis elevados, principalmente em estados como São Paulo, Porto Alegre, Rio de Janeiro e Bahia (RIO et al., 2002). Essa enfermidade, cuja patogênese não está completamente elucidada, não somente expõe o paciente a recorrentes hospitalizações, como representa uma elevada carga econômica para o indivíduo, a sociedade e o governo. Sendo assim, o estabelecimento de uma adequada gestão e de estratégias de prevenção da asma deve ser baseado na avaliação correta da prevalência, nos fatores de risco e nos mecanismos subjacentes ao seu desenvolvimento (LEE, 2010).

## 2.2 FISIOPATOLOGIA DA ASMA

A asma possui uma grande variedade de apresentações clínicas e seu complexo processo inflamatório envolve múltiplas células e mediadores inflamatórios. As mudanças fisiopatológicas que caracterizam a asma são desencadeadas por fatores ambientais e também pela expressão alterada de genes associados com vias de transcrição, processos inflamatórios, apoptose e proliferação celular (BATEMAN et al., 2008; COHN, 2004).

Acredita-se que a asma começa a ser definida ainda na fase intrauterina, onde fatores genéticos e ambientais geram alterações que podem permitir uma maior susceptibilidade das vias aéreas a poluentes, predispondo-as à sensibilização com aeroalérgenos (WARNER, 1998; MARTINEZ, 1999).

Sendo assim, os fatores desencadeantes da asma podem ser divididos em fatores inerentes ao indivíduo (principalmente genéticos) e fatores ambientais (BATEMAN et al., 2008; BOUSQUET et al., 2005), como a exposição a estímulos de endotoxinas bacterianas, alérgenos, fumaça de cigarro e pelos de animais. Adicionalmente, o estilo de vida do indivíduo – dieta, hábitos sociais, ambiente de trabalho, frio, exercício físico, poluição ambiental, hiperventilação, infecções virais ou bacterianas, ou até mesmo estados emocionais – são fatores de risco para o desenvolvimento da asma (BATEMAN, et al., 2008; BOUSQUET et al., 2005; LAZAAR; PANETTIERI, 2004; LIU, 2002; AIJ-KHALED et al., 2001).

Clinicamente, essa desordem gera dispneia, tosse, espirro intermitente e opressão torácica. Entretanto, o aspecto clínico pode ser variável e, histopatologicamente, apresentar diferentes padrões celulares (HOWARTH, 1997).

A patogenia da asma é caracterizada pelo envolvimento dos linfócitos CD4<sup>+</sup>, que, estimulados, podem se diferenciar em subpopulações de células efectoras T auxiliares de tipo 1 (Th1) e células T auxiliares de tipo 2 (Th2). A polarização Th2, na asma atópica, estimula as respostas mediadas por anticorpos IgE, ativa mastócitos, promove a eosinofilia tecidual e a hiper-reatividade brônquica. O aumento do IgE faz com que ocorra a ligação desse anticorpo aos mastócitos que, ativados, liberam mediadores e citocinas. Os mediadores inflamatórios, produzidos e liberados mediante uma lesão tecidual, caracterizam e modulam o processo inflamatório. São eles:

histamina, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetária, bradicinina, óxido nítrico, neuropeptídeos e citocinas (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O óxido nítrico (NO), produzido por macrófagos, é uma molécula importante no processo de sinalização inflamatória. O aumento dessa substância pode levar não só à produção de citocinas inflamatórias, como à lesão tecidual (PARK, 2008). Essa substância atua gerando efeitos desfavoráveis, característicos da asma, como vasodilatação e aumento do edema da mucosa brônquica (COSTA, 1999).

Após a exposição ao alérgeno e a subsequente sensibilização, ocorre a liberação de um grupo de citocinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e GM-CSF), características de células Th2, que promovem a ativação, a proliferação de células do sistema imunológico e o recrutamento delas para as vias aéreas (FINKELMAN, 2010). O início da produção de IL-4, por exemplo, regula células e moléculas necessárias para o desenvolvimento da inflamação brônquica que caracteriza a asma (WARNER et al., 1998).

Após estímulos específicos, a IL-4 é produzida pelos linfócitos CD4+, e a expressão excessiva de IL-4 nos pulmões produz uma inflamação com a presença de linfócitos e eosinófilos. Essa citocina, além de direcionar o desenvolvimento de células Th2, é importante na produção de IgE (RANKIN, 1996). A alta produção de IL-13 nos pulmões também provoca inflamação, com presença marcante de eosinófilos, mastócitos e linfócitos, bem como o aumento da produção de muco, da hiper-reatividade brônquica (HRB) e fibrose das vias aéreas, o que suporta a hipótese do importante papel dessa citocina como mediadora da asma (WILLS-KARP, 1999).

O recrutamento de eosinófilos, nas vias aéreas, é uma característica da asma. Essas células, de grande importância nas alergias, por força da secreção de suas proteínas tóxicas, podem danificar a mucosa das vias aéreas. Sendo assim, o grau de eosinofilia está fortemente correlacionado com a gravidade da doença. Essa inflamação é mediada por linfócitos T, que, ativados, secretam a citocina IL-5 (EUM et al, 2003). A IL-5 é responsável pelo crescimento, pela diferenciação e ativação dos eosinófilos; regula a inflamação e a hiper-reatividade brônquica (BOUSQUET et al., 2001).

A obstrução das vias aéreas e os sintomas respiratórios característicos da patologia estão relacionados à inflamação, broncoconstrição e ao remodelamento das vias aéreas. A inflamação é uma característica consistente da asma. A elevada contractilidade do músculo liso brônquico, aspecto característico da asma brônquica

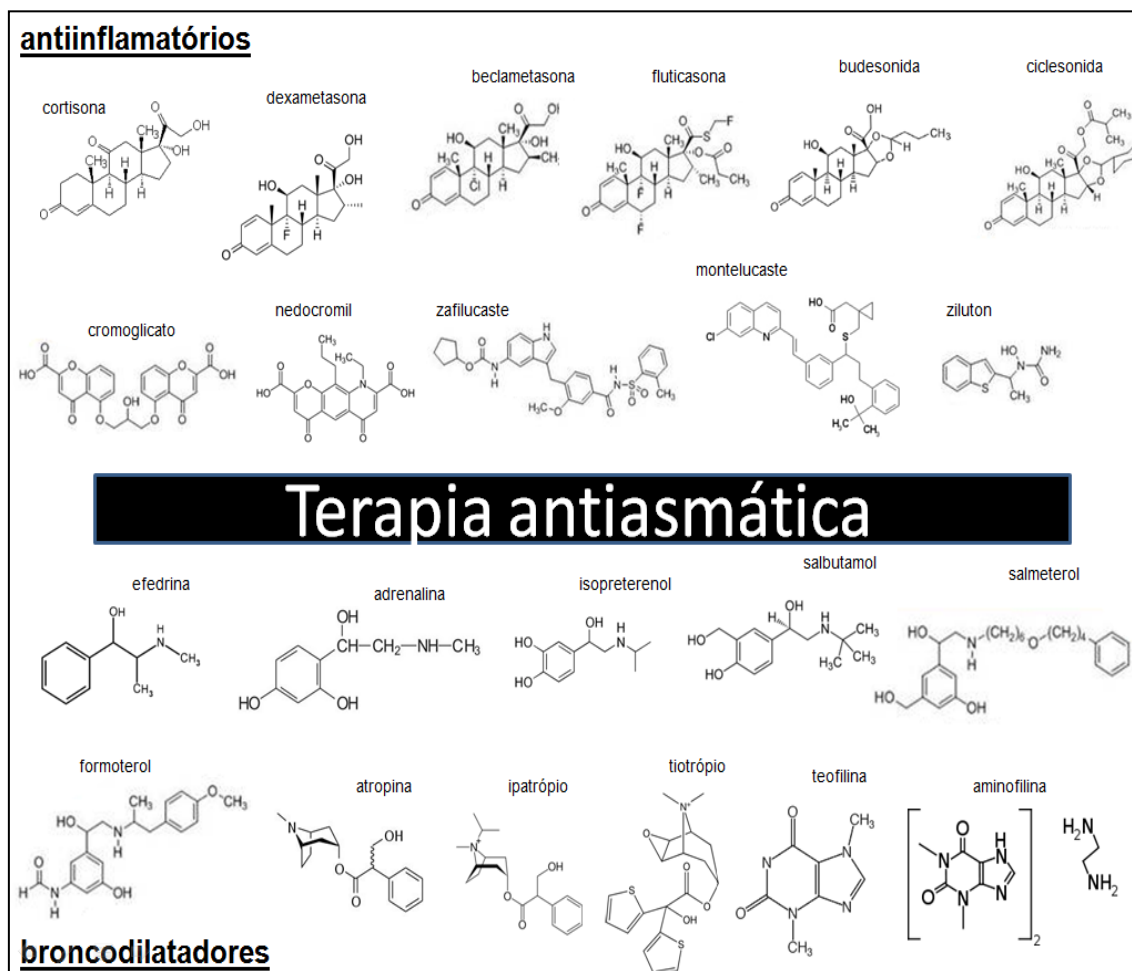
alérgica, tem sido considerada uma das causas da hiper-responsividade das vias aéreas (CHIBA et al, 2010). O remodelamento é um dos determinantes da gravidade e da irreversibilidade da redução da luz brônquica. Nesse evento, ocorre hiperplasia de células caliciformes, fibrose subepitelial, deposição de colágeno, hiperplasia das glândulas mucosas, hipertrofia do músculo liso e mudanças na matriz extracelular (JOSKOVA, 2011; BATEMAN, 2008; COHN, 2004; HOWARTH, 1997).

Os principais sintomas decorrentes de processos fisiológicos da asma manifestam-se geralmente à noite ou no início da manhã. Esses eventos podem ser reversíveis espontaneamente ou com tratamento farmacológico (BATEMAN et al., 2008). Embora a maioria dos pacientes possa obter algum nível de alívio sintomático com o uso de medicações atualmente usadas para essa patologia, nenhuma pode prevenir a asma, e uma proporção significativa de pacientes continua a sofrer com os sintomas dessa doença, sendo urgente a necessidade de novas terapias mais eficazes (CORRÊA, 2008; TAYLOR, 2008).

### 2.3 FARMACOTERAPIA DA ASMA

Os fármacos broncodilatadores foram os primeiros utilizados clinicamente para o tratamento da asma brônquica. O reconhecimento da asma como uma resposta inflamatória, fruto do avanço da imunofarmacologia, da biologia molecular e da engenharia genética, permitiu a identificação de novos alvos terapêuticos úteis para seu tratamento. Atualmente, existem duas principais categorias de fármacos utilizados no tratamento da asma: broncodilatadores e agentes anti-inflamatórios (LIMA et al., 2002; CORRÊA, 2008) (Figura 1).

Figura 1 – Drogas anti-inflamatórias e broncodilatadoras e suas estruturas químicas, usadas na terapia antiasmática.

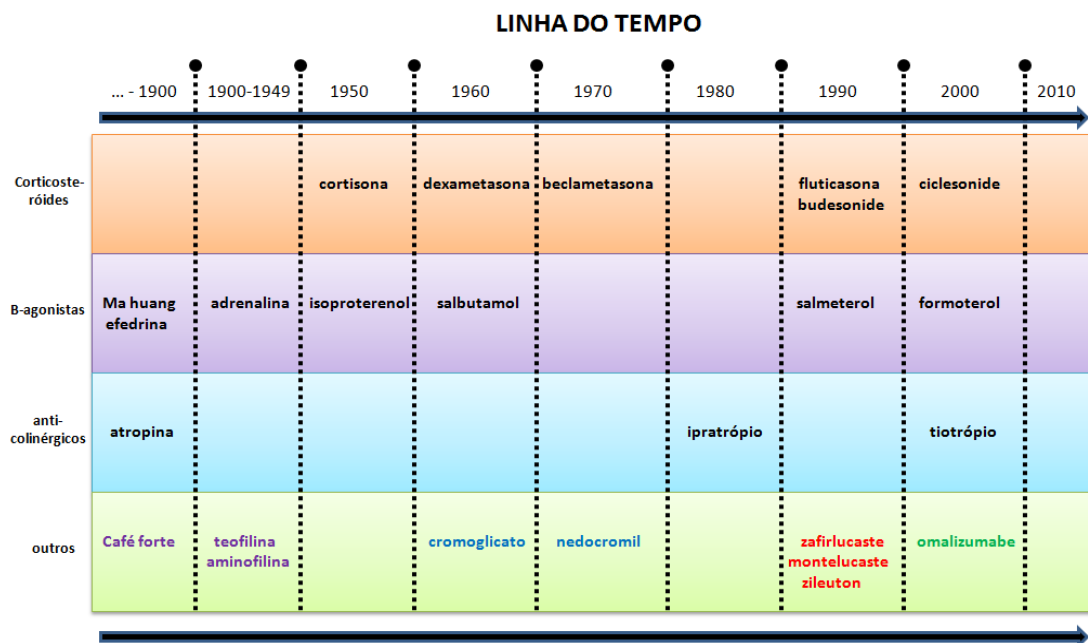


Fonte: Adaptado de LIMA e LIMA, 2009.

O cronograma apresentado na Figura 2 mostra como são classificadas as drogas anti-inflamatórias e broncodilatadoras usadas na terapia contra a asma e o seu desenvolvimento no decorrer do tempo.



Figura 2 – Cronograma de medicamentos para a asma. Na categoria outros, a classe de drogas em roxo são xantinas; em azul, cromonas; em vermelho, antileucotrienos; e em verde, anticorpo anti-IgE.



Fonte: Adaptado de MULLANE, 2011.

Os broncodilatadores (agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, anticolinérgicos e metilxantinas) e agentes anti-inflamatórios (corticosteroides, cromonas, antileucotrienos e anticorpo antiimunoglobulina E) geralmente são associados no tratamento da asma. Essa combinação é a terapia mais usada para o tratamento dessa patologia (TAYLOR, 2008; CORRÊA, 2008).

### 2.3.1 Drogas broncodilatadoras

Fármacos broncodilatadores são constantemente utilizados na terapêutica antiasmática. Essas drogas estão classificadas em agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, anticolinérgicos e metilxantinas. Os agonistas  $\beta$ -adrenérgicos podem se dividir em catecolaminas (adrenalina e isopreterenol) e em resorcinóis (salbutamol, salmeterol, formoterol) (Figura 2). A primeira droga usada para causar broncodilatação foi uma erva chinesa a MA huang, cujo princípio ativo é a efedrina (Figura 1), que age estimulando a liberação de catecolaminas endógenas. Mais tarde, a adrenalina (Figura

1) foi identificada e sintetizada para o tratamento da asma. As drogas  $\beta$ -adrenérgicas são eficientes nas crises de broncoespasmo, embora, por agirem sobre receptores  $\beta_1$  (cardíacos) e  $\beta_2$  (respiratórios), desencadeiem efeitos colaterais importantes, como taquicardia e hipertensão arterial. Em 1951, o isopreterenol (Figura 1) foi introduzido no mercado e, por vinte anos, foi usado como droga de primeira escolha para aliviar os sintomas da asma (FARIA, 2006; MULLANE, 2011).

Contudo, somente em 1968, iniciou-se o uso de drogas mais seguras, os resorcinóis, que possuem seletividade para os receptores  $\beta_2$ . Fármacos como salbutamol, salmeterol e formoterol (Figura 1) passaram a ser utilizados devido à potência aumentada e maior duração de ação. Porém o uso regular desses medicamentos tem sido relacionado à diminuição do controle dos sintomas, perda do efeito broncodilatador, aumento da hiper-reatividade brônquica e perda ou diminuição da função pulmonar (SUISSA, 1994; ZANONI, 2002; MULLANE, 2011).

O anticolinérgico mais utilizado para combater os sintomas da asma é o brometo de ipratrópio (Figura 1), um antagonista muscarínico não seletivo, de ação tópica. A atropina (Figura 1), em 1869, foi a primeira dessa classe de medicamentos a mostrar resultados positivos no tratamento da asma. A identificação de cinco subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5) levou à busca de agentes que antagonizassem apenas os M1 e M3, envolvidos na broncoconstrição, para evitar alguns dos efeitos colaterais relatados (MULLANE, 2011).

Após Henry Salter, em 1860, relacionar o uso do café forte preto ao alívio dos sintomas da asma, as metilxantinas, outra classe de drogas, começaram a ser usadas para tratar essa patologia. A teofilina (Figura 1) é um broncodilatador fraco, com uma janela terapêutica estreita, embora maiores benefícios tenham sido descritos quando essas drogas são associadas aos corticosteroides inalados (BARNES, 2003; MULLANE, 2011).

Assim como as metilxantinas de liberação lenta, os agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos de longa duração também são usados em associações com drogas anti-inflamatórias. Sendo assim, pode-se destacar a necessidade da associação de drogas broncodilatadoras com as anti-inflamatórias para a obtenção de uma melhor resposta terapêutica (FARIA, 2006).

### 2.3.2 Drogas anti-inflamatórias

A severidade da inflamação nas vias aéreas geralmente se correlaciona com a gravidade da doença. A atenção, nos últimos 30 anos, tem se concentrado sobre os mecanismos desencadeadores da inflamação nas vias aéreas e a sobre a busca por novas terapias que possam suprimir o seu desenvolvimento (MULLANE, 2011).

