



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA-UFBA
ESCOLA DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS, NUTRIÇÃO E SAÚDE
MESTRADO EM ALIMENTOS, NUTRIÇÃO E SAÚDE

EDUARDO HERNANDEZ FORTES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA QUERCETINA SOBRE
CAMUNDONGOS C57BL/6 E BALB/C COM ASMA EXPERIMENTAL INDUZIDA
POR OVALBUMINA

SALVADOR - BA

2011

EDUARDO HERNANDEZ FORTES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA QUERCETINA SOBRE
CAMUNDONGOS C57BL/6 E BALB/C COM ASMA EXPERIMENTAL INDUZIDA
POR OVALBUMINA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Alimentos, Nutrição e Saúde, Área de Concentração Segurança Alimentar e Nutricional. Universidade Federal da Bahia – UFBA como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Alimentos, Nutrição e Saúde.

Orientadora:

Prof^a Dr^a Rosangela Passos de Jesus

Co-orientadora:

Prof^a Dr^a Simone Garcia Macambira

Linha de Pesquisa:

Bases experimentais e Clínicas da Nutrição

SALVADOR - BA

2011

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA.

F737 Fortes, Eduardo Hernandez

Avaliação do potencial terapêutico da quercetina sobre camundongos C57BL/6 e BALB/C com asma experimental induzida por ovalbumina / Eduardo Hernandez Fortes. – Salvador, 2011.

98 f.

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Passos de Jesus.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Escola de Nutrição, 2011.

1. Animais. 2. Asma 3. Pesquisa Experimental. 4. Animais de laboratório. I. Jesus, Rosângela Passos de. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU: 636.028

Eduardo Hernandez Fortes

**Avaliação do potencial terapêutico da quercetina sobre camundongos
C57Bl/6 e BALB/c com asma aguda induzida por ovalbumina**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde da Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos, Nutrição e Saúde.

Linha de Pesquisa: Bases experimentais e Clínicas da Nutrição.

Aprovada em 31 de março de 2011 pela Banca Examinadora.

Professora Dra. Rosangela Passos de Jesus (Orientadora)
Doutora – Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia

Professor Dr. Jorge Carvalho Guedes
Doutor – Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia

Professora Dra. Mirian Rocha Vásquez
Doutora – UNEB – Escola de Nutrição

Professor Dr. Márcio Ramos Coutinho
Doutor – Fundação Oswaldo Cruz – CPqGM

Dedico este trabalho...

...aos meus pais, Edson e Doroti, os alicerces da minha vida, meus exemplos máximos de bondade, de ternura, de dedicação e de fraternidade.

...ao grande amor da minha vida, minha esposa Cristina, que todos os dias reforça, através de seus carinhos e de sua doçura, o significado da palavra amor.

...a “dona” Conceição e aos meus avós, que tantas vezes precisaram assumir a responsabilidade da árdua tarefa de me criarem.

...a minha irmã, uma pessoa maravilhosa com quem aprendi a enxergar meus inúmeros defeitos e, mesmo depois de tantas desavenças, estendeu sua mão para mim e aceitou a minha amizade.

...ao meu primo Fernando, que insistentemente buscou a minha amizade, suportando, durante muitos anos, meu egocentrismo desmedido.

AGRADECIMENTOS

A professora doutora Rosângela Passos de Jesus

...pela oportunidade de me incluir num maravilhoso mundo novo e pelos seus importantes ensinamentos.

A professora doutora Simone Garcia Macambira

...pela paciência, pela dedicação, pela presteza e por me ensinar tantas coisas inesquecíveis e fascinantes; por me formar como aluno, como pós graduando e, finalmente, como um ser humano melhor. Obrigado professora, doutora, amiga!

A professora doutora Milena Botelho Pereira Soares

...pela magnífica disciplina de Imunologia , por ser meu “norte científico”, a personificação de uma vida dedicada à ciência e ao conhecimento e, acima de tudo, para mim, o exemplo científico máximo a ser seguido, respeitado e admirado.

A professora doutora Lidércia Cavalcanti Ribeiro Cerqueira e Silva, Professora da Faculdade de Farmácia – UFBA, pela inestimável ajuda no fornecimento do fitoterápico e na elaboração da microemulsão utilizada no trabalho.