A inflamação crônica característica da asma constitui o principal mecanismo fisiopatogênico dessa patologia. Sendo assim, apesar de ainda serem usados em associação com os broncodilatadores, os anti-inflamatórios tornaram-se a base do tratamento dessa patologia. Essas drogas modulam o desenvolvimento da inflamação brônquica e têm uma ação profilática. As drogas moduladoras incluem corticosteroides, antileucotrienos, cromonas (MOURA, 2002) e omalizumabe, um anticorpo monoclonal anti-imunoglobulina E (ZIETKOWSKI, 2011).

Os corticosteroides foram sintetizados pela primeira vez em 1948 por Merk e Co. Em 1950 (Figura 2), quando se tornou mais disponível, começaram os primeiros estudos em asmáticos. Apesar de estudos relatarem benefícios da via oral, foram observados também alguns efeitos colaterais graves (MULLANE, 2011).

O mecanismo de ação dos corticosteroides está baseado, principalmente, na sua ação sobre o DNA, modulando a transcrição gênica. Apesar de esse ser o efeito principal dessa classe de drogas, há evidências crescentes de que existem efeitos que não são mediados por indução ou repressão de genes. Tais efeitos podem ser específicos, mediados por receptores seletivos de membrana, e não específicos, que interagiriam diretamente com as membranas biológicas. A ação sobre o DNA pode inibir ou ativar a transcrição de vários genes envolvidos nas respostas imunoinflamatórias, interferindo, dessa forma, em substâncias fundamentais para a inflamação, como citocinas, óxido nítrico, ciclooxigenase, fosfolipase A2, elastase, colagenase, ativador de plasminogênio, bem como nas prostaglandinas e nos leucotrienos, com os subsequentes eventos por eles desencadeados. Além disso, os corticosteroides inibem a cascata de ativação da ciclooxigenase I e II, potencializando o efeito anti-inflamatório (RHEN, 2005; BAMBERGER et al., 1996; BUTTGEREIT et al., 1999).

A administração dessas substâncias ocorre em pacientes diagnosticados com asma, melhorando o prognóstico em longo prazo, ou prevenindo o remodelamento

brônquico, embora a quantidade de reações adversas e sua intensidade sejam o bastante para que essa classe de medicamentos seja motivo de muito desconforto entre as pessoas que as usam (SPAHN, 2002). A utilização prolongada de corticosteroides leva ao risco aumentado de náuseas, cefaleias, arritmias cardíacas, convulsões, efeitos cardiovasculares indesejáveis, osteoporose, distúrbios metabólicos graves, alteração no crescimento e no comportamento em crianças (CORRÊA, 2008; BARNES, 2006; RANG et al., 2004).

A dexametasona (Figura 1) foi a primeira a demonstrar atividade antiasmática por inalação, embora com pouca seletividade pulmonar. A beclametasona (Figura 1) inalada, entretanto, apresentava seus efeitos confinados às vias aéreas e, em 1970, começaram os ensaios clínicos com pacientes asmáticos. Desde então, outros corticosteroides inalatórios como fluticasona, budesonida e ciclesonida (Figura 1), foram desenvolvidos e, com o seu uso, pôde-se observar uma limitação dos efeitos colaterais sistêmicos (SNEADER, 2005) (Figura 2).

Apesar do investimento e do enorme esforço das pesquisas, poucos medicamentos desenvolvidos representam diferentes alvos terapêuticos. Dentre os mais inovadores, destacam-se os antileucotrienos (antagonistas CysLT1) zafirlucaste e montelucaste (Figura 1) (MULLANE, 2011).

A partir de 1979, iniciaram-se pesquisas para encontrar enzimas inibidoras da via dos leucotrienos e antagonista de seus receptores (MULLANE, 2011). Dois receptores foram inicialmente identificados (CysLT1 e CysLT2), mas, devido a alguns efeitos tóxicos do CysLT2, o antagonista de receptor CysLT1 tem sido o mais bem sucedido. O zafirlucaste foi o primeiro antagonista do receptor CysLT1 a ser aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) (Figura 2)(BERNSTEIN, 1998).

O zileuton (Figura 1) é um inibidor da 5-lipoxigenase e, devido aos seus efeitos tóxicos, principalmente no fígado, tem uso limitado (MULLANE, 2011). Essa classe de drogas atua reduzindo a produção de leucotrienos, impedindo a sua ligação com seus receptores ou inibindo a ação da 5-lipoxigenase. Os principais efeitos dos leucotrienos incluem: broncoconstrição, aumento da permeabilidade vascular, produção de muco, liberação de enzimas lisossômicas, quimiotaxia, ativação de leucócitos e vasoconstrição da musculatura lisa, o que reflete seu envolvimento na fisiopatologia da asma (MELILLO, 2001).

As Cromonas (cromoglicato dissódico) foram descobertas no Reino Unido e, em 1967 (Figura 2), foram introduzidas na prática clínica. Porém, um estudo demonstrou que a eficácia do cromoglicato dissódico, em asma persistente, não pode ser confirmada (GUEVARA, 2006). Depois o nedocromil (Figura 1), e apesar de se buscar uma versão melhorada dessas drogas e de ensaios clínicos mostrarem sua ação sobre células e mediadores, o mecanismo de ação dessa classe de fármacos ainda está sendo desvendado (MULLANE, 2011).

Tendo conhecimento sobre a importância da IgE nas reações desencadeadas pela asma, foi desenvolvido o omalizumabe, um anticorpo monoclonal anti-imunoglobulina E. Essa droga, usada para o tratamento da asma atópica de pacientes que não conseguem um controle com a terapia existente, foi aprovada em junho de 2003 pelo FDA (MULLANE, 2011).

O omalizumabe diminui a ação da IgE sérica livre, unindo-se a essa imunoglobulina e impedindo, assim, o desencadeamento da cascata inflamatória e a liberação de mediadores inflamatórios modulados por ela (ZIETKOWSKI, 2011).

Apesar do grande empenho das pesquisas científicas nos últimos 30 anos, apenas dois novos alvos terapêuticos foram abordados com sucesso: os antileucotrienos e o anticorpo anti-IgE. Essas drogas, porém, se limitam a diminuir o prejuízo atual e reduzir o risco de uma exacerbação no futuro (MULLANE, 2011; TAYLOR, 2008; CORRÊA, 2008).

Na busca por novas terapias mais eficazes, é relevante considerar que, das drogas atualmente usadas para o controle dessa patologia (Figura 2), quatro (agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, anticolinérgicos, metilxantinas e cromonas) são originadas de plantas.

Historicamente, a medicina natural é uma importante fonte de fármacos para o tratamento da asma e são promissores os estudos para a descoberta de drogas que possam vir a compor o arsenal terapêutico dessa patologia (BARBOZA-FILHO et al., 2006; BEZZERA-SANTOS et al., 2006).

### 2.3.3 Produtos naturais

O uso de plantas medicinais é amplamente difundido e encontra-se em expansão pelo mundo (WHO, 2004). A grande maioria dos medicamentos disponíveis no mundo foi originada de estudos desenvolvidos a partir da cultura popular, o que faz da rica biodiversidade brasileira um vasto campo de pesquisa científica. A Organização Mundial da Saúde, em 1978, reconheceu oficialmente o uso de fitoterápicos. Em 1981, no Brasil, através da política de plantas medicinais e de fitoterápicos, foi definido o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica. E em 1982, o Ministério da Saúde lançou o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos (PPPM/Ceme). O objetivo desse programa foi o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e complementar, com embasamento científico, considerando o real valor farmacológico de preparações de uso popular à base de plantas medicinais. Mais recentemente, o decreto 5.813/2006 instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinais e, em novembro de 2011, através da resolução RDC 60/2011, foi aprovado o Formulário Nacional de Fitoterápicos. Essa publicação integra a Farmacopeia Brasileira e traz 83 monografias de medicamentos, como infusões, xaropes e pomadas (BRASIL, 2011).

A possibilidade desse recurso terapêutico tem sido reconhecida como bastante promissora nos programas de atenção primária à saúde, podendo atender muitas das demandas da população, contribuir para o sistema local de saúde e desenvolver a autonomia no cuidado à saúde dos usuários do sistema público. (BRASIL, 2006a).

O que se almeja é que haja um intercâmbio entre o conhecimento científico e o conhecimento popular para o uso racional das plantas medicinais, bem como a seleção de plantas para a implementação de investimentos em pesquisa e desenvolvimento, com garantia de eficácia, segurança e qualidade (VENDRUSCOLO et al., 2005). É importante considerar que o uso inadequado dessa terapia farmacológica pode desencadear efeitos adversos e interações medicamentosas, podendo ainda retardar o diagnóstico e o tratamento apropriado de patologias (RATES, 2001). Nesse intuito, muitas áreas estão envolvidas na pesquisa e seleção de novas plantas medicinais e substâncias oriundas de plantas. Dentre elas, a etnobotânica e a etnofarmacologia, que buscam informações a partir do conhecimento de diferentes culturas e etnias, a

fitoquímica, que isola, caracteriza e purifica princípios ativos e a farmacologia, que estuda os efeitos farmacológicos de extratos e (ou) seus constituintes químicos isolados. A integração dessas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descoberta de novos medicamentos (VENDRUSCOLO et al., 2005).

Muitos trabalhos científicos vêm sendo realizados, principalmente nas universidades do nordeste, para caracterizar a flora brasileira, que é riquíssima e apresenta várias espécies inéditas ou que não possuem a sua aplicação popular elucidada cientificamente (BARBOSA-FILHO, 1997). A literatura registra ainda que alguns desses compostos podem se revelar como potenciais fármacos para o tratamento de muitas patologias, dentre elas as doenças alérgicas (CORRÊA, 2008).

A alergia é considerada como a segunda patologia em que a população mundial dá preferência ao uso de terapias complementares ou alternativas, apenas perdendo para lombalgias (BIELORY, 2004). Dentre muitas espécies vegetais estudadas e uma grande variedade de compostos químicos, pode-se citar o *Allium cepa* L. e um de seus principais metabólitos secundários: os flavonoides.

#### 2.3.3.1 *Allium cepa* L.

A *Allium cepa* L., conhecida popularmente como cebola branca, é a hortaliça condimentar mais difundida no mundo. Estudo etnobotânico realizado numa comunidade hispânica demonstrou que essa espécie estava presente em 40% das preparações para terapia da asma (BEARISON et al., 2002). No Brasil, seu cultivo foi introduzido no Rio Grande do Sul e tem uso frequente em diversos tipos de preparações culinárias e na medicina popular (TÔRRES et al, 2005).

Em Salvador, foi realizado um inquérito popular objetivando realizar um levantamento dos produtos naturais utilizados para o tratamento de asma em crianças residentes no município, bem como confrontar o conhecimento tradicional com as atividades terapêuticas já descritas na literatura. Para as espécies vegetais com maior frequência de utilização pela população estudada, a cebola (*Allium cepa* L.) foi o segundo produto de origem vegetal mais citado (19,74%), usada em diferentes tipos de

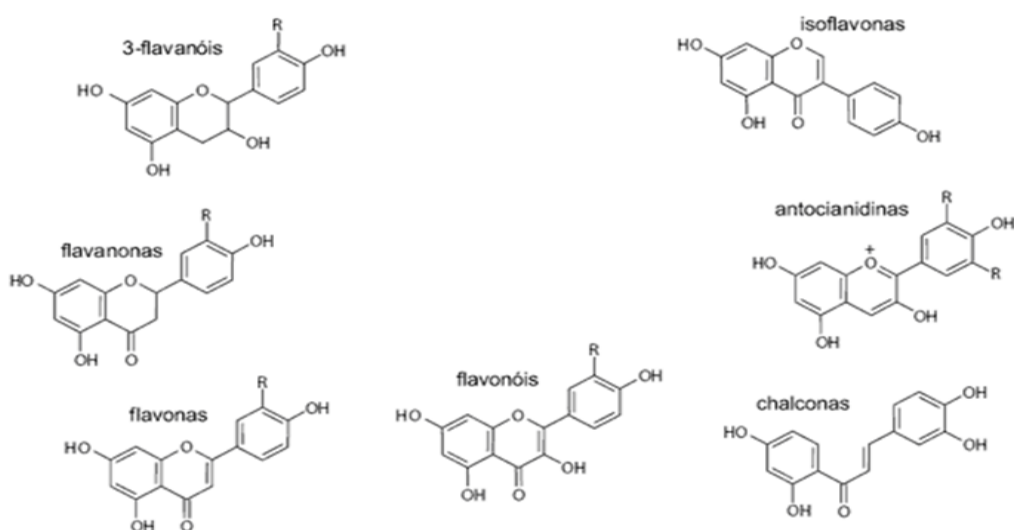
preparações, tais como infusão e xarope, para o tratamento da asma (COSTA et al., 2010).

Diferentes tipos de extratos do *Allium cepa* L. (aquoso, etanólico e hidroalcolólico) e frações purificadas (polissacarídeos e flavonoides), têm sido extensivamente estudadas, *in vitro* e *in vivo*, por diferentes autores, apresentando resultados promissores no combate a diversas patologias. O *Allium cepa* L. demonstrou ser eficaz no tratamento de distúrbios do trato gastrointestinal, auxiliando no controle da diabetes e como agente hipoglicêmico, reduzindo o risco de desenvolvimento de câncer esofágico, gástrico e mamário. Adicionalmente, essa espécie vem sendo usada como antibacteriana, antifúngica, anti-histamínica e anti-inflamatória, apresentando potencial antialérgico em patologia bronquial, como protetor cardiovascular e redutor do teor de gordura no sangue, diminuindo, assim, o risco de trombose e de aterosclerose. (LANZOTTI, 2006; TÔRRES, 2005; KAISER et al., 2009).

Dentre os compostos presentes na *Allium cepa* L., podemos destacar os flavonoides e os isotiocianatos.

Os flavonoides são compostos polifenólicos que possuem um esqueleto benzopirânico, e suas características estruturais os dividem em: flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonas, antocianidinas e chalconas (Figura 3)(BOOTS, 2008).

Figura 3– Estrutura química das principais classes de flavonoides



Fonte: Adaptado de BOOTS, 2008



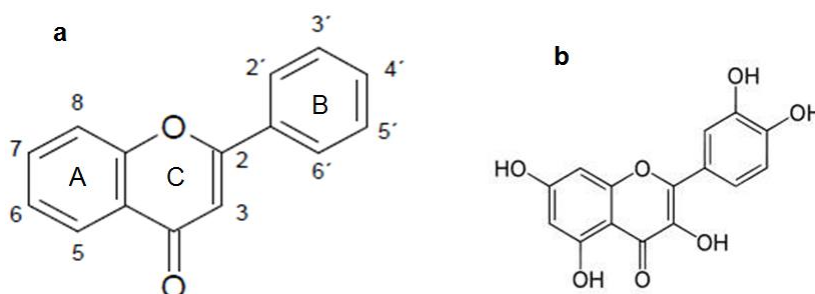
Os flavonoides compreendem um grupo de mais de 6000 compostos amplamente distribuídos no reino vegetal. No organismo de mamíferos, eles são capazes de atuar como imunomoduladores, anti-inflamatórios, antivirais, bactericidas, hepatoprotetores, gastroprotetores e antioxidantes (SCHIJLEN et al., 2004; HARBORNE & WILLIAMS, 2000; MIDDLETON et al., 2000).

Entre os flavonoides presentes na *Allium cepa* L., a quercetina se destaca. Apesar de ela estar presente em várias frutas e vegetais, como maçã (21-72mg/kg), tomate (8mg/kg), brócolis(30mg/kg) e alface (14mg/kg), as maiores concentrações são encontradas em cebolas (284-486 mg/kg) (ERLUND, 2004; HERTOOG, 1993).

### 2.3.3.2 Quercetina

A quercetina é constituída por um esqueleto de difenil propano ( $C_6C_3C_6$ ), com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C). Duas ligações intermoleculares do tipo ponte de hidrogênio são observadas: duas entre o grupo carbonila e outra entre os grupamentos hidroxila do anel B (BEHLING et al 2004; MOON et al., 2008). Pertence a uma subclasse dos flavonoides (Figura 4a), é classificada como um flavonol, assim como a miricetina e o kaempferol. A quercetina possui a nomenclatura 3, 3', 4, 5, 7-pentahydroxy-2-phenylchromen-4-one, que significa que ela possui um grupo OH ligado nas posições 3,3', 4, 5,7 (Figura 4b). Difere do kaempferol, já que ele não possui o OH na posição 3', e a miricetina tem um grupo adicional na posição 5' (ROSS, 2002; HOLLMAN,1999).

Figura 4 – Estrutura básica dos flavonóis (a). A quercetina possui substituintes - OH nas posições 3, 5, 7, 3', 4' (b).



Adicionalmente, os flavonoides podem ocorrer tanto glicosilados (com açúcares em anexo) quanto como agliconas. A quercetina glicosilada é encontrada em maior quantidade na dieta. Os flavonoides glicosilados, quando ingeridos, são resistentes à degradação pelo ácido clorídrico no estômago, chegando intactos ao intestino delgado.

A absorção da quercetina depende da solubilidade do veículo usado na sua administração, por ela ser insolúvel em água. A quercetina é absorvida na microflora intestinal e excretada na bile e na urina como glucoronidato e sulfato conjugado em até 48 h. Posteriormente, é degradada pelas bactérias intestinais em ácido fenólico, ácido 3-hidroxifenilacético e ácido 3,4-dihidroxifenilacético, dentro do anel B, e são absorvidas pelas células epiteliais por difusão simples (ERLUND, 2004; BEHLING et al., 2004).

Quanto à distribuição nos tecidos, estudos observaram concentrações de quercetina nos pulmões, testículos, rins, timo, coração, fígado. A excreção pode ser urinária e pela respiração, e uma parte substancial dos metabólitos pode ser excretada na bile (MUROTA; TERAQ, 2003; DE BOER et al., 2005).

Após a ingestão de quercetina (100 mg), foi observado um tempo de meia-vida de 31 a 50 horas, com picos plasmáticos em 30 minutos a 8 horas após o tratamento (WALLE; WALLE; HALUSHKA, 2001). Quanto à toxicidade, a quercetina é bem tolerada e reconhecida como segura para humanos em doses orais de até 1000 mg/dia, ou em uma dosagem de 756 mg/dia via intravenosa (HARWOOD et al., 2007).

A quercetina exerce efeitos benéficos à saúde, e isso inclui proteção contra várias doenças, como osteoporose, alguns tipos de câncer, doenças pulmonares e cardiovasculares. Também tem ação contra o envelhecimento, especialmente pelo fato de essa substância ser antioxidante, tendo a capacidade de eliminar espécies altamente reativas (ERO) (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008).

Estudos recentes, que avaliam a capacidade de inibição da degranulação *in vitro* de basófilos pela quercetina, evidenciam a possibilidade de sua aplicação em humanos para o tratamento de alergias (CHIMRIBOLO et al., 2009). Outros estudos relatam também que a quercetina, presente em diversas fontes vegetais, apresenta atividade inibitória de ativação da cascata inflamatória e bloqueia a produção TNF- $\alpha$ , a ativação de NF- $\kappa$ B e a síntese de citocinas. Possui, ainda, a capacidade de inibir a degranulação de neutrófilos e a liberação de ânions superóxido e também é capaz de modular a ativação de mastócito (MIN, et al., 2007; DAS, et al., 2003; XAGORARI et al., 2000; HARBORNE, 2000). O flavonol glicosilado isoquercitrina, derivado de quercetina,

mostrou atividade inibitória da resposta induzida por LTD4, modulador da contração da musculatura lisa e da hiperreatividade brônquica e um dos promotores da resposta inflamatória na asma (FERNANDEZ et al., 2005).

Adicionalmente, Park e colaboradores (2009) demonstraram o potencial antiasma da quercetina, em modelo de alergia a ovalbumina por um mecanismo imunomodulador Th1/Th2 em fatores de transcrição (GATA-3 e T- bet). Os fatores de transcrição são proteínas intracelulares que se ligam a sequências gênicas reguladoras e controlam mudanças na transcrição de genes, sendo o GATA- 3 fator para células com perfil Th2 e T- bet fator de transcrição que reprime a produção de IL-4 e favorece o desenvolvimento de células com perfil Th1.

Nesse contexto, a *Allium cepa* L. pode ser uma terapia promissora antiasma (TÔRRES et al., 2005; DORSCH et al., 1984), embora novos estudos sejam necessários para investigar os reais potenciais terapêuticos dessa substância *in vivo*. Na literatura, existem muitos relatos de modelos experimentais com animais (JOSKOVA, 2011; ROGÉRIO, 2010) que objetivam conhecer melhor as atividades farmacológicas de muitas substâncias naturais. Pode-se citar, dentre elas, aquelas que induzem, com ácaro, a asma alérgica em camundongos (BAQUEIRO et al., 2010; CERQUEIRA-LIMA et al., 2010).

## 2.4 MODELO EXPERIMENTAL DE ALERGIA RESPIRATÓRIA

As respostas alérgicas passíveis de mimetização em camundongos podem ser desencadeadas por muitos agentes físicos ou químicos. O modelo experimental de alergia, a ovalbumina (OVA), é o mais abundantemente utilizado na literatura para o estudo da asma, embora ácaros sejam os agentes biológicos alergizantes mais importantes. A espécie de ácaro *Blomia tropicalis*, comumente presente na poeira doméstica, pode ser potencial desencadeador da asma (ARLIAN et al., 1993). Na tentativa de mimetizar e conhecer a asma humana, um modelo experimental com animais foi padronizado pelo nosso grupo de pesquisa. Através da sensibilização de camundongos AJ com extrato total do ácaro *B. tropicalis* (*BtE*), conseguiu-se estimular parâmetros imunológicos importantes, inerentes à fisiopatogenia da asma humana

(BAQUEIRO et al., 2010), sendo esse, portanto, o modelo de asma escolhido para testar o potencial terapêutico da *AcE* e quercetina na asma alérgica.

Sabe-se que a descoberta da conexão entre plantas e saúde é responsável pelo início de uma nova geração de terapia que inclui fármacos derivados de plantas ou de suas partes. Além disso, vários fármacos com ação contra a asma foram isolados de plantas com uso medicinal em problemas respiratórios, incluindo a atropina, a teofilina e as cromonas (CORRÊA, 2008). Sendo assim, através da indução da asma com *BtE* em camundongos, anteriormente descrita na literatura (BAQUEIRO et al., 2010), busca-se, com a investigação do potencial terapêutico do *AcE* e da quercetina, confirmar a utilização popular dessas substâncias em um modelo *in vivo* e conhecer seus reais potenciais na terapia da asma.

## 3 **O**BJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial terapêutico da *Allium cepa* L. e do flavonoide quercetina no tratamento da asma alérgica experimental.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar o potencial antiinflamatório da *Allium cepa* L. e da quercetina, em modelo de alergia ao ácaro *Blomia tropicalis*.

Investigar o potencial broncodilatador do *Allium cepa* L. e da quercetina em traqueia isolada de camundongo.

## **4 METODOLOGIA**

#### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os protocolos experimentais que envolvem animais, neste projeto, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Bahia (UFBA), sob nº de protocolo 02/09.

#### 4.2 ANIMAIS

Para os experimentos, foram usados camundongos fêmea da linhagem AJ, com idade de 5 a 7 semanas, pesando de 20 a 25g, obtidos do Biotério da Fundação Oswaldo Cruz, Bahia, Brasil. Esses animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura e ventilação, e submetidos, diariamente, a um ciclo claro-escuro, em gaiolas com maravalha autoclavada, grade no topo, com acesso livre a comida e água, ambas autoclavadas.

#### 4.3 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO DE ÁCARO (*Blomia tropicalis*)

Os ácaros foram obtidos da poeira doméstica e cultivados em estufa tipo BOD e, após processo de expansão, foram lisados em solução salina 0,15M de tampão fosfato, pH 7.4 (PBS), com auxílio de um misturador (51BL30; Waring comercial, Torrington, CO, E.U.A.). Após a centrifugação com éter para a remoção de lipídios (4500 RPM / 10min), o teor de proteína foi determinado pelo método de Lowry e colaboradores (1951) e, em seguida, o extrato foi armazenado a -70°C até o uso. O extrato do ácaro (*BtE*) foi padronizado quanto ao teor do principal antígeno presente no ácaro *BtE* com auxílio de um kit comercialmente disponível pela técnica de ELISA de captura (INDOOR Biotecnologias, Charlottesville, VI, E.U.A.). Todos os lotes utilizados continham de 30 a 40 ng desse alérgeno por mg de proteína.



#### 4.4 OBTENÇÃO E PREPARO DO EXTRATO DE *Allium cepa* L. E DA QUERCETINA

O preparo do extrato metanólico do *Allium cepa* L. foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica (LAPEMM) do Departamento de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFBA. A extração foi realizada a frio, segundo técnica descrita previamente por Shetty e colaboradores (2008). Após obtenção comercial do *Allium cepa* L. (11.120kg) (Figura 5A), a amostra foi descascada, cortada e extraída por maceração em 3 balões de 1000ml (10.260kg), permanecendo com álcool metílico 99,8% (CH<sub>3</sub>OH) por 7 dias (Figura 5B). Após a filtração, o extrato foi concentrado por evaporação, sob pressão reduzida, no evaporador rotatório (Figura 5C). O processo foi repetido três vezes. O extrato metanólico do *Allium cepa* L. (Figura 5C), após secagem na estufa (Figura 5D), foi mantido em -20°C até sua utilização. O rendimento do extrato foi de 4,8%.

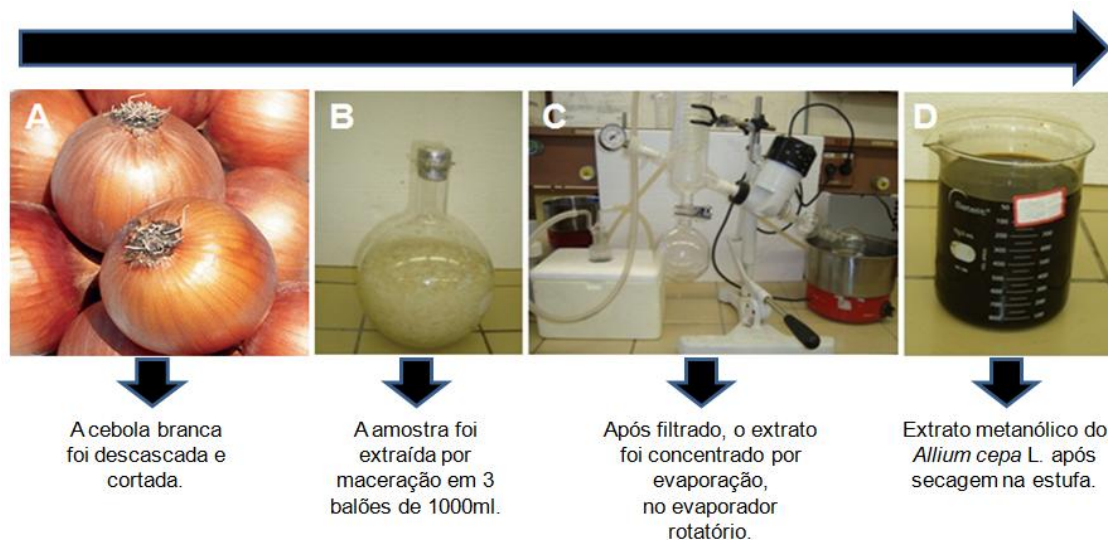
Em colaboração com o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba, o extrato metanólico do *Allium cepa* L. foi padronizado, utilizando-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), quando foi evidenciado o pico característico de quercetina, estimando-se sua concentração, no extrato, em 1,97%.

O flavonoide quercetina 98% (2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one,3,3',4',5,6- entahydroxyflavone) foi obtido comercialmente da Sigma-Aldrich®.

O *AcE* e a quercetina foram solubilizados em DMSO (0,5%), para o preparo das soluções de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental *in vitro*.

O *AcE* e a quercetina usados no tratamento *in vivo* foram solubilizadas em solução salina estéril (JOSKOVA, 2011).

Figura 5 – Preparo do extrato metanólico da *Allium cepa* L. (*AcE*). Após obtenção do *Allium cepa* L. (A), a amostra foi descascada, cortada e extraída por maceração em três balões de 1000ml com álcool metílico 99,8% (Metanol) (B). Após a filtragem, foi utilizado o evaporador rotatório (C) para a amostra ser concentrada. Após a secagem na estufa, o preparo do *AcE* (D) foi finalizado.



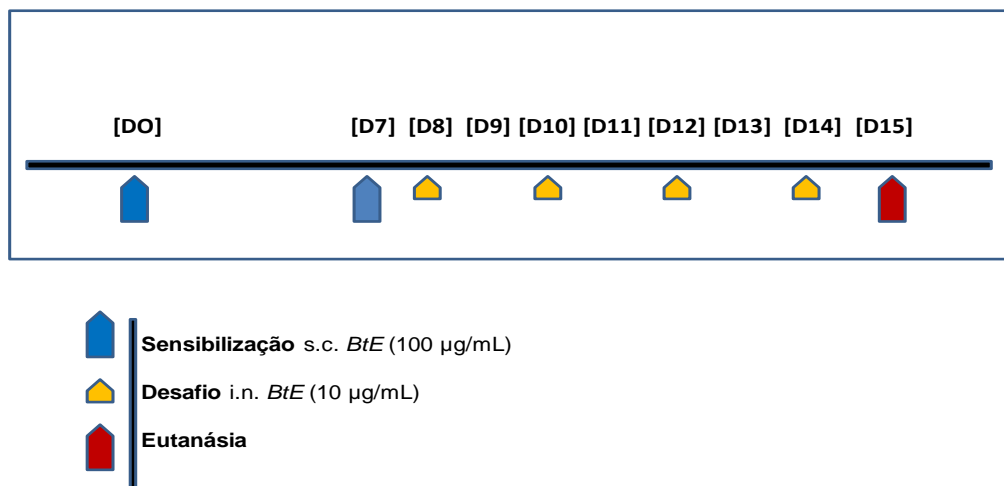
#### 4.5 MODELO EXPERIMENTAL (SENSIBILIZAÇÃO, DESAFIO E TRATAMENTO)

##### 4.5.1 Sensibilização e Desafio com *BtE*

A alergia respiratória experimental ao ácaro *B. tropicalis* foi induzida em camundongos (fêmea, cinco semanas, 20-25g) da linhagem A J (n=5), conforme é descrito por Baqueiro e colaboradores (2010) (Figura 6). Os animais foram sensibilizados com duas injeções subcutâneas (dia 0 e dia 7) com *BtE* (100µg de proteína) adsorvido em hidróxido de alumínio a 4mg/ml em solução salina. Um dia após a segunda injeção, os animais foram desafiados por via intranasal (i.n.) com *BtE* (10 µg de proteína), em 50 µl de solução salina, em uma das narinas, durante quatro dias alternados. Vinte e quatro horas depois, os animais foram eutanasiados com overdose de cloridrato de xilazina e cloridrato de quetamina (40 mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal) e foram realizados os experimentos.

O desenho experimental está esquematizado na figura a seguir (Figura 6).

Figura 6 – Desenho experimental do protocolo de sensibilização e desafio com antígenos de *BtE*



#### 4.5.2 Tratamento com *AcE* ou com a quercetina

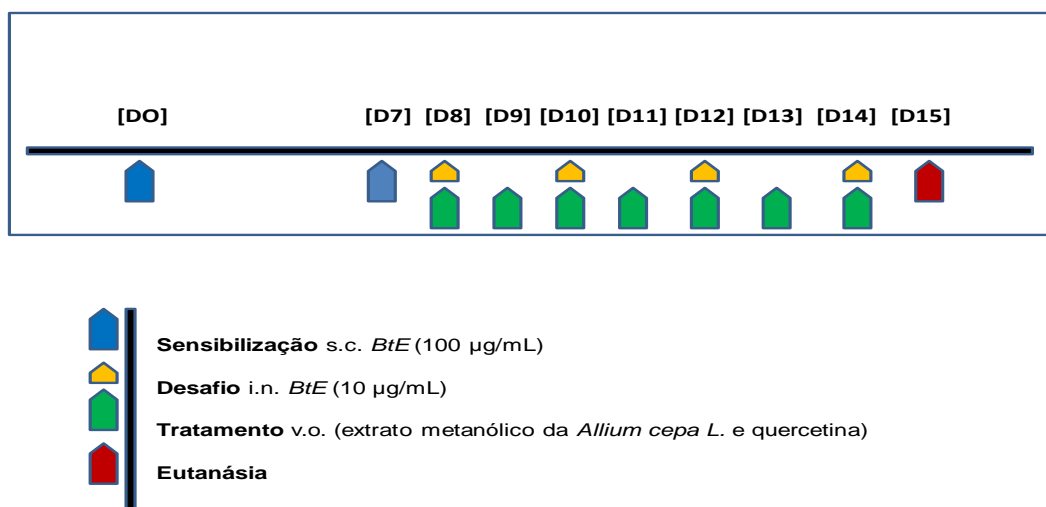
As doses (100mg/kg /Kg e 1000mg/kg) de *AcE* e quercetina (30 mg/kg) de quercetina investigadas neste trabalho foram selecionadas com base em estudos anteriores (KAISER, 2009; ROGERIO, 2007).

Para os ensaios *in vitro*, as concentrações de *AcE* (10; 100 ou 1000µg/ml) e quercetina (3,75; 7,5; 15 ou 30 µg/ml) foram também determinadas a partir de estudos anteriores (LANOUE, 2009; JIMÉNEZ-ALIAGA, 2011).

Após a segunda sensibilização com *BtE* (D7), foram feitos desafios em dias alternados (D8, D10, D12, D14), e uma hora depois de cada desafio, foram feitos os tratamentos com *AcE* ou quercetina durante 7 dias consecutivos (D8 a D14). Os animais foram tratados com suspensão oral (JOSKOVA, 2011) de *AcE* ou quercetina.