A equipe toda do LETI

...pelo carinho, pela amizade, pelo companheirismo e pelos ensinamentos. Em especial gostaria de agradecer à querida I.C. Thaíse, a minha colega Mariana, ao meu amigo “Neto” e ao meu amigo Márcio, que ajudaram tanto na realização do meu experimento.

A equipe do Biotério

...por cuidarem com tanta dedicação dos meus animais, especialmente a Fernanda e Rejane, pelas incontáveis dicas importantes e por toda a dedicação, respeito e ajuda.

Ao meu melhor amigo baiano, Alexandre, por tudo que passamos, de bom e ruim, juntos!

A minha amiga Flávia

...pelas conversas, conselhos e a ajuda fundamental na finalização desse trabalho.

Ao secretário José Carlos, o “Zé”, por me ajudar tanto e com absoluta pró atividade. Você é uma pessoa incrível.

Ao meu aluno de graduação Ricardo Prado, pelas nossas tardes de domingo estudando.

A FIOCRUZ

...por ser o lugar fascinante que é, por ter me acolhido e dado ao meu local de trabalho e aprendizado, o verdadeiro contexto de um lar. Eu sou apaixonado por este lugar e ele estará para sempre guardado no meu coração.

A UFBA – Escola de Nutrição

...pela oportunidade ímpar e onde todo esse sonho começou.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido na forma de bolsa.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A doutoranda Juliana Fraga Vasconcelos

...nenhuma palavra e nenhum agradecimento são capazes de expressar o tamanho da minha gratidão por tudo o que você fez por mim. Você despertou em mim os mais nobres sentimentos que uma pessoa pode sentir por alguém: admiração, respeito e gratidão. Espero que um dia eu possa retribuir a altura tudo o que você já fez. Você foi simplesmente maravilhosa e mudou a minha vida para sempre.

Muito obrigado por tudo Ju.

“Há grandes homens que fazem com que todos se sintam pequenos, mas o verdadeiro grande homem é aquele que faz com que todos se sintam grandes também.”

Gilbert Chesterton

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Diagrama da ASMA	pag. 24
FIGURA 2	Fórmula estrutural da quercetina	pag. 27
FIGURA 3	Desenho esquemático de todas as etapas experimentais do Estudo piloto	pag. 36
FIGURA 4	Desenho esquemático de todas as etapas experimentais do Estudo principal	pag. 40
FIGURA 5	Diagrama com as etapas de sensibilização e desafio com OVA	pag. 44
FIGURA 6	Diagrama com as etapas de aplicação de Avaliação Funcional no animais	pag. 45
FIGURA 7	Contagem total de leucócitos no LBA	pag. 47
FIGURA 8	Contagem total de leucócitos no LBA	pag. 48
FIGURA 9	Contagem diferencial de leucócitos no LBA	pag. 49
FIGURA 10	Contagem diferencial de leucócitos no LBA	pag. 49
FIGURA 11	Detecção da produção de IL-4 no LBA	pag. 50
FIGURA 12	Detecção da produção de IL-13 no LBA	pag. 51
FIGURA 13	Detecção da produção de muco	pag. 52

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 Procedimentos realizados em cada grupo pag. 33
experimental. Estudo piloto
- TABELA 2 Procedimentos realizados em cada grupo pag. 35
experimental. Estudo principal
- TABELA 3 Protocolo de aplicação de quercetina. Dosagem pag. 37
utilizada em cada dia de desafio.
- TABELA 4 Protocolo de exaustão física em esteira pag. 39
ergométrica para camundongos

LISTA DE ABREVIATURAS

AF – Avaliação Funcional

ASO – Antígenos Solúveis de Ovo

CBTC – Centro de Biotecnologia e Terapia Celular

CPqGM – Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz

e.p.m. – erro padrão médio

GATA-3 – fator de transcrição específicos para células T (Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3)

IgE – Imunoglobulina E

IL-4 – Interleucina 4

IL-4R α – Receptor alpha de IL-4

IL-5 – Interleucina 5

IL-13 – Interleucina 13

I.P. – Intraperitoneal

ISAAC – The International Study of Asthma and Allergies in Childhood

HE - Hematoxilina Eosina

HRI – Hiper responsividade imediata

LBA – Lavado Bronco Alveolar

LETI – Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia

NFκB – Fator Nuclear Potencializador de Ativação Kappa de Células B

OVA – Ovalbumina

PAS – *Periodic acid-Schiff*

PBS – Solução tampão fosfato (phosphate buffered saline)