O desenho experimental está esquematizado na figura a seguir (Figura 7).

Figura 7 – Desenho experimental do protocolo de sensibilização e tratamento com *AcE* e quercetina.



#### 4.6 ENSAIOS *IN VITRO*

##### 4.6.1 Protocolo experimental para investigar o potencial modulador do *AcE* e quercetina sobre a produção de citocinas de IL-4, IL-5 e IL-13, em cultura de esplenócitos

Esse ensaio *in vitro* foi realizado em cultura de esplenócitos para dosagem de IL-4, IL-5 e IL-13, citocinas importantes na modulação da asma. Nesse experimento, camundongos fêmea da linhagem AJ foram sensibilizados, desafiados e eutanasiados de acordo com o descrito no item 4.6.1. O baço foi coletado e, após a maceração do órgão, as células foram lavadas três vezes com RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), estreptomicina, penicilina, e L-glutamina (2mM), e sua concentração foi ajustada para  $5 \times 10^5$  células por poço. Todas as células utilizadas nesse ensaio foram de animais sensibilizados com *BtE* estimuladas (controle positivo) ou não (controle negativo) com mitógeno (Pokeweed - PWM 2,5mcg/mL). Sigma-Aldrich® As células foram tratadas *AcE* (10µg/ml; 100 µg/ml ou 1000 µg/ml) ou quercetina (3,75; 7,5; 15 ou 30 µg/ml). A cultura foi incubada em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, e o sobrenadante foi coletado após 48h de cultivo para a dosagem de IL-4 e IL-5 e IL-13 pela técnica de ELISA.

#### **4.6.2 Protocolo experimental para investigar o potencial modulador do *AcE* e quercetina sobre a produção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais**

Considerando o importante papel do óxido nítrico na inflamação, avaliou-se a possível participação da *AcE* e quercetina na produção do óxido nítrico, em modelo experimental de peritonite aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos (MONTEIRO, 2008).

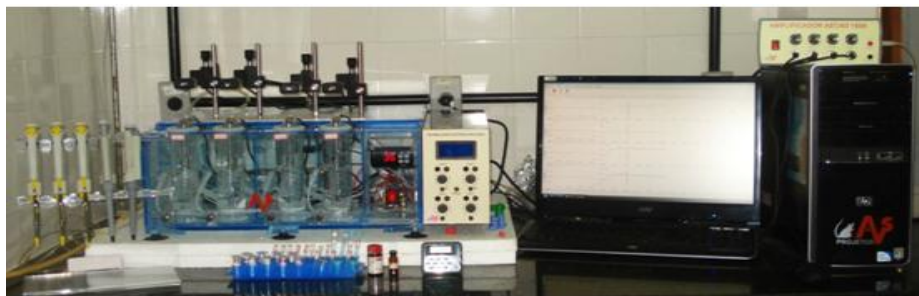
Os camundongos submetidos ao modelo experimental de peritonite aguda induzida por LPS foram previamente estimulados através da inoculação intraperitoneal de 20 µg/animal de LPS de *Escherichia coli* (MONTEIRO, 2008). Após 24h, os animais foram eutanasiados com sobredose do anestésico tiopental. A coleta do exsudato peritoneal foi realizada, sendo a parede abdominal exposta e submetida à desinfecção com álcool 70%. Em seguida, foi injetado 5 mL de solução salina estéril na cavidade peritoneal. Após massagem cuidadosa, a parede abdominal foi seccionada, e o fluido peritoneal aspirado com pipeta Pasteur. O material obtido foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos. Foi descartado o sobrenadante, e as células sedimentadas foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI- 1640 (Sigma-Aldrich®) suplementado com 5% de soro fetal bovino, estreptomicina, penicilina e 2mM de L-glutamina e, assim, designado como meio completo (RPMI- 1640-C) . O número de células foi determinado em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Alemanha), sendo ajustado para  $5 \times 10^6$  células/ml. Foram adicionadas, em microplaca de 96 poços, as células estimuladas com 5 µg/ml de LPS e incubadas com *AcE* (10µg/ml, 100 µg/ml e 1000 µg/ml) ou quercetina (7,5; 15 ou 30 µg/ml). Poços contendo apenas a suspensão celular (sem drogas) foram considerados controles negativos. A placa foi então incubada por 24h, a 37°C, a 5% CO<sub>2</sub>. Após a incubação, foram retiradas alíquotas de amostra, que foram transferidas para outra placa, onde foi adicionado reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% nafitiletilenediamina e 3% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Essa placa foi novamente incubada em temperatura ambiente por 10 minutos, e a absorbância foi medida a 450nm no leitor de microplaca ELISA.

#### **4.6.3 Protocolo experimental para investigar o potencial broncodilatador da *AcE* e quercetina sobre musculatura lisa das vias aéreas de camundongos**

A contração da musculatura lisa brônquica, característica da asma brônquica alérgica, tem sido considerada como uma das causas da hiper-responsividade das vias aéreas (CHIBA, 2010). Para investigar os efeitos de *AcE* e quercetina sobre a musculatura lisa das vias aéreas e seu potencial broncodilatador, foram utilizadas traqueias isoladas de camundongos AJ. Os anéis traqueais utilizados nesse ensaio eram independentes de epitélio, objetivando que o efeito das drogas testadas no músculo liso traqueal pudesse ser avaliado, sem a possível influência da camada epitelial. Os anéis sem epitélio foram obtidos mecanicamente através do atrito com haste de metal entre as paredes internas da traqueia.

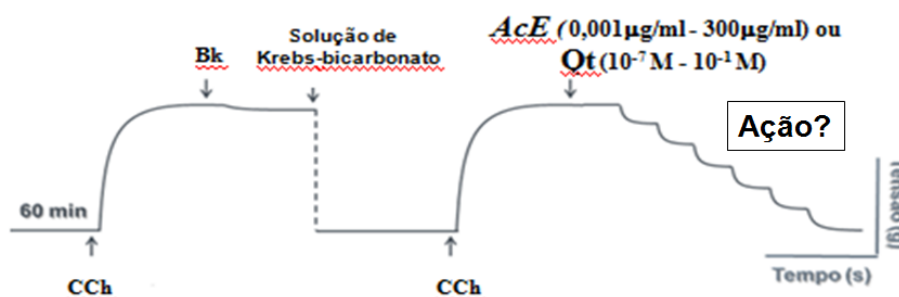
Após a eutanásia do animal com overdose de tiopental sódico (i.p.), a traqueia foi removida, colocada em solução de Krebs-bicarbonato à 37° C e aerada com mistura carbogênica com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub> para a remoção do tecido conectivo e adiposo. A composição da solução de Krebs-bicarbonato apresentava as seguintes concentrações de sais (mM): NaCl 119, NaHCO<sub>3</sub> 25, CaCl<sub>2</sub>×H<sub>2</sub>O 1.6, KCl 4.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 1.2 e glicose 11.1). Posteriormente, a traqueia foi seccionada em anéis de 2mm colocados em cubas para órgão isolado, sob controle constante de temperatura (37 °C) e mistura carbogênica (95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub>). Os anéis traqueais foram suspensos por fios de algodão e submetidos a uma tensão constante de 0,5 g por um período de estabilização de 1 hora, sendo a solução nutritiva substituída a cada 15 minutos, para prevenir contra a interferência de metabólitos (ALTURA & ALTURA, 1970). A tensão do músculo liso traqueal foi registrada isometricamente através de um transdutor de força (AVS), acoplado a um sistema de aquisição de dados (AVS) (Figura 8).

Figura 8 – Aparato utilizado para os experimentos com anéis de traqueia isolada de camundongos.



Uma contração tônica submáxima ao carbacol (CCh) 10  $\mu$ M, que se estabilizou em torno de 20 minutos, foi obtida para avaliação da viabilidade contrátil tecidual. Uma segunda curva foi obtida e *AcE* ( 1, 3 ,10, 30,  $10^2$  e  $3 \times 10^2$   $\mu$ g/ml) ou quercetina (  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-3}$  M) (CAPASSO, 2009) foram adicionadas cumulativamente à cuba, para a obtenção das curvas concentração-resposta. Os resultados foram expressos levando-se em consideração que a contração induzida por CCh corresponde a 100 %, e que a tensão de repouso é igual a 0%. A ausência do epitélio funcional foi verificada pela falta de relaxamento dos anéis traqueais após adição de 1  $\mu$ M de Bradicinina (BK) (Figura 8). Foram considerados anéis sem epitélio (E-) os que apresentavam relaxamentos inferiores a 10 % após administração de BK (1  $\mu$ M).

Figura 9 – Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito de contrações de traqueia isolada. A representação do protocolo em traqueia isolada de camundongo AJ sem epitélio mostra o efeito crescente das concentrações de *AcE* ou quercetina sobre as contrações induzidas por CCh.



## 4.7 ENSAIOS *IN VIVO*

### **4.7.1 Protocolo experimental para investigar o potencial imunomodulador do *AcE* e quercetina em modelo murino de asma.**

A alergia respiratória experimental ao ácaro *B. tropicalis* foi induzida em camundongos (fêmea, cinco semanas, 20-25g) da linhagem AJ (n=5) que foram sensibilizados, desafiados, tratados e eutanasiados de acordo com o modelo experimental descrito no item 4.6.

Neste protocolo, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- a) Grupo controle negativo (Controle): animais não sensibilizados com *BtE* e não tratados.
- b) Grupo controle positivo (BtE): animais sensibilizados com *BtE*, não tratados.
- c) Grupo sensibilizado e tratado (BtE/ *AcE* 1000): animais sensibilizados com *BtE* e tratados com 1000mg/kg do *AcE*.
- d) Grupo sensibilizado e tratado (BtE/ *AcE* 100): animais sensibilizados com *BtE* e tratados com 100mg/kg do *AcE*.
- c) Grupo sensibilizado e tratado (BtE/ Qt 30): animais sensibilizados com *BtE* e tratados com 30 mg/kg da quercetina.

#### *4.7.1.1 Obtenção do lavado bronco alveolar (BAL)*

Após a eutanásia, a traqueia foi canulada e os pulmões foram lavados três vezes com 0,5 mL de PBS pH 7,4. Aproximadamente 1,5 mL de BAL foram obtidos de cada camundongo.

Para determinar o número total de células no lavado broncoalveolar (BAL), 90µL da suspensão celular foi corada com 10µL de uma solução de azul de Tripán 0,4% para contagem em hemocítômetro.



#### *4.7.1.2 Atividade de peroxidase do pulmão*

Logo após a obtenção do BAL, um fragmento de pulmão foi removido e, após maceração, foi feito o ajuste da suspensão para 10% p/v com HBSS 0,5% de HTAB (pH 7.4)

A atividade de peroxidase eosinofílica (EPO) do pulmão foi medida de acordo com o método descrito anteriormente (STRATH; WARREN; SANDERSON ; 1985), e as amostras foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido. Após centrifugação a 4°C, durante 10 min, a 1500g, o sobrenadante foi colocado em placas de 96 poços (75 uL/poço), procedimento seguido pela adição de 1,5 mmol/L de o-fenilenodiamina e 6,6 mmol / L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 0,05 mol / L Tris-HCl, pH 8.0. Após 30 minutos em temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de 75µl de ácido cítrico a 0,2mol/L, e a absorbância da amostra foi determinada a 450 nm em um leitor de placas ELISA.

#### *4.7.1.3 Análise histopatológica do pulmão*

Para análise histopatológica, a traqueia e os pulmões foram preenchidos com um fixador intratraqueal (paraformaldeído 4%), utilizando-se uma ligadura em volta da traqueia. O tecido pulmonar foi fixado em 10% v/v de paraformaldeído e, em seguida, foi desidratado e embebido em parafina. Para o exame histológico, secções de 4µm do tecido fixado foram cortadas em micrótomo, colocadas sobre lâminas de vidro, desparafinizadas e coradas com hematoxilina/eosina (HE) e ácido periódico Schiff (PAS) para detecção muco.

As alterações histopatológicas foram analisadas por microscopia óptica, utilizando-se objetiva de 40x.

#### 4.7.1.4 Determinação de IgE específica para *B. tropicalis*

A produção de IgE específica foi dosada após a separação do soro, conforme descrito anteriormente por Russo (1998), com pequenas modificações. As placas MaxiSorb foram sensibilizadas com 10µg de *BtE*, em tampão carbonato (100µL/poço) “overnight” a 4°C, e foram lavadas com PBS Tween 20 0,05% e bloqueadas com 0,25% de caseína em PBS (100µL/poço). As placas foram lavadas, as amostras de soro foram adicionadas nas concentrações de 1:1000, 1:100 e 1:10, respectivamente, e posteriormente incubadas por 1h. Após nova lavagem, a reação colorimétrica foi realizada pela adição de 100µL/poço de uma solução substrato com 0,5mg/mL do cromógeno ortofenileno-diamina (OPD) (Sigma Aldrich®) 0.0015% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 0,1 M tampão ácido cítrico/citrato de sódio (Merck S.A.), pH 5,0. A reação foi bloqueada pela adição de 50 µL/poço de 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a absorbância determinada a 450 nm.

#### 4.7.1.5 Ensaio imunoenzimático para a detecção de IL-4, IL-5 e IL-13, no BAL.

Após a coleta do BAL, ele foi centrifugado, e o sobrenadante utilizado para quantificação das concentrações de IL-4, IL-5 e IL-13, pela técnica de ELISA, conforme recomendações do fabricante (BD Pharmigen, E.U.A.).

## 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi usado o teste Kolmogorov-Smirnov para analisar a distribuição dos grupos. Para as análises com mais de dois grupos que apresentaram distribuição normal foi utilizado o ANOVA, com pós-teste de *Tukey*. Diferenças com os valores de  $P \leq 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas. Cada experimento foi repetido, no mínimo, duas vezes. O programa utilizado para fazer as análises foi o Graph Pad Prism versão 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, U.S.A.).

## **5 RESULTADOS**

### 5.1 Efeito do *AcE* e quercetina sobre a produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 na cultura de esplenócitos.

Observa-se, nas Figuras 10, 11 e 12, que esplenócitos de camundongos sensibilizados com *BtE* e estimulados com mitógeno Pokeweed (PWM) apresentaram uma maior produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, quando comparados com os controles negativos (Figuras 10, 11 e 12, ###  $p < 0,001$ ; ANOVA-Tukey). Porém, quando as células de animais sensibilizados com o extrato de *BtE* foram estimuladas com o mitógeno Pokeweed (PWM) e tratadas com diferentes concentrações de *AcE* (10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  ou 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) ou quercetina (3,75; 7,5; 15 ou 30  $\mu\text{g/ml}$ ), ocorreram reduções significativas na produção das citocinas Th2 inflamatórias, em todas as concentrações estudadas, em relação ao controle positivo (PWM) (Figura 10 AB, 11AB e 12AB; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , ANOVA-Tukey).

Figura 10 – Efeito do tratamento de *AcE* ou quercetina sobre a produção de IL-4 em cultura de esplenócitos de camundongos AJ sensibilizados com *BtE* (100  $\mu\text{g}$ ) e tratados. Em A, tratados com *AcE* (PWM/*AcE* 10  $\mu\text{g/ml}$ , PWM /*AcE* 100  $\mu\text{g/ml}$  ou PWM /*AcE* 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) e, em B, com quercetina (PWM/QT 3,75  $\mu\text{g/ml}$ , PWM/QT 7,5  $\mu\text{g/ml}$ , PWM/QT 15  $\mu\text{g/ml}$  ou PWM /QT 30  $\mu\text{g/ml}$ ). Foram considerados estatisticamente significantes ###  $p < 0,01$  em relação ao grupo controle negativo, e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle positivo (PWM). Os resultados são expressos em média e desvio padrão, ANOVA-Tukey.

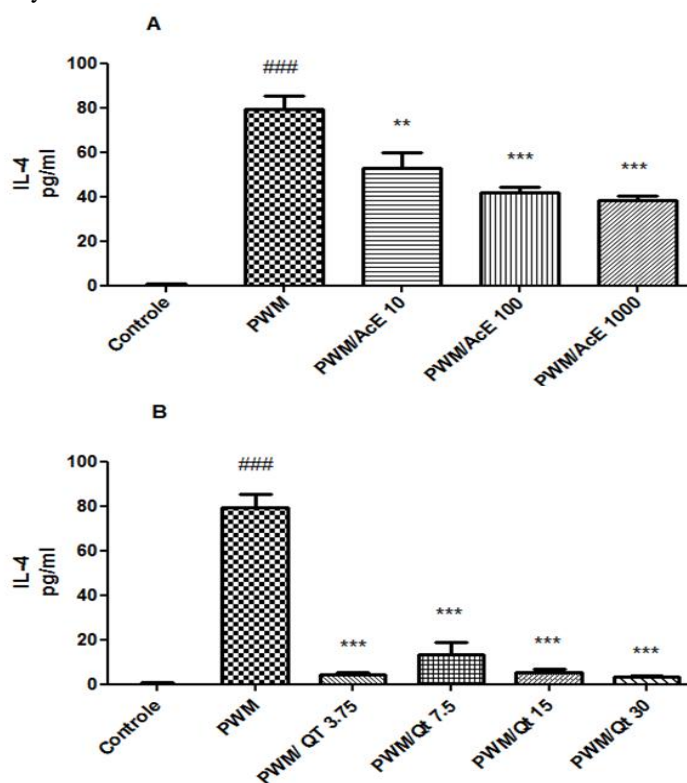


Figura 11 – Efeito do tratamento de *AcE* ou quercetina sobre a produção de IL-5 em cultura de esplenócitos de camundongos AJ sensibilizados com *BtE* (100 µg) e tratados. Em A, tratados com *AcE* (PWM/*AcE* 10µg/ml, PWM /*AcE* 100µg/ml ou PWM /*AcE* 1000 µg/ml) e, em B, com quercetina (PWM/QT 3,75 µg/ml, PWM/QT 7,5 µg/ml, PWM/QT 15 µg/ml ou PWM /QT 30 µg/ml). Foram considerados estatisticamente significantes ###  $p < 0, 01$  em relação ao grupo controle negativo, e \*\*\*  $p < 0, 001$  e \*\*  $p < 0, 01$  em relação ao grupo controle positivo (PWM). Os resultados são expressos em média e desvio padrão, ANOVA-Tukey.

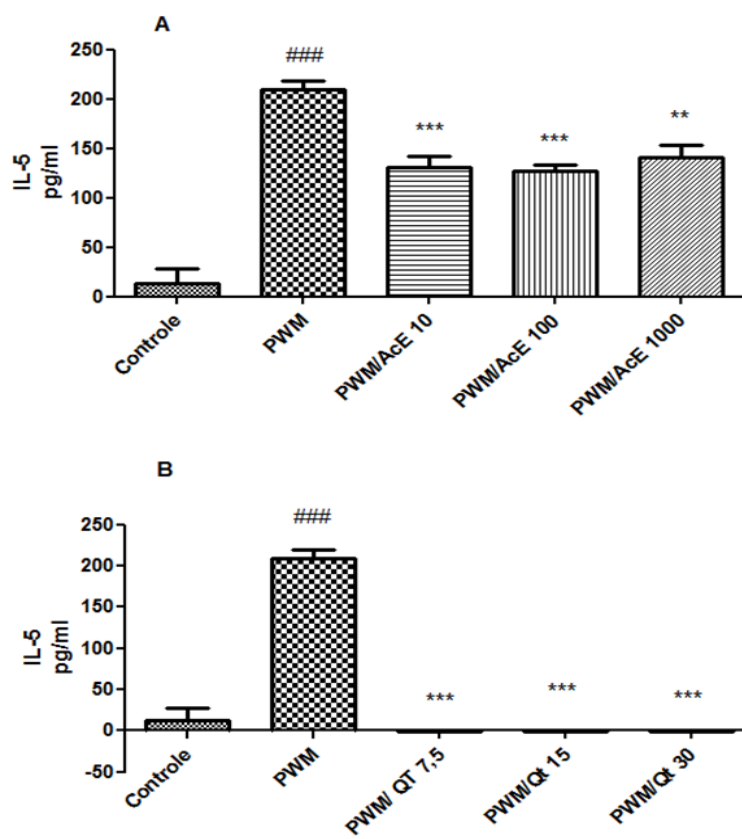
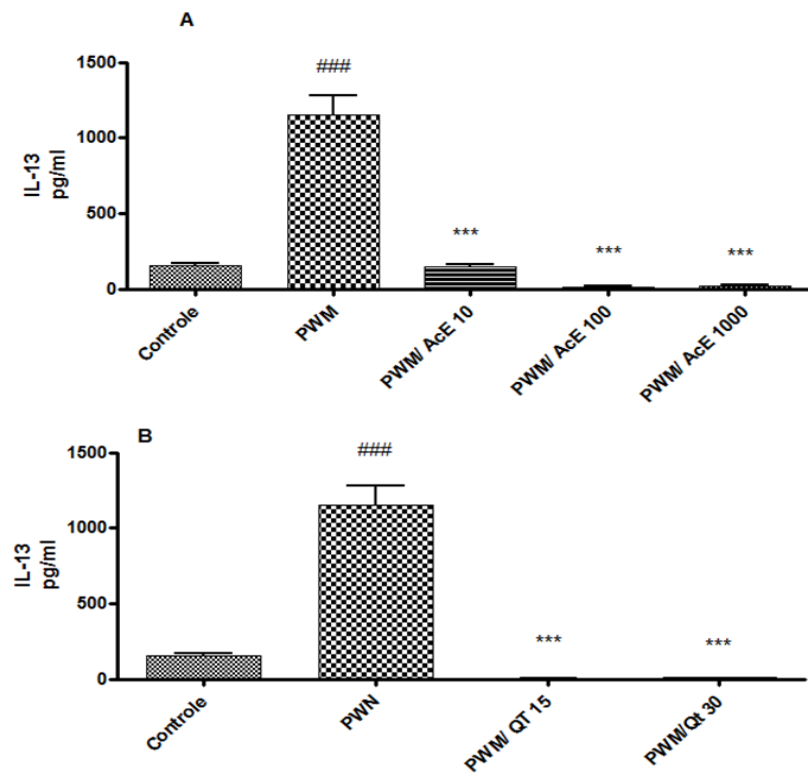


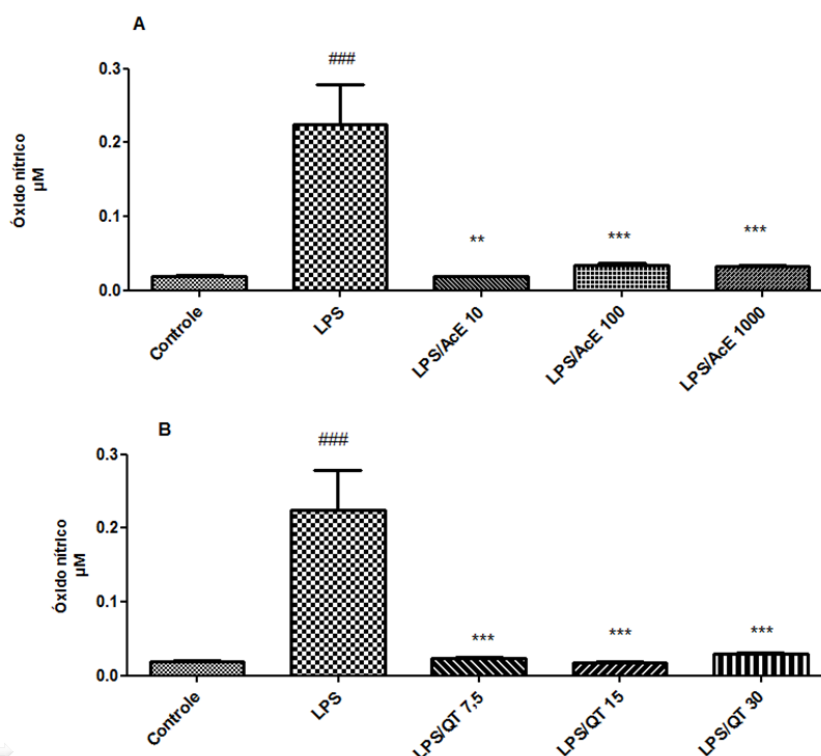
Figura 12 – Efeito do tratamento de *AcE* ou quercetina sobre a produção de IL-13 em cultura de esplenócitos de camundongos AJ sensibilizados com *BtE* (100 µg) e tratados. Em A, tratados com *AcE* (PWM/*AcE* 10µg/ml, PWM /*AcE* 100µg/ml ou PWM /*AcE* 1000 µg/ml) e, em B, com quercetina (PWM/QT 15 µg/ml ou PWM /QT 30 µg/ml). Foram considerados estatisticamente significantes ### p < 0, 01 em relação ao grupo controle negativo, e \*\*\* p <0, 001 em relação ao grupo controle positivo (PWM). Os resultados são expressos em média e desvio padrão, ANOVA-Tukey.



## 5.2 EFEITO DO ACE E QUERCETINA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Como pode ser observado na figura 13 AB, a cultura de macrófagos peritoneais estimulados com LPS apresentou uma maior produção de óxido nítrico, quando comparada com os controles negativos (Figura 13 AB; ###  $p < 0,001$  ANOVA-Tukey). Porém, quando as células estimuladas com LPS foram tratadas com diferentes concentrações de *AcE* (10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml e 1000  $\mu$ g/ml)(Figura 13A) ou de quercetina (25  $\mu$ mol/l, 50  $\mu$ mol/l, 100  $\mu$ mol/l) (Figura 13B), houve uma redução significativa da produção de óxido nítrico em relação ao controle positivo (LPS) (Figura 13 AB , \*\*\*  $p < 0,001$  ANOVA-Tukey).

Figura 13: Efeito do tratamento de *AcE* ou quercetina sobre a produção de óxido nítrico em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos estimulados (PWM) e tratados. Em A, tratados com *AcE* (LPS/*AcE* 10 $\mu$ g/ml, LPS/*AcE* 100  $\mu$ g/ml ou LPS/*AcE* 1000  $\mu$ g/ml) e, em B, com quercetina (LPS/QT 7,5  $\mu$ g/ml, LPS/QT 15  $\mu$ g/ml ou LPS/QT 30  $\mu$ g/ml). Foram considerados estatisticamente significantes ###  $p < 0,01$  em relação ao grupo controle negativo e \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle positivo (LPS). Os resultados são expressos em média e desvio padrão, ANOVA-Tukey.



### 5.3 EFEITO DO *AcE* E QUERCETINA SOBRE MUSCULATURA LISA DAS VIAS AÉREAS DE CAMUNDONGOS.

Como foi demonstrado no traçado original, na Figura 14A e 15A, a adição cumulativa de *AcE* (1, 3, 10, 30,  $10^2$  e  $3 \times 10^2$   $\mu\text{g/ml}$ ) ou quercetina ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-3}$  M), respectivamente, induziram um efeito relaxante transiente, em concentração dependente, da musculatura lisa traqueal isolada de camundongo sem epitélio funcional, pré-contraída com agonista muscarínico carbacol ( $10\mu\text{M}$ ), sendo os valores de  $\text{CE}_{50} = 7,1$  ( $1,8 - 27,4$ )  $\mu\text{g/mL}$  e  $\text{CE}_{50} = 8,9$  ( $4,8 - 16,2$ )  $\times 10^{-5}\text{M}$ , do *AcE* e da quercetina, respectivamente. O conjunto dos dados pode ser observado na Figura 14B, que demonstra a curva concentração-resposta de *AcE*, onde a percentagem do relaxamento máximo ( $E_{\text{máx}}$ ) induzido pelo *AcE* foi de  $E_{\text{max}} = 47,2 \pm 7,0$  (%). A Figura 15B demonstra a curva concentração-resposta da quercetina que teve o  $E_{\text{max}} = 84,0 \pm 13,1$  (%), também na traqueia isolada sem epitélio funcional.

Figura 14 – Efeito do tratamento de *AcE* sobre a musculatura lisa das vias aéreas de camundongos, em traqueias isoladas de camundongos AJ, sem epitélio e pré-contraídas com Cch. Em A, registro original, as setas indicam o momento de adição do *AcE* (1, 3, 10, 30,  $10^2$  e  $3 \times 10^2$   $\mu\text{g/ml}$ ). Em B, curva concentração-resposta para *AcE* onde se obteve  $E_{\text{max}} = 47,2 \pm 7,0$  (%).

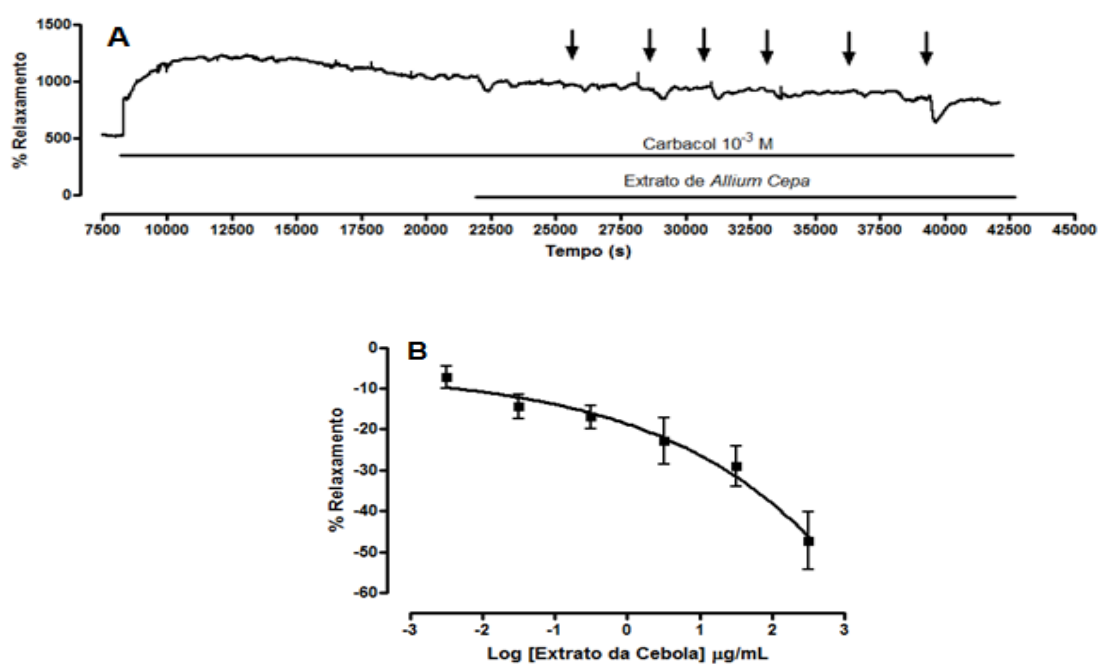
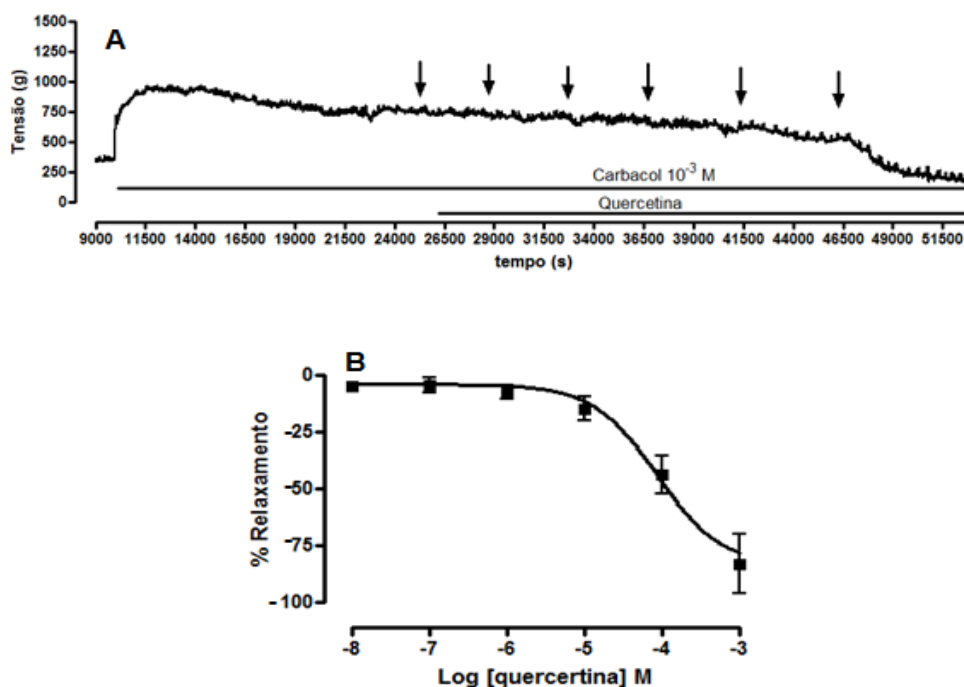




Figura 15 – Efeito do tratamento de quercetina sobre a musculatura lisa das vias aéreas de camundongos, em traqueias isoladas de camundongos AJ, sem epitélio e pré-contráidas com Cch. Em A, registro original, as setas indicam o momento de adição da quercetina ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-3}$  M). Em B, curva concentração-resposta para quercetina onde se obteve  $E_{max} = 84,0 \pm 13,1$  (%).