PMNs – leucócitos polimorfonucleares

POLAXAMER 407 – Pluronic F127; Polyethylene-polypropyleneglycol; Polyoxyethylene-Polyoxypropylene Block Copolymer; Poly(Ethylene oxide-co-Polypropylene oxide), Block; Block Copolymer of Ethylene Oxide and Propylene Oxide. Chemical Name: Pluronic F127. (C3-H6-O.C2-H4-O)_x

QSP – Quantidade Suficiente Para

T0 – Tempo zero (início do trabalho experimental)

T-bet – T *Box* expresso em células T

RESUMO

Introdução: A asma é uma doença inflamatória complexa e os corticóides são a principal classe de medicamentos utilizada no seu tratamento. Estas drogas apresentam diversos efeitos colaterais e o seu uso não foi eficiente em alguns pacientes cuja causa do óbito foi conseqüente à doença. Assim, o efeito terapêutico da quercetina, na concentração de 20 mg/kg, foi investigado num modelo animal de asma brônquica. **Materiais e Métodos**¹: camundongos das linhagens C57Bl/6 e BALB/c foram imunizados subcutaneamente e desafiados com inalação de ovalbumina. Posteriormente, grupos de animais das duas linhagens foram tratados com quercetina, durante cinco dias consecutivos, no período que antecedia a inalação com ovalbumina². **Resultados:** o tratamento com quercetina reduziu a eosinofilia no lavado brônquio-alveolar. Nos bronquíolos, diminuiu a infiltração de células inflamatórias apenas na linhagem de camundongos BALB/c. Adicionalmente, nesta linhagem, o nível de produção de muco foi reduzido no grupo de animais tratados com o fitoterápico e a diminuição dos parâmetros inflamatórios foi similar ao grupo controle tratado com dexametasona³. Os marcadores inflamatórios avaliados no grupo de camundongos que usou quercetina na linhagem C57Bl/6 não sofreram alterações significativas com relação ao grupo não tratado. **Conclusões:** Nas condições do presente trabalho conclui-se que a quercetina atenuou significativamente as características inflamatórias da asma experimental apenas em camundongos da linhagem BALB/c, embora os mecanismos de ação desse fitoterápico não tenham sido efetivamente evidenciados.

Palavras-chave: quercetina, asma experimental, imunização, desafio com OVA, linhagens de camundongos.

ABSTRACT

Background: Asthma is a complex inflammatory disease and corticosteroids are the major class of drugs used in treatment. These drugs have several side effects and its use was not effective in some patients whose cause of death was attributed to this disease. Thus, the therapeutic effect of quercetin was investigated in an animal model of asthma. **Materials and methods:** mice of strains C57BL/6 and BALB/c were immunized subcutaneously and challenged with inhaled ovalbumin. Later, groups of animals from both strains were treated with quercetin for five consecutive days in the immediately period preceding inhalation of ovalbumina. **Results:** Treatment with quercetin reduced eosinophilia in broncho-alveolar lavage. In the bronchioles, we observed decreased infiltration of inflammatory cells only in the strain BALB/c. Besides, in this strain, the level of mucus production was reduced in animals treated with herbal medicine and the decline in inflammatory parameters was similar to the control group treated with dexametasona. The inflammatory markers did not chain significantly in the group of mice that used quercetin in strain C57BL/6 compared with the untreated group. **Conclusions:** In this present study it was concluded that quercetin significantly attenuated the inflammatory characteristics of asthma only in experimental mice of BALB/c, although the mechanisms of action of this herbal medicine have not been effectively demonstrated.