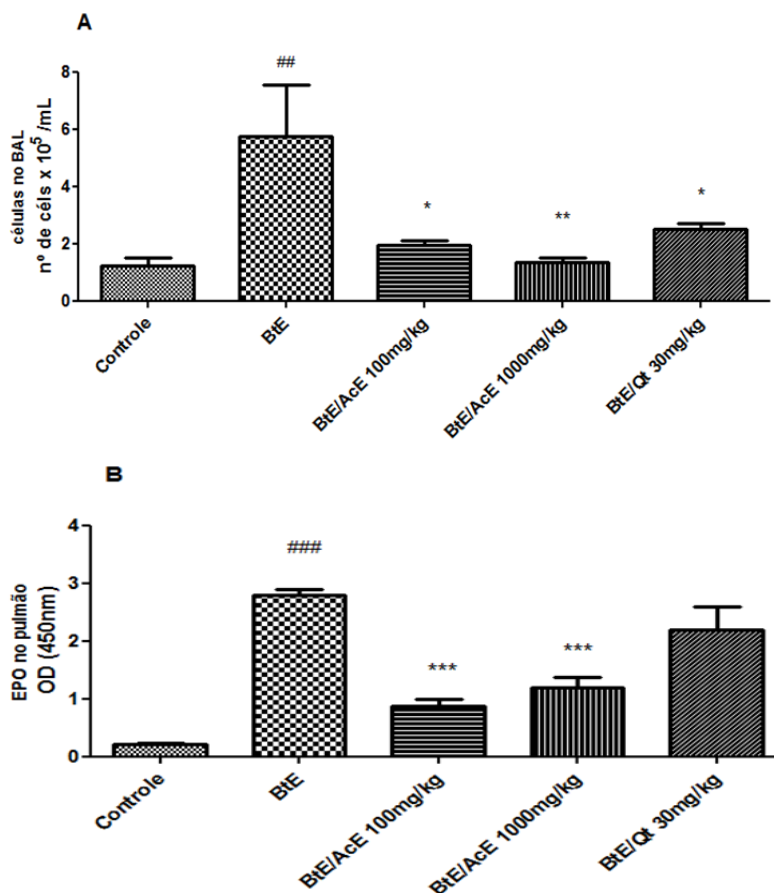


#### 5.4 EFEITO DO *ACE* E QUERCETINA SOBRE A CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS NO LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL) E AVALIAÇÃO DA PEROXIDASE EOSINOFÍLICA (EPO) NO PULMÃO.

Como esperado, camundongos AJ sensibilizados com *BtE* apresentaram uma maior produção de células totais no BAL em relação aos animais controles negativos (Figura 16 A, ##  $p < 0,01$ , ANOVA-Tukey). Porém, quando os camundongos sensibilizados por *BtE* foram tratados com o *AcE* ou quercetina, a contagem total de células diminuiu significativamente, e isso pôde ser observado tanto para os camundongos tratados com 100 ou 1000mg/kg/dia de *AcE* quanto para os tratados com 30mg/kg/dia de quercetina (Figura 16 A, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , ANOVA-Tukey). Adicionalmente, a sensibilização dos animais com *BtE* também estimulou a produção de peroxidase eosinofílica no pulmão (Figura 16B, ###  $p < 0,001$ , ANOVA Tukey). Quando os animais foram tratados com 100 ou 1000 mg/kg/dia de *AcE*, apresentaram uma redução significativa de peroxidase eosinofílica no pulmão (\*\*\*)  $p < 0,001$

ANOVA-Tukey). No entanto, o tratamento com 30mg/kg/dia de quercetina não mostrou uma redução estatisticamente significante (Figura 16B).

Figura 16 – Efeito do tratamento de *AcE* ou quercetina sobre a contagem total de células BAL e na produção da peroxidase eosinofílica do pulmão. Camundongos experimentalmente sensibilizados com *BtE* foram tratados com *AcE* (*BtE*/100mg/kg/dia ou *BtE*/1000mg/kg/dia) ou quercetina (*BtE*/30mg/kg/dia). Em A, efeito do tratamento sobre a contagem total de células BAL, e, em B, efeito na produção da peroxidase eosinofílica do pulmão. Foram considerados estatisticamente significantes ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle negativo, e \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  \*\*\* e  $p < 0,001$  em relação ao grupo sensibilizado (*BtE*). Os resultados são expressos em média e desvio padrão, ANOVA-Tukey.

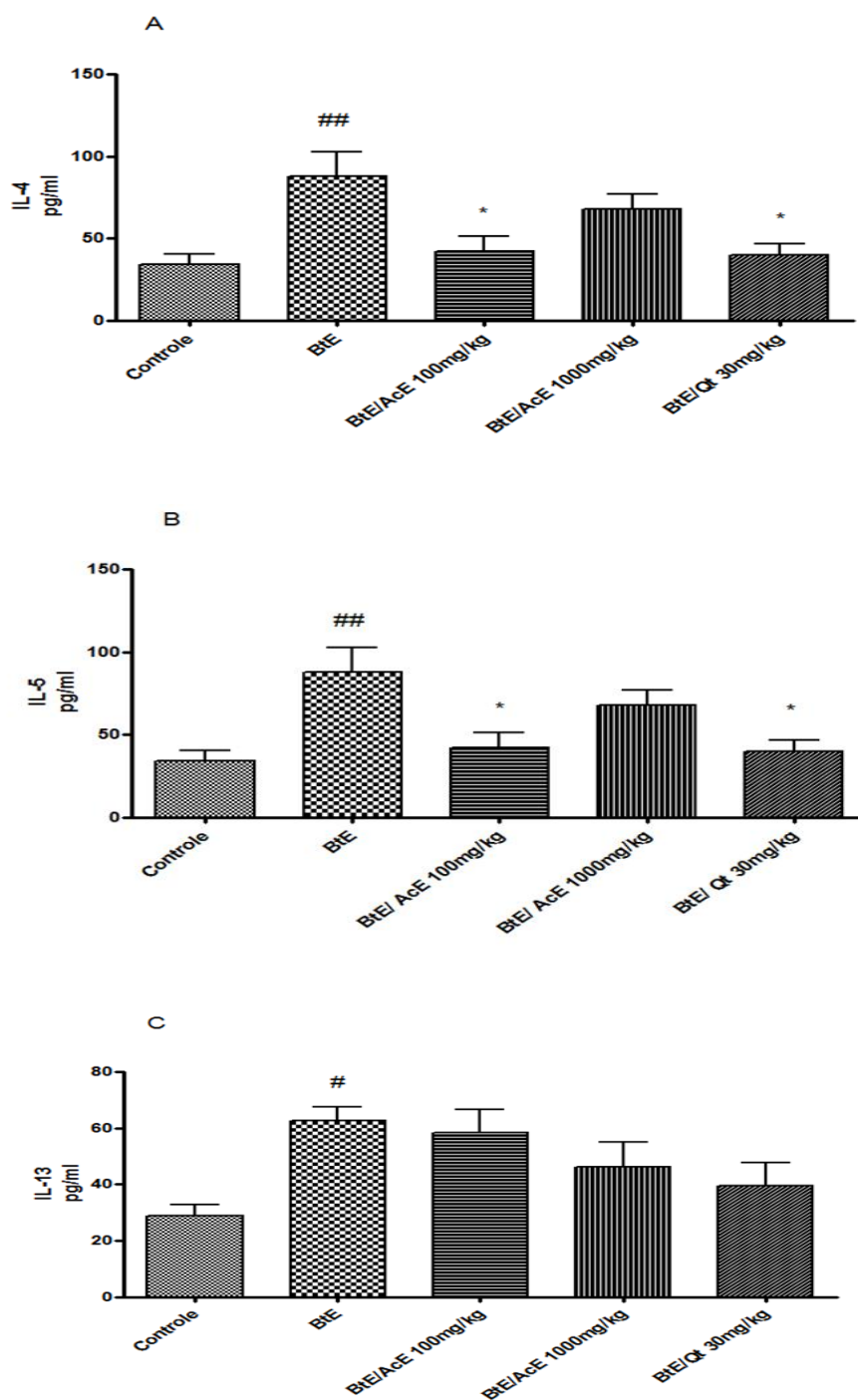


### 5.5 EFEITO DO TRATAMENTO DE ACE E QUERCETINA SOBRE A SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS (IL-4, IL-5 E IL-13) NO BAL.

A sensibilização com *BtE* de camundongos AJ aumentou significativamente a produção de IL-4, IL-5 e IL-13, citocinas com perfil Th2, em relação aos animais controles negativos (Figura 17 ABC; #  $p < 0,05$  e ##  $p < 0,01$ , ANOVA-Tukey). Quando

os camundongos sensibilizados foram tratados com *AcE* ou quercetina, houve diminuição significativa da produção de IL-4 e IL-5, tanto para os grupos de camundongos tratados com 1000mg/kg/dia de *AcE* quanto para os tratados com 30mg/kg/dia de quercetina (Figura 17A e 17B, \*  $p < 0,05$  ANOVA-Tukey). Entretanto, no grupo tratado com 1000mg/kg/dia de *AcE*, não houve uma redução significativa tanto da IL-4, quanto da IL-5 (Figura 17 A e 17 B). Em relação à produção de IL-13, não houve redução significativa dessa citocina no BAL dos animais sensibilizados com *BtE* e tratados com *AcE* ou quercetina.

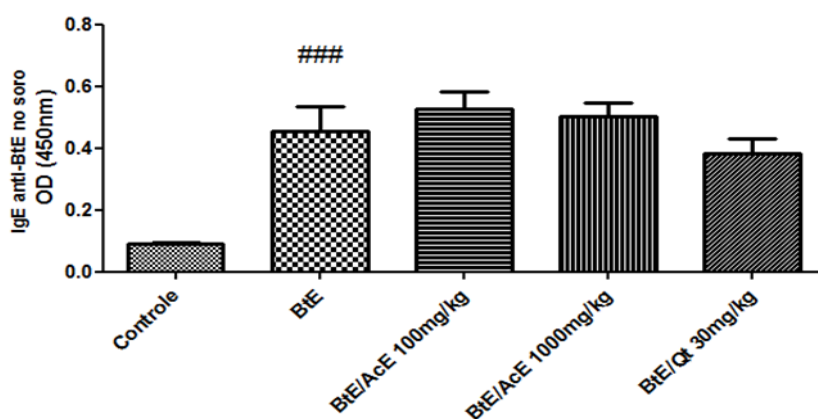
Figura 17 – Efeito do tratamento de *AcE* ou quercetina sobre a produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-13. Camundongos experimentalmente sensibilizados com *BtE* foram tratados com *AcE* (*BtE*/100mg/kg/dia ou *BtE*/1000mg/kg/dia) e quercetina (*BtE*/30mg/kg/dia). Efeito do tratamento na produção da citocinas IL-4, em A; da IL-5, em B; e da IL-13, em C. Foram considerados estatisticamente significantes #  $p < 0, 05$  e ##  $p < 0, 01$  em relação ao grupo controle e \*  $p < 0, 05$ , em relação ao grupo sensibilizado (*BtE*). Os resultados são expressos em média e desvio padrão, ANOVA-Tukey.



## 5.6 EFEITO DO TRATAMENTO DE *AcE* E QUERCETINA SOBRE A DOSAGEM DE IGE ANTI- *BtE* NO SORO

A sensibilização com *BtE* de camundongos AJ estimulou a produção de IgE total no soro dos animais em relação aos animais controles negativos (Figura 18 ###  $p < 0,001$ ; ANOVA-Tukey). Contudo, o tratamento com *AcE* (100 ou 1000 mg/kg/dia) ou quercetina (30 mg/kg/dia), não induziu redução significativa da produção de IgE desses grupos sensibilizados e tratados em relação ao grupo de animais apenas sensibilizados.

Figura 18 – Efeito do tratamento de *AcE* ou quercetina sobre a dosagem de IgE anti- *BtE*. Camundongos experimentalmente sensibilizados com *BtE* foram tratados com *AcE* (*BtE*/100mg/kg/dia ou *BtE*/1000mg/kg/dia) e quercetina (*BtE*/30mg/kg/dia). Efeito do tratamento na dosagem de IgE anti- *BtE* no soro. Foram considerados estatisticamente significantes ###  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle negativo. Os resultados são expressos em média e desvio padrão, ANOVA-Tukey.



## 5.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO PULMÃO

A sensibilização dos animais com *BtE* induziu uma migração de células inflamatórias para a região peribroncovascular (Figura 19B) em relação aos animais controle negativo (Figura 19A). O tratamento com 100 mg/kg/dia de *AcE* (Figura 19C), com 1000 mg/kg/dia de *AcE* (Figura 19D) ou com 30 mg/kg/dia de quercetina (Figura 19E) parece ter reduzido a densidade de células nessas regiões, aproximando-se dos animais controles negativos (Fig. 19B). É relevante observar que o tratamento com o *AcE* (Figura 19C e 19D) parece ter uma melhor eficácia do que com a quercetina (Figura 19E). Na figura 19, as lâminas foram coradas com HE e observadas em um aumento de 40x.

A sensibilização com *BtE* induziu um aumento da secreção de muco brônquico (Figura 20B), em relação aos animais controles negativos (Figura 20A). Pode-se observar que, nas lâminas dos animais que tiveram o tratamento com *AcE* (Figura 20C e 20D), houve uma supressão na produção de muco no tecido pulmonar, porém isso não pôde ser observado nas lâminas dos animais tratados com a quercetina (Figura 20E). Na Figura 20, as lâminas foram coradas com PAS e observadas em um aumento de 40x.

Figura 19 – Efeito do tratamento de *AcE* ou quercetina sobre arquitetura pulmonar de camundongos AJ, com aumento de 40X. Lâminas coradas com HE. Em A, animais não sensibilizados com *BtE* e, em B, a sensibilização dos animais com *BtE* induziu uma migração de células inflamatórias para a região peribroncovascular. Efeito do tratamento com 100 mg/kg/dia de *AcE* (C), com 1000 mg/kg/dia de *AcE* (D) ou com 30 mg/kg/dia de quercetina (E), em animais sensibilizados com *BtE*.

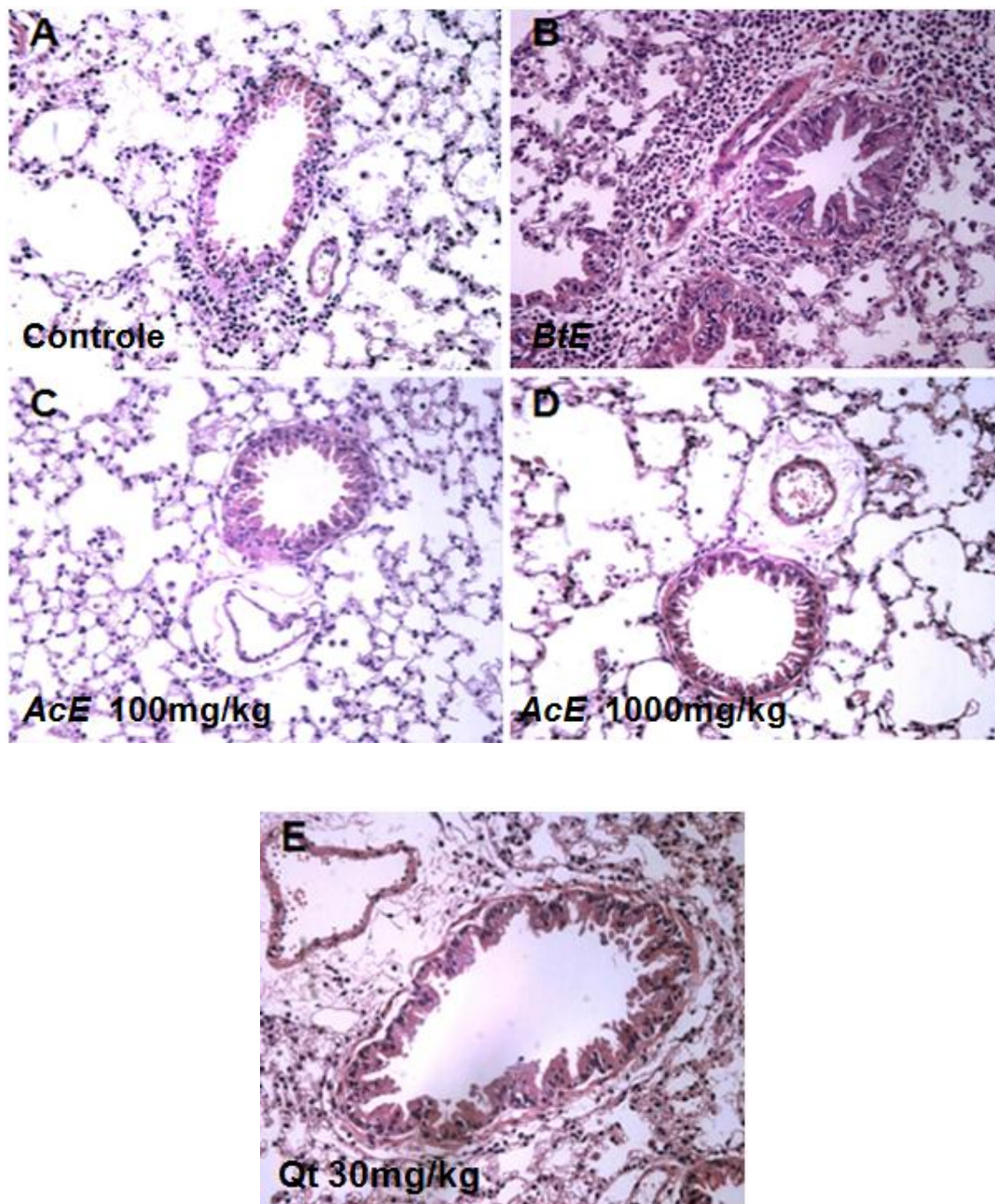
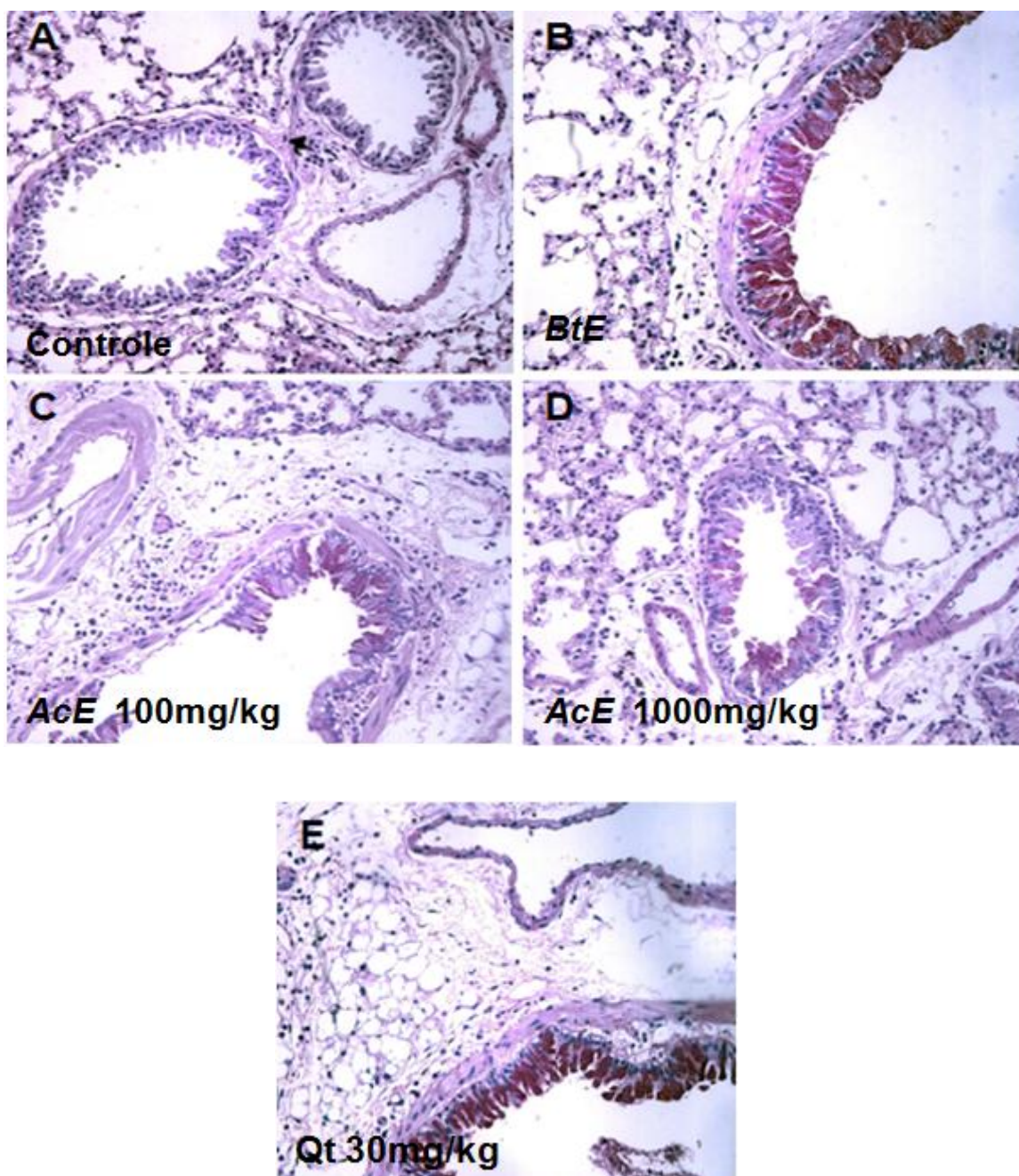


Figura 20 – Efeito do tratamento de *AcE* ou quercetina sobre a produção de muco de camundongos AJ, com aumento de 40X. Lâminas foram coradas com PAS. Em A, animais não sensibilizados com *BtE* e, em B, a sensibilização dos animais com *BtE*, que induziu uma migração de células inflamatórias para a região peribroncovascular. Efeito do tratamento com 100 mg/kg/dia de *AcE* (C), com 1000 mg/kg/dia de *AcE* (D) ou com 30 mg/kg/dia de quercetina (E), em animais sensibilizados com *BtE*.





## 6 **D**ISSCUSSÃO

A asma constitui um importante problema de saúde pública, uma vez que tem alta prevalência mundial (BATEMAN et al., 2008). Os objetivos atuais consistem em conseguir elucidar os mecanismos fisiopatológicos dessa enfermidade, visto que a sua fisiopatologia não está completamente explicada, e criar diretrizes para um tratamento novo e eficaz (O'BYRNE, 2009), já que os principais tipos de fármacos utilizados no tratamento da asma – broncodilatadores e agentes antiinflamatórios –, além de gerarem efeitos colaterais importantes, não garantem uma remissão definitiva da doença (CORRÊA, 2008).

Neste trabalho foi avaliado, *in vivo* e *in vitro*, o potencial terapêutico da *Allium cepa* L. e um dos seus principais metabólitos, a quercetina.

Para tanto, investigou-se, em estudos *in vitro*, o potencial terapêutico das drogas sobre produção de óxido nítrico, modulação de citocinas e efeito broncodilatador, através de ensaio com traqueia isolada. Em estudos *in vivo*, investigou-se, em modelo de asma induzida pelo ácaro *Blomia tropicalis*, o papel anti-inflamatório exercido pelas substâncias estudadas. O modelo experimental de asma utilizado neste estudo foi descrito previamente pelo nosso grupo, no qual camundongos AJ foram sensibilizados com 100 µg de *BtE* por animal, comparando-se com o clássico modelo de ovalbumina. Esse modelo experimental que mimetiza a asma em humanos, através da sensibilização por *BtE*, induziu o aumento da produção de parâmetros inflamatórios importantes na caracterização do quadro alérgico (BAQUEIRO, 2007; BAQUEIRO et al., 2010).

Foi realizado, neste trabalho, um estudo *in vitro* sobre a produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. Essa análise mostrou que esplenócitos de camundongos sensibilizados com *BtE* e estimulados com mitógeno pokeweed (PWM) apresentaram uma maior produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, quando comparados com os controles negativos. Porém, em cultura de esplenócitos tratados com diferentes concentrações de *AcE* (10µg/ml, 100µg/ml e 1000 µg/ml) ou quercetina (3,75; 7,5; 15 ou 30 µg/ml), ocorreram reduções significativas na produção das citocinas inflamatórias.

Quando ocorre a interação entre o alérgeno e a IgE presente nos mastócitos, há liberação de histamina, prostaglandina (PG) D<sub>2</sub> e leucotrienos, e ocorre uma hiperresponsividade brônquica com obstrução de vias aéreas (BATEMAN, et al. 2008; JOSKOVA, 2011) e isso faz com que drogas tenham, nessas substâncias, o alvo para o mecanismo de ação. Sendo assim, como em estudos anteriores (JOSKOVA, 2011;

CAPASSO, 2009; FERNANDEZ, 2005; LEE et al., 2011), investigou-se o potencial terapêutico do *AcE* e da quercetina em traqueia isolada de camundongos. Pôde-se observar que tanto *AcE* (1, 3, 10, 30,  $10^2$  e  $3 \times 10^2$   $\mu\text{g/ml}$ ) quanto a quercetina ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-3}$  M), nas concentrações testadas, exerceram uma atividade de relaxamento sobre a musculatura lisa da traqueia isolada de camundongo pré-contraída. Sendo assim, mesmo que o muco ainda esteja presente, a ação broncodilatadora das drogas testadas, contribui para uma menor obstrução das vias aéreas. Essas substâncias apresentaram os valores de  $\text{CE}_{50} = 7,1$  (1,8 – 27,4)  $\mu\text{g/mL}$  e  $\text{CE}_{50} = 8,9$  (4,8 – 16,2)  $\times 10^{-5}$  M, respectivamente. A atividade relaxante do *AcE* e da quercetina, observada neste estudo, é importante e contribui de maneira significativa para o processo de validação do uso medicinal do *Allium cepa* L., indicada tradicionalmente no tratamento da asma.

Adicionalmente, investigamos, *in vitro*, o potencial de *AcE* e quercetina sobre a modulação de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos peritoneais. A cultura de macrófagos peritoneais estimulados com LPS apresentou uma maior produção de óxido nítrico, quando comparada com os controles negativos. Quando as células estimuladas com LPS foram tratadas com diferentes concentrações de *AcE* (10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  ou 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) ou de quercetina (3,75; 7,5; 15 ou 30  $\mu\text{g/ml}$ ), houve uma redução significativa da produção de óxido nítrico em relação ao controle positivo. Esse achado valida a ação dessas substâncias sobre a regulação do óxido nítrico, importante modulador inflamatório.

Sabendo-se da necessidade de investigar mais profundamente os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na atividade farmacológica de drogas, foi realizado, no presente trabalho, um estudo *in vivo*, em que camundongos AJ sensibilizados com *BtE* (100  $\mu\text{g}$  por animal) tiveram aumentados parâmetros imunológicos típicos da fisiopatogenia da asma. Sendo assim, a discussão a seguir, será baseada no potencial terapêutico da *AcE* e quercetina sobre a mensuração dos seguintes parâmetros: presença de células no lavado bronco-alveolar (BAL), produção de peroxidase eosinofílica no pulmão, produção de citocinas inflamatórias (IL-4, IL-5 e IL-13) no BAL, produção de IgE específica e as alterações histopatológicas nos pulmões. Corroborando este estudo, estudos anteriores (HOLGATE et al., 2003; BAQUEIRO et al., 2010) mostram que a sensibilização com *BtE* produziu aumento de infiltrado celular no pulmão, altos níveis de EPO no pulmão e IgE específica para *BtE*, assim como induziu a produção de IL-5, IL-13 e IL-4, citocinas importantes para o desenvolvimento e manutenção da resposta

Th2, perfil imunológico característico da asma alérgica (HOLGATE et al., 2003; BAQUEIRO et al., 2010).

A patogênese da asma associa-se a mecanismos moleculares e celulares da inflamação das vias aéreas. Citocinas, quimocinas e moléculas de adesão induzem a ativação e o recrutamento de células inflamatórias, em particular dos linfócitos, basófilos e eosinófilos para o local onde ocorreu o contato com o alérgeno (TODO-BOM, 2006), confirmando, dessa forma, o que foi encontrado neste estudo, onde o aumento da celularidade total no BAL pôde ser observado em camundongos sensibilizados com *BtE*. Adicionalmente, pôde-se observar, de forma estatisticamente significativa, a diminuição de células totais nos grupos de animais sensibilizados e tratados com *AcE* (100 ou 1000mg/Kg), bem como naqueles tratados com quercetina (30mg/Kg).

O infiltrado eosinofílico é estimulador de quimocinas proinflamatórias e enzimas citolíticas, incluindo a proteína catiônica eosinofílica e a proteína básica principal, que provocam ruptura da integridade do epitélio das vias aéreas (TODO-BOM, 2006). Sendo assim, drogas que modulem o recrutamento de eosinófilos ou a sua ativação podem ser importantes para reduzir a inflamação pulmonar na asma, quando ela é induzida por *BtE* (BAATJES, 2002; BAQUEIRO et al., 2005). Este trabalho corrobora estudos anteriores que descrevem o papel inibitório de produtos naturais na asma, nos quais pôde ser observado o potencial imunomodulador (CERQUEIRA-LIMA, 2010). Essas substâncias, quando administrados em camundongos com alergia induzida por *BtE*, além de induzirem uma diminuição da celularidade total no BAL, modularam parâmetros que refletem a supressão da degranulação de eosinófilos pulmonares. Sendo assim, apesar da quercetina (30mg/Kg) não ter modulado significativamente a EPO no pulmão, os camundongos sensibilizados e tratados com *AcE* (100 ou 1000mg/Kg) apresentaram uma diminuição significativa na dosagem da peroxidase. Células inflamatórias envolvidas na fisiopatogênia da asma, foram moduladas com o tratamento com *AcE*, suprimindo o desencadear da resposta alérgica. Nesse contexto, pode-se destacar o papel da IL-5 na regulação eosinofílica.

Estudos anteriores em humanos mostraram que a adição de anticorpo anti-IL-5 na terapia contra a asma acelerou significativamente a apoptose de eosinófilos, diminuindo a eosinofilia pulmonar (SIMON, 1997). Adicionalmente, estudos com camundongos que tiveram o gene para a IL-5 inativado mostraram uma ausência na

eosinofilia pulmonar (RENAULD, 2001), oferecendo uma lógica experimental validada no presente estudo, onde se pôde observar a redução significativa de IL-5, acompanhada da diminuição significativa da peroxidase eosinofílica no pulmão de camundongos sensibilizados com *BtE* e tratados com *AcE*.

A IL-4, IL-5 e IL-13, citocinas com perfil celular Th2, influenciam a produção da IgE, imunoglobulina que desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da asma (CHUNG, 1999). Os linfócitos Th2, presentes na mucosa brônquica na asma, induzem a síntese de IgE pelos plasmócitos, através da ação de citocinas como IL-4 e a IL-13, e favorecem a diferenciação e ativação dos eosinófilos pela ação da IL-5 (TODO-BOM, 2006). Dessa forma, a modulação da imunoglobulina E, como a realizada pelo Omalizumabe, representa um eficiente mecanismo na redução de vários marcadores da inflamação (HOLGATE et al., 2009). A modulação de quantidades de IgE, medidas no soro de camundongos sensibilizados com *BtE* e tratados com *AcE* e quercetina, não foi estatisticamente significativa. Esses resultados podem estar relacionados à falta de eficácia na modulação da IL-13 que, além de IL-4, é importante reguladora da produção de IgE.

Neste estudo, o *AcE* e a quercetina tiveram uma ação inibitória estatisticamente significativa sobre a dosagem de IL-4 e IL-5, no BAL de camundongos tratados com *AcE* (100mg/Kg) e quercetina (30mg/Kg). Porém esse padrão não se manteve estatisticamente significativo em relação a IL-13. A redução estatisticamente significativa da IL-13 *in vitro*, o que não pôde ser observado *in vivo*, reforça a importância dos trabalhos *in vivo* para a elucidação dos mecanismos envolvidos nas atividades de drogas. Acredita-se que as drogas tenham sido metabolizadas ou não atingiram concentrações plasmáticas suficientes para modulação da IL-13 *in vivo*.

A IL-4, além de modular a ativação de eosinófilos – juntamente com a IL-5 –, como mencionado anteriormente, ativa células B, a produção de IgE e a degranulação de mastócitos (RENAULD, 2001), sendo sua supressão, como foi mostrado neste estudo, fundamental para a modulação de sintomas característicos da doença. Em camundongos sensibilizados e tratados, pôde-se observar que os grupos tratados com quercetina (30mg/Kg) e *AcE* (1000mg/Kg) obtiveram uma redução significativa nesse parâmetro avaliado, não tendo a dose mais baixa de *AcE* (100mg/Kg) o mesmo resultado.

A IL-13 induz características importantes na asma brônquica, tais como infiltração eosinofílica pulmonar e hipersecreção de muco (WYNN, 2003; KIBE et al., 2003), que puderam ser observados nos camundongos que tiveram a asma brônquica induzida pelo *BtE*. A não supressão da produção de IL-13 observada neste trabalho pôde ser comparada com achados no tratamento com glicocorticoides. Apesar de esses fármacos diminuírem a inflamação nas vias aéreas e serem comumente usados no tratamento da asma, seus efeitos sobre características dependentes da IL-13 ainda são desconhecidos (KIBE et al., 2003). Esses achados, que se aproximam com os deste trabalho, sugerem que os glicocorticoides não são suficientes para suprimir características dessa patologia ligadas à produção de IL-13, como a AHR ou hiperplasia de células caliciformes. Como não houve uma modulação significativa de IL-13 pelas drogas testadas, acredita-se que, neste trabalho, assim como em outros anteriores, a presença de muco esteja fortemente ligada aos níveis aumentados de IL-13 em camundongos com asma induzida (KIBE et al., 2003). Apesar dessa hipersecreção ainda se mostrar presente no pulmão de camundongos estimulados com *BtE* e tratados com *AcE* ou quercetina, pôde-se notar uma menor quantidade de muco nos camundongos tratados com *AcE* (100mg/Kg ou 1000mg/Kg), mas não com quercetina.

O *AcE* teve um melhor efeito sobre os parâmetros avaliados, em comparação com a quercetina, um flavonoide isolado do *Allium cepa* L.. Esse fato corrobora pesquisas de produtos naturais de estudo anteriores, onde se afirma poder obter melhores respostas biológicas quando se tem o efeito aditivo ou sinérgico de diferentes compostos de um extrato, sugerindo o conceito de pureza-atividade com relação aos produtos naturais (JAKI et al., 2008). Sendo assim, a *AcE* parece ser uma substância mais interessante que a quercetina isolada, no tratamento da asma. Contudo, novos estudos fazem-se necessários, para que se elucidem os mecanismos celulares e moleculares pelos quais a *AcE* desempenha sua ação.