Keywords: quercetin, experimental asthma, immunization, OVA challenge, mice strains.⁴

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	20
A REVISÃO DA LITERATURA	22
EPIDEMIOLOGIA DA ASMA.....	22
ASMA	22
MEDICAMENTOS PARA O TRATAMENTO DA ASMA.....	24
MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DA ASMA.....	25
QUERCETINA.....	26
AVALIAÇÃO FUNCIONAL NOS MODELOS EXPERIMENTAIS	28
OBJETIVO GERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
LOCAL DA REALIZAÇÃO DO ESTUDO	30
ANIMAIS	30
ASPECTOS ÉTICOS	31
DIVISÃO DOS GRUPOS.....	31
IMUNIZAÇÃO.....	36
SENSIBILIZAÇÃO E DESAFIO COM OVA.....	36
TRATAMENTO.....	37
AVALIAÇÃO FUNCIONAL	38

EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	40
LAVADO BRÔNQUIO ALVEOLAR (LBA)	41
RETIRADA DOS PULMÕES	41
CONTAGEM DE LEUCÓCITOS DO LBA.....	41
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	42
QUANTIFICAÇÃO DE INTERLEUCINAS	42
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
RESULTADOS	47
CONCENTRAÇÃO DE LEUCÓCITOS NO LBA DOS ANIMAIS	47
CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS	48
QUANTIFICAÇÃO DE INTERLEUCINAS NO LBA	50
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO PULMONAR	51
DISCUSSÃO.....	54
CONCLUSÕES.....	622
REFERENCIAS CIENTÍFICAS.....	633
ANEXO 1	699
ANEXO 2	7070
O ARTIGO	711

INTRODUÇÃO

A asma é uma doença inflamatória das vias aéreas e sua expansão tem causado uma preocupação crescente em nível mundial. No Brasil, a asma é a terceira causa de hospitalização no SUS e o país é considerado o 8º no mundo em prevalência de asma (ISAAC, 1998; Ministério da Saúde, 2006).

O tratamento tradicional para o controle dos sinais e sintomas da asma inclui a utilização de corticóides. Embora esses medicamentos levem a uma redução visível e apreciável do mal-estar, dos sinais e sintomas nos pacientes, a terapia prolongada com corticóides⁵ ocasiona efeitos colaterais que trazem danos irreparáveis ao organismo (BARNES, 2006). Assim, uma busca por um tratamento efetivo e sem efeitos adversos é ainda a alternativa para estes antiinflamatórios esteroidais; entretanto, a efetividade desses tratamentos continua sendo questionada.

No processo de desenvolvimento da asma, as citocinas produzidas pelos mastócitos e pelos linfócitos T levam ao recrutamento de eosinófilos, basófilos e por fim, mais recrutamento de linfócitos Th2, causando o recrudescimento do processo inflamatório⁶.

A quercetina é um fitoterápico com propriedades antioxidantes e antiinflamatórias bem demonstradas e a sua utilização com efeito terapêutico eficaz para uma série de enfermidades tem sido proposta por diversos estudos (MISHRA & FLORA, 2008; AUGER *et al.*, 2005; HERTOZ, *et al.*; 1993). Os trabalhos acerca dos benefícios na utilização desse fitoquímico como tratamento para a asma ainda não forneceram resultados conclusivos. Porém, a sua utilização demonstra que, pelo menos para os marcadores inflamatórios investigados, a quercetina foi capaz de diminuir a reação aguda do organismo decorrente de um processo de asma induzida em modelos experimentais (ROGÉRIO *et al.*, 2010).

Outro ponto que ainda permanece inconclusivo na literatura é o fato de não haver uma avaliação funcional não invasiva nos modelos experimentais de asma. Os mecanismos utilizados envolvem geralmente a ventilação pulmonar artificial, que implica no sacrifício dos animais ou um período de sobrevida com animais em estado grave.

Assim, o escopo do presente estudo foi investigar o potencial terapêutico do tratamento com quercetina em modelo experimental de asma aguda induzido em camundongos machos C57Bl/6 e BALB/c, bem como a aplicação de uma avaliação funcional de esforço máximo antes do período de indução de asma, e no período mais agudo de indução dos camundongos da linhagem C57Bl/6, para se verificar se existe uma associação do processo inflamatório com uma diferença de rendimentos nos dois momentos.

A REVISÃO DA LITERATURA

Epidemiologia da asma

A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 150 milhões de pessoas sofram com asma em todo o mundo. A crescente preocupação com as doenças respiratórias foi formalizada no Fórum da Sociedade Internacional de Respiração, que declarou 2010 como o “Ano do Pulmão”, com o objetivo de enfatizar a pesquisa, a conscientização da população e fomentar políticas públicas a respeito das doenças respiratórias.

No Brasil, de acordo com os estudos epidemiológicos do Datasus (2006), a asma é a terceira causa de hospitalização pelo SUS. De acordo com a PORTARIA Nº1021 de 2002 do Ministério da Saúde, a asma provocou 350 mil hospitalizações por ano e em todo o mundo o número de indivíduos acometidos por essa doença vem aumentando. Esses dados colocam o Brasil como o oitavo país no mundo em prevalência de asma (ISSAC, 1998). Baseado nestes números, a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia calcula que entre 7% a 10% dos brasileiros têm asma, perfazendo uma população de 14 a 20 milhões de indivíduos e esta doença causa cerca de duas mil mortes por ano (Ministério da Saúde, 2006).

Asma

A asma alérgica é uma doença inflamatória complexa caracterizada pela dificuldade na ventilação das vias aéreas superiores que espontaneamente se contraem muito ou são obstruídas facilmente em resposta a uma grande variedade de estímulos. O termo asma não se refere a um único tipo de desordem orgânica, mas sim a um grande grupo de patologias que têm características fenotípicas em comum, tais como obstrução reversível das vias aéreas e sintomas associados (HOLGATE, 2008). As diferentes manifestações clínicas de asma envolvem vários fatores ambientais que interagem com as vias aéreas causando inflamação aguda e/ou crônica. A asma é considerada um bom exemplo de interação entre fatores

genéticos e ambientais, embora um único gene ou condição ambiental específica sejam *per si* incapazes de causar a doença (ABBAS *et al.*, 2007).

No nível tissular a asma gera uma resposta multicelular que ocasiona hipersecreção de muco pelas células caliciformes, alterações nas vias aéreas (células epiteliais, fibroblastos, células musculares lisas) com ou sem sinais de remodelamento e um aumento da presença de células inflamatórias, tais como linfócitos, neutrófilos, células dendríticas e mastócitos, com um recrudescimento exacerbado no número de eosinófilos na região, bem como um aumento da presença dessas células no sangue. No caso da asma não ser controlada, ocorre uma presença maciça também de eosinófilos no lavado brônquio alveolar (LBA) (KEY, 2010; British Thoracic Society – GUIDELINES, 1993).

O remodelamento consiste num conjunto de alterações das vias aéreas asmáticas, causando perda de função ventilatória. Neste processo, diversos tecidos são danificados, havendo lesão extensa do epitélio com descamação celular dentro do lúmen da via aérea, com prejuízo na formação ciliar e alteração na matriz extracelular. Também ocorrem alterações nas fibras do sistema elástico, mudanças vasculares, hipertrofia e hiperplasia das glândulas submucosas e hipertrofia e hiperplasia das células musculares lisas em brônquios de asmáticos (MAUAD *et al.*, 2000).

Sob o ponto de vista imunológico, a asma é caracterizada como uma reação de hipersensibilidade do tipo 1. Neste tipo de doença, mastócitos ligam-se à Imunoglobulina E (Ig-E) por meio dos receptores Fc presentes nestas células. Uma vez que a substância alergênica entra em contato com a IgE ligada aos mastócitos, ela induz a liberação de mediadores que produzem as reações atópicas (ROITT, BROSTOFF, MALE, 2001).

Variados sinais e sintomas estão presentes na asma e isto causa dificuldades para obtenção do diagnóstico diferencial com relação a outras doenças do trato respiratório superior. Entretanto, como sinais e sintomas comuns dessa doença, podemos citar: tosse, sibilo durante a respiração, sensação de “aperto” no peito e falta de ar (NHLBIWHO Workshop Report, 1995). Esses sintomas estão também associados à variável limitação de fluxo aéreo que pode ser revertido espontaneamente ou por meio de tratamento. Os períodos do dia onde a asma se manifesta com mais intensidade são à noite e no início da manhã, já que fatores associados às variações circadianas hormonais e/ou chegada e permanência no

antagonistas de receptor de leucotrienos, as metilxantinas e, mais recentemente, o anticorpo monoclonal anti-IgE (HOSHINO *et al.*, 2009).