Considerando a fisiopatologia característica do processo alérgico, podem-se destacar possíveis alvos terapêuticos de drogas com propriedades antialérgicas, dentre eles a regulação através da ativação do sistema imune inato pela interação com toll like receptors (TLR), o aumento da população de células T regulatórias (FoxP3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>), a diminuição da produção de citocinas Th2, a redução da ativação de linfócitos B e o bloqueio da degranulação de mastócitos (ROBINSON, 2010). Os resultados obtidos neste trabalho constituem um incentivo para o investimento no desenvolvimento de

medicamentos que empreguem a *Allium cepa* L. no tratamento da asma alérgica. Adicionalmente, validam a indicação popular para essa espécie. Contudo, além da elucidação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no mecanismo de ação dessa espécie estudada, fazem-se necessários ensaios clínicos que possibilitem a avaliação da sua eficácia em humanos.

## **7 CONCLUSÕES**



O extrato da *Allium cepa* L. (*AcE*) e a quercetina (*Qt*) reduziram significativamente parâmetros inflamatórios, no modelo de alergia ao *Blomia tropicalis*, ácaro causador de asma em humanos. O extrato da *AcE* e a *Qt* causaram um relaxamento sobre a musculatura lisa das vias aéreas.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o potencial terapêutico da *AcE* e da *Qt* no tratamento da asma alérgica experimental.

# REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. E A. H. LICHTMAN. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ALTURA BM, ALTURA BT. Calcium content and force of drug-induced contractions of arterial muscle during recovery in vitro. **Proc Soc Exp Biol Med**. v.135, n.3, p.739-44, Dec, 1970.

ARLIAN L.G., D.L. VYSZENSKI-MOHER, et al. Allergenicity of the mite, *Blomia tropicalis*. **J Allergy Clin Immunol**. v.91, n.5, p.1042-1050, 1993.

AÏT-KHALED N, ENARSON D, BOUSQUET J. **Bulletin of the World Health Organization**. v.83, p. 548-554, 2001.

BAATJES A. J., R. SEHMI, et al. Anti-allergic therapies: effects on eosinophil progenitors. **Pharmacol Ther**. v.95, n.1, p.63-72, 2002.

BATEMAN, E.D., S.S. HURD, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. **Eur Respir J**. v. 31, n.1, p.143-178, 2008.

BARBOSA-FILHO J.M., AGRA M.F., THOMAS G. Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). **J Braz Assoc Advanc Sci**. v.49, p.386-394, 1997.

BAQUEIRO T.F. **Investigação sobre adjuvantes da resposta Th1 e obtenção de antígenos recombinantes de *Blomia tropicalis* voltados para aplicação em vacinas e imunoterapia contra enfermidades alérgicas**. Salvador, 2007. Tese (Mestrado em Imunologia) Universidade Federal da Bahia.

BERNSTEIN P.R. Chemistry and structure-activity relationships of leukotriene receptor antagonists. **Am J Respir Crit Care Med**. v.157, p.220-8, 1998.

BOOTS A.W., GUIDO R.M.M. HAENEN, Aalt Bast Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**. v.585, p.325-337, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, p.126, 2011.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de ciência, tecnologia e insumos estratégicos. Departamento de assistência farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, (Série B. Textos Básicos de Saúde), 2006.

CARDOSO C.A., VILEGAS W., BARISON A., HONDA N.K. Simultaneous determination of furanocoumarins in infusions and decoctions from "Carapiá" (*dorstenia* species) by high-performance liquid chromatography. **J Agric Food Chem**. v.50, n.6, p.1465-9, Mar, 2002

BARNES P.J. Theophylline. New perspectives for an old drug. **Am J Respir Crit Care Med**. v.167, p.813-8, 2003.

BEHLING, E.B. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.** Araraquara. v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BIELORY L., J. RUSSIN, et al. Clinical efficacy, mechanisms of action, and adverse effects of complementary and alternative medicine therapies for asthma. **Allergy Asthma Proc**. v.25, n.5, p. 283-291, 2004.

BAMBERGER C.M., SCHULTE H.M., CHROUSOS G.P. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. **Rev**. v.17, p. 245-61, 1996.

BUTTGEREIT, F. BRAND, M.D. BRUTMESTER, G-R. Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. **Biochem Pharmacol**. v.58, p. 363-8, 1999.

BOUSQUETJ., BOUSQUET P. J., et al. The public health implications of asthma. **Bull World Health Organ**. v.83, n.7, p.548-554, 2005.

BOOTS AW, Wilms LC, Swennen EL, Kleinjans JC, Bast A, Haenen GR. *in vitro* and *ex vivo* anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers. **Nutrition**. v.24, n.7-8, p.703-10, 2008.

BOZZA P. T., Castro-Faria-Neto H. C., et al. Requirement for lymphocytes and resident macrophages in LPS-induced pleural eosinophil accumulation. **J Leukoc Biol**. v.56, n.2, p.151-158, 1994.

CAPASSO R., AVIELLO G., ROMANO B., ATORINO G., PAGANO E., BORRELLI F. Inhibitory effect of quercetin on rat trachea contractility *in vitro*. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.61, n.1, p.115-9, 2009.

CERQUEIRA-LIMA AT, ALCÂNTARA-NEVES NM, DE CARVALHO LC, COSTA RS, BARBOSA-FILHO JM, PIUVEZAM M, MOMTCHILO R, BARBOZA R, DE JESUS OLIVEIRA E, MARINHO A, FIGUEIREDO CA. Effects of Cissampelos sympodialis Eichl. and its alkaloid, warifteine, in an experimental model of respiratory allergy to Blomia tropicalis. **Curr Drug Targets**. v.11, p.1458-67, 2010.

CHIBA Y, MATSSUE K, MISAWA M. RhoA, a Possible Target for Treatment of Airway Hyperresponsiveness in Bronchial Asthma. **J Pharmacol Sci**. v.114, p.239-247, 2010.

CHIRUMBOLO S., A. CONFORTI, et al. Stimulus-specific regulation of CD63 and CD203c membrane expression in human basophils by the flavonoid quercetin. **Int Immunopharmacol**. v.10, n.2, p. 183-192, 2010.

CHUNG K. F. AND BARNES P. J. Cytokines in asthma. **Thorax**. v.54, n.9, p.825-857, 1999.

COHN L., ELIAS J. A., et al. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. **Annu Rev Immunol**. v.22, p.789-815, 2004.

CORRÊA M., MELO G., et al. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, p.785- 797, 2008.

COSTA E., FRANÇA A. T., SILVA J.R. Nitric oxide and bronchial asthma- review. **Rev. bras. alergologia imunopatol**, v.22, n.3, p.83-93, 1999.

COSTA R. S., T. BRASIL, et al. Produtos naturais utilizados para tratamento de asma em crianças residentes na cidade de Salvador-BA, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.20, n.4, 2010.

DAS M., RAM A., et al. Luteolin alleviates bronchoconstriction and airway hyperreactivity in ovalbumin sensitized mice. **Inflamm Res**. v.52, n.3, p.101-106, 2003  
DE BOER V. C. et al. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. **J Nutr**. v.135, n. 7, p.1718-1725, jul. 2005.

DI MASCIO P, KAISER S, SIES H. Quercetin as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch Biochem Biophys.** v.274, p.532-8, 1989.

DORSCH W., ADAM O., et al. Antiasthmatic effects of onion extracts-detection of benzyl- and other isothiocyanates (mustard oils) as antiasthmatic compounds of plant origin. **Eur J Pharmacol.** v.107,n.1, p.17-24, 1984.

EDER W., EGE M. J., et al. The asthma epidemic. **N Engl J Med.** v.355, n.21, p. 2226-2235, 2006.

ERLUND I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition Research.** v.24, p. 851-874, 2004.

EUM et al. Inhibition of allergic airways inflammation and airway hyperresponsiveness in mice by dexamethasone: Role of eosinophils, IL-5, eotaxin, and IL-13. **J allergy clin immunol.** v.11,n.5, p. 1049-1061, 2003.

FARIA E. Therapeutic options for severe asthma. **Rev. bras. alergologia imunopatol.** v.29, n.6, p.256-262, 2007.

FINKELMAN FD. Peanut allergy and anaphylaxis. **Curr Opin Immunol.** v.22, n.6, p.783-8, 2010.

FERNANDEZ J, REYES R, PONCE H, OROPEZA M, VANCALSTEREN MR, JANKOWSKI C, CAMPOS MG. Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways. **Eur J Pharmacol.** v.522, p.108-115, 2005.

GUEVARA J. P., DUCHARME F. M., et al. Inhaled corticosteroids versus sodium cromoglycate in children and adults with asthma. **Cochrane Database Syst Rev.** v.2, 2006.

HARBORNE J. **The Flavonoids** - Advances in research since 1986, Florida: Chapman & Hall/CRC, 2000.

HERTOG M. G. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly study. **Lancet.** v. 342, n. 8878, p.1007-1011, 23 out. 1993.

HARWOOD M. et al. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food and Chemical Toxicology**. v.45, p. 2179-2205, 2007.

HOLLMAN PC, BIJSMAN MN, VAN GAMEREN Y, et al. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free Radic Res**. v.31, p.569-573, 1999.

HOWARTH PH. What is the nature of asthma and where are the therapeutic targets? **Respir Med**. v.91, p.2-8, 1997

JAKI BU, FRANZBLAU GS, CHADWICK RL, et al. Purity-Activity Relationships of Natural Products: The Case of Anti-TB Active Ursolic Acid. **J Nat Prod**. v.71, p. 1742–1748, 2008.

JOSKOVA M,FRANOVA S SADLONOVA V., Acute bronchodilator effect of quercetin in experimental allergic asthma. **Bratisl Lek Listy**. v.112, n.1, p.9-12, 2011.

JIMÉNEZ-ALIAGA K, et al, Quercetin and rutin exhibit antiamyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APPswe cells, **Life Sci**. 2011.

KAISER P., YOUSOUF M. S., et al. Anti-allergic effects of herbal product from *Allium cepa* (bulb). **J Med Food**. v.12, n.2, p.374-382, 2009.

KIBE, A., H. INOUE, et al. Differential regulation by glucocorticoid of interleukin-13-induced eosinophilia, hyperresponsiveness, and goblet cell hyperplasia in mouse airways. **Am J Respir Crit Care Med**. v.167, n.1, p.50-56, 2003.

LANZOTTI, V. The analysis of onion and garlic. **J Chromatogr A**. v.1112, n.1-2, p.3-22, 2006.

LANOUE L, GREEN KK, KWIK-URIBE C, KEEN CL: Dietary factors and the risk for acute infant leukemia: evaluating the effects of cocoa-derived flavanols on DNA topoisomerase activity. **Experimental Biology and Medicine**.v.235, p.77–89, 2010.

LAZAAR, A. and R. PANETTIERI Pathogenesis and treatment of asthma: recent advances. **Drug Discov Today Disease Mechanisms**. v.1, p.111-116, 2004.

LEE, S. I. Prevalence of childhood asthma in Korea: international study of asthma and allergies in childhood. **Allergy Asthma Immunol Res.** v. 2, n.2, p. 61-64, 2010.

LIMA LM, FRAGA CAM E BARREIRO EJ. Agentes antiasmáticos modernos: antagonistas de receptores de leucotrienos cisteínicos. **Quim. Nova.** v. 25, n. 5, p. 825-834, 2002

LIU, A. H. Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. **J Allergy Clin Immunol.** v.109, n.3, p. 379-392, 2002.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** v.193, p.265-275, 1951.

MOURA, JAR, CAMARGO, SPAM, BLIC J. Tratamento profilático da asma. **J Pediatria.** p. 97-112, 2002.

MOON, Y. J. et al. Quercetin pharmacokinetics in humans. **Biopharm Drug Dispos.** v.29, n. 4, p.205-217, 29 maio 2008.

MUROTA, K.; TERAQ, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Arch Biochem Biophys.** v. 417, n. 1, p.12-17, 1 set. 2003.

MASOLI, M., D. FABIAN, et al. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy.** v.59, n.5, p. 469-478, 2004.

MARTINEZ FD. Present and future treatment of asthma in infants and young children. **J Allergy Clin Immunol.** p.169-74, 1999.

MELILLO, G.; MELILLO, E.; **Clin. Appl. Immunol. Rev.** v.1, p. 235, 2001.

MIDDLETON, E., JR., C. KANDASWAMI, et al. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol Rev.** v.52, n.4, p. 673-751, 2000.

MIN, Y. D., C. H. CHOI, et al. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. **Inflamm Res.** v.56, n.5, p.210-215, 2007.



MONTEIRO DA, CARLOS IZ, PINTO FG. Diazepam, em dose única, inibe a migração celular, a estimulação macrófágica e a atividade de TNF- $\alpha$  na reação inflamatória aguda induzida por LPS em camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.44, n.4, out./dez., 2008

MULLANE, K. The increasing challenge of discovering asthma drugs. **Biochem Pharmacol**. v.82, n.6, p.586-599, 2011.

O'BYRNE P. M. Allergen-induced airway inflammation and its therapeutic intervention. **Allergy Asthma Immunol Res**. v.1, n.1, p.3-9, 2009.

PARK J. B.; KWAK H. J.; LEE S. H.. Role of hyaluronan in glioma invasion. **Cell Adhesion & Migration**. v.2, n.3, p.202-207, 2008.

PARK Y.K. & LEE C.Y. Identification of isorhamnetin 4'-glucoside in onions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.44, p.34-36, 1996.

PARK H, LEE C, JUNG I D, LEE JS, JEONG Y, CHANG JH, CHUN S , KIM M , CHOI I , AHN S, SHIN Y K, YEOM S, PARK Y. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. **International Immunopharmacology**. v.9, p.261-267, 2009.

RANG MP, DALE MM, RITTER JM, MOORE PK. **Farmacologia**. 5.ed. USA: Elsevier, 2004.

ROBINSON, DS. The role of the T cell in asthma. **J allergy clin immunol**. v. 12, p.541-549, 2010

ROSS JA, KASUM CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annu Rev Nutr**. v.22, p.19-34, 2002.

RANKIN JA, PICARELLA DE, GEBA GP, TEMANN UA, PRASAD B, DICOSMO B, TARALLO A, STRIPP B, WHITSETT J, FLAVELL RA. Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.93, n.15, p.7821-5, 1996.

RHEN T. and J. A. Cidlowski. Antiinflammatory action of glucocorticoids - new mechanisms for old drugs. **N Engl J Med**. v.353, n.16, p.1711-1723, 2005.  
RIO, E. M. B., P. R. GALLO, et al. Mortalidade por asma no Município de São Paulo. **Rev. de Saúde Pública**. v.36, p.149-154, 2002.

ROGERIO AP, KANASHIRO A, FONTANARI C, DA SILVA EVG, LUCISANO-VALIMYM, SOARES EG, et al. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. **Inflamm Res.** v.56, p.402-8, 2007.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, **Oxford.** v.39, p.603-613, 2001.

SNEADER W. **Drug discovery.** A history. Chichester, England: John Wiley and Sons, Ltd, 2005.

SIMON HU, YOUSEFI S, SCHRANZ C, et al. Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. **J Immunol.** v.158, p.3902-8, 1997.

STRATH M, WARREN DJ, SANDERSON CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **J Immunol Methods.** v.83, p.209-215, 1985.

SPAHN J. D. and S. J. Szeffler. Childhood asthma: new insights into management. **J Allergy Clin Immunol.** v.109, n.1, p.3-13, 2002.

SUISSA S. and P. ERNST. Inhaled corticosteroids: impact on asthma morbidity and mortality. **J Allergy Clin Immunol.** v.107, n.6, p.937-944, 2001.

TAYLOR D. R., E. D. BATEMAN, et al.. A new perspective on concepts of asthma severity and control. **Eur Respir J.** v.32, n.3, p.545-554, 2008.

TÔRRES AR, OLIVEIRA RAG, DINIZ MFFM, ARAUJO EC. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: Riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.15, n 4, João Pessoa, 2005.

TUDO-BOM, ANA; PINTO A M. Fisiopatologia da asma grave. **Rev PortImun oalergologia.** v.14, n.2, p.43-48, 2006. VENDRUSCOLO GS, RATES SMK, MENTZ LA. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Rev Bras Farmacogn.** v.15, p.361-372, 2005.

WARNER, J. O., C. MARGUET, et al.. "Inflammatory mechanisms in childhood asthma." **Clin Exp Allergy**. 28 Suppl. v.5, p.71-75, 1998.

World Health Organization. **WHO Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems**. Geneva, 2004.

WYNN, T. A. IL-13 effector functions. **Annu Rev Immunol**. v.21, p.425-456, 2003.

XAGORARI A, PAPAPETROPOULOS A, MAUROMATIS A, ECONOMOU M, FOTSIS T, ROUSSOS C 2000. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. **J Pharmacol Exp Ther**. v.296, p.181-187, 2000.

ZIETKOWSKI, Z., R. SKIEPKO, et al. RANTES in exhaled breath condensate of patients with severe persistent allergic asthma during omalizumab therapy. **Int Arch Allergy Immunol**. v.154, n.1, p.25-32, 2011.