Medicamentos esteróides para o tratamento de asma apresentam-se como objeto de intenso estudo nas últimas três décadas, seus mecanismos de ação, sua estrutura, regulação e receptores atualmente são muito mais compreendidos e pesquisados (BARNES, 2006). A utilização de corticosteróides figura como a principal classe de medicamentos empregada por seus benefícios antiinflamatórios para o tratamento da asma. Entretanto, além de uma parcela importante de pacientes asmáticos apresentar resistência a adoção de corticóides como forma de tratamento da doença, um acentuado grau de remodelamento está presente em indivíduos cuja causa de óbito foi à asma e faziam regularmente o uso destes medicamentos (KAY, 2005). Ademais, mesmo os glicocorticóides modernos apresentam ainda efeitos colaterais relacionados à sua utilização crônica (BARNES, 2006). Assim, fica claro que os corticóides são a maneira mais efetiva de tratamento para pacientes asmáticos, entretanto seus efeitos adversos exigem esforços para se desenvolver esteróides com potenciais efeitos colaterais reduzidos e/ou identificação de substâncias capazes de substituí-los no tratamento dessa doença.

Modelos animais para o estudo da asma

Estudos de inflamação brônquio-pulmonar alérgica em modelos animais têm facilitado a identificação de vários mediadores chaves e têm aumentado a compreensão de vários mecanismos regulatórios da asma. E embora eles não sejam a única maneira de se constatar modelos de intervenção terapêutica, trazem sem dúvida uma série de vantagens sobre outras formas de investigação científica (KUMAR, 2001). Entretanto, tais modelos não oferecem uma contrapartida razoável para se estudar as fases crônicas da doença, tendo em vista que a manifestação de uma função pulmonar danificada exige um período de anos para se desenvolver, o que não se reflete adequadamente nesses modelos animais (NAKAMURA *et. al*, 1999).

Apesar de nenhum modelo com roedores conseguir replicar perfeitamente os mecanismos da asma em humanos, esses modelos experimentais oferecem uma compreensão dos mecanismos de remodelamento, assim como o potencial efeito de drogas terapêuticas sobre os mecanismos inflamatórios associados com remodelamento na asma crônica (NAKAMURA *et al.*, 1999). Além disso, dois modelos em roedores são particularmente úteis no estudo de asma inflamatória devido às muitas formas de avaliação específicas disponíveis para essas duas linhagens de camundongos: BALB/c e C57Bl/6. As duas linhagens apresentam uma grande proliferação de eosinófilos no pulmão, embora a distribuição dessas células no tecido seja diferente entre os dois tipos de linhagens (LU *et al.*, 2010).

Quercetina

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroflavona) é um bioflavonóide polifenólico de ampla distribuição em vegetais tais como maçã, cebola, batata, brócolis, chás e etc. (HERTOG *et al.*, 1993). Ela tem se destacado pelo seu amplo efeito antioxidante e citoprotetor sendo, por isso, utilizada em diversos estudos que procuram estabelecer uma relação causa-efeito entre a dosagem usada de quercetina e as concentrações de enzimas e agentes antioxidantes (AMÁLIA *et al.*, 2007). Contudo, embora os flavonóides apresentem inúmeras propriedades farmacológicas, o seu uso terapêutico ainda é empírico, tendo em vista que essa classe de fitoquímicos é mais antiga que o desenvolvimento das análises farmacológicas modernas; além disso, a eficiência de seus metabólitos e os mecanismos de ação *in vivo* não são plenamente estabelecidos e compreendidos (DORTA, 2007). Também, o seu processo de absorção ao longo do trato digestório e a sua biodisponibilidade ainda são questionáveis quando essa molécula é dada na forma aglicona (WALLE, 2004; LEE *et al.*, 2010). Assim, uma maneira de aumentar a capacidade de absorção da quercetina é a formulação de microemulsões (ROGÉRIO *et al.*, 2010a). As microemulsões e sistemas relacionados representam formulações farmacologicamente versáteis para diversas aplicações. São definidas como dispersões, com uma fase de óleo e uma de água, surfactante (s) e co-surfactante, formando uma solução termodinamicamente estável, líquida, com um diâmetro de

gotícula geralmente na faixa de 1-10 nm (SINTOV, A.C. & SHAPIRO, 2004). A estrutura química da quercetina pode ser vista na FIGURA 2.

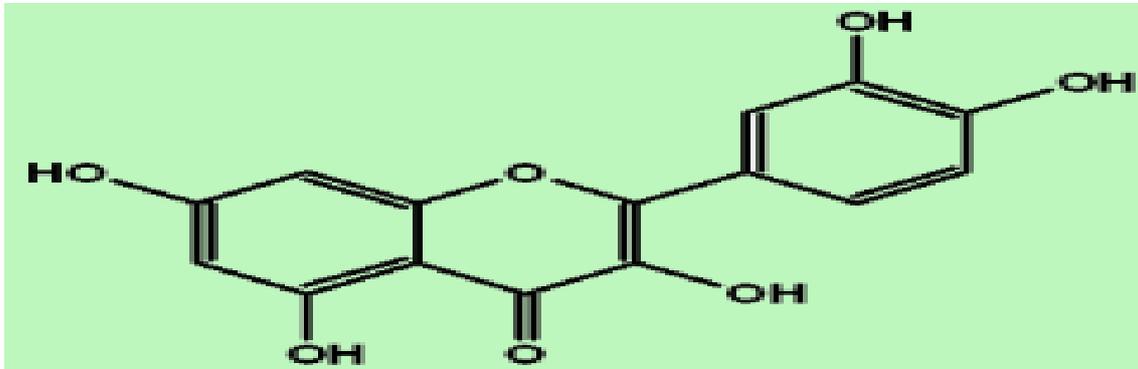


Figura2. Fórmula estrutural da quercetina. (3,3', 4', 5,7-pentahidroxiflavona). (DORTA,2007)

Além dos trabalhos que buscam analisar a eficiência e a viabilidade na utilização deste bioflavonoíde como terapia para diferentes doenças, tais como esteatose hepática não alcoólica, alguns tipos de câncer e diabetes experimental; outros buscam benefícios adicionais da quercetina quando utilizada como tratamento adjuvante ou sinergista para uma determinada doença e/ou disfunção orgânica (MISHRA & FLORA, 2008; ZHOU *et al.*, 2010; DU *et al.*, 2010). Ademais, é importante ressaltar a ampla utilização deste fitoterápico em estudos que envolvem diferentes órgãos em diferentes sistemas (CHOI *et al.*, 2007; AUGER *et al.*, 2005; ROGÉRIO *et al.*, 2007; DU *et al.*, 2010).

Como antiinflamatório, os efeitos desse fitoterápico também são descritos por uma série de trabalhos que explicam a eficácia de sua aplicação por análises laboratoriais (AUGER *et al.*, 2005; ROGÉRIO *et al.*, 2007; NICKEL *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2006). Nesse sentido, pesquisas tem sido realizadas para se determinar a eficiência da quercetina para minimizar os efeitos causados pela asma em modelos animais, bem como nos processos inflamatórios onde se verifica a presença maciça de eosinófilos. (ROGÉRIO *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2010; ROGÉRIO *et al.*, 2010a; ROGÉRIO *et al.*, 2010b).

Avaliação funcional nos modelos experimentais

Outro aspecto que ainda permanece inconclusivo na literatura é o fato de não haver uma avaliação funcional não invasiva nos modelos experimentais de asma. Os mecanismos utilizados envolvem geralmente a ventilação pulmonar artificial, que implica no sacrifício dos animais ou um período de sobrevida com animais em estado grave.

Com relação à resposta funcional dos camundongos com asma induzida, os protocolos de estresse físico utilizados visam levar os animais a executar atividades moderadas com o intuito de avaliar os benefícios causados pelo emprego de exercícios (LOWDER *et al.*, 2010; HEWITT *et al.*, 2009). Os mecanismos envolvidos na melhoria dos animais exercitados englobam regulação de citocinas, os efeitos da atividade sobre a liberação de corticóide e alterações no balanço hormonal, ou ainda mecanismos que envolvem a bioenergética celular (VIEIRA *et al.*, 2009). Entretanto, o protocolo de esforço físico desenvolvido no trabalho, denominado Avaliação Funcional, teve o intuito de comparar se havia uma diferença de rendimento estatisticamente significativa quando os animais eram submetidos a um protocolo de exaustão máxima em esteira ergométrica antes do período de indução de asma, e ao final do período de indução, onde os animais se encontravam no ápice do processo inflamatório.

Portanto, sabendo-se da relevância da asma como um problema de saúde pública grave em nível mundial, e da ausência de um tratamento eficiente e isento de efeitos colaterais para esta doença, o nosso trabalho visou investigar o possível efeito terapêutico da quercetina em camundongos das linhagens BALB/c e C57Bl/6 com asma aguda induzida por ovalbumina.

OBJETIVO GERAL

Identificar o efeito da administração com quercetina sobre os marcadores fisiológicos de inflamação pulmonar em camundongos das linhagens C57Bl/6 e BALB/c após a indução de asma por ovalbumina (OVA).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da microemulsão de quercetina testada sobre a alteração da celularidade, eosinofilia e produção de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 no lavado broncoalveolar (LBA);
- Avaliar o efeito da microemulsão de quercetina testada na diminuição da inflamação no pulmão e da produção de muco nos bronquíolos;
- Comparar os efeitos da aplicação do mesmo protocolo de indução de asma experimental entre as linhagens de camundongos C57Bl/6 e BALB/c, bem como os efeitos da quercetina, se houverem, em cada linhagem.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local da realização do estudo

O presente trabalho de intervenção experimental foi executado em dois estudos, Estudo piloto e Estudo principal, e teve sua parte prática, incluindo todos os seus testes, análises histológicas, imunológicas e laboratoriais, realizada no Biotério e no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) da Fundação Oswaldo Cruz (BA) – FIOCRUZ, sob a supervisão e cooperação da doutoranda Juliana Fraga Vasconcelos, co-orientação da Professora e Pós Doutora Simone Garcia Macambira e orientação da Professora e Doutora Rosângela Passos de Jesus.

Animais

Levando-se em consideração a ampla indicação da literatura para a utilização dessas linhagens de camundongos para o estudo de asma experimental, a facilidade do manuseio para esse experimento, o custo operacional, a disponibilidade dos animais e os procedimentos realizados, optou-se pela utilização de camundongos das linhagens C57Bl/6 e BALB/c do gênero masculino.

No Estudo piloto a amostra foi composta por cinquenta (n=50) camundongos C57Bl/6 do gênero masculino, com 24 semanas de vida, em média. Todos os animais foram criados e mantidos em caixas com temperatura $22^{\circ}\text{C}\pm 2$ e umidade $55\pm 10\%$ controladas, com suprimento de ar contínuo e renovado. Os animais foram mantidos num ciclo claro-escuro de 12 horas (7-19hr) e alimentados com ração própria e água *ad libitum*.

No Estudo principal, 21 camundongos BALB/c e 21 camundongos C57Bl/6 foram utilizados. Todos os camundongos deste Estudo foram também do gênero masculino, mantidos exatamente sob as mesmas condições dos animais do Estudo

piloto, à exceção que nenhum dos animais do Estudo principal fez qualquer tipo de exercício, além de terem um tempo médio de vida de 15 semanas no início do experimento.

Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados, respeitando-se a Lei Federal nº 11.794 e as especificações e diretrizes elaboradas pelo COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/CPqGM – FIOCRUZ). O trabalho encontra-se devidamente aprovado pelo Comitê de Ética do CPqGM sob número 004/2011 (ANEXO 1).

Sob penalidades discriminadas, todas as recomendações para o manuseio de animais seguiram o regime exigido por lei e o tratamento disponibilizado aos animais seguiu a conduta de infligir a menor possibilidade de sofrimento possível. A diretriz básica da pesquisa baseia-se na obtenção de resultados mediante um tratamento condizente com todas as determinações do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.

Divisão dos grupos

No **Estudo piloto**, os 50 camundongos da linhagem C57Bl/6 foram divididos aleatoriamente em seis grupos denominados **GRUPO A, GRUPO B, GRUPO C, GRUPO D, GRUPO E e Grupo F**.

O **GRUPO A** (n=7), também denominado grupo controle negativo.

- Imunizados normalmente com OVA na dosagem de 0,1ml (10µg, GRADE V; >98% de pureza; Sigma, St. Luis, MO) diluída em água destilada com 2mg/mL de hidróxido de alumínio (AlumImject; Pierce, Rockford, IL);

- Os animais foram desafiados a partir do dia 28, durante cinco dias consecutivos. Cerca de 1 hora antes de cada desafio, os animais receberam apenas 0,1ml de propilenoglicol e água destilada (50:50 v/v) via intraperitoneal (i.p.) para simular os efeitos estressores nos animais tratados com quercetina ou dexametasona.

O **GRUPO B** (n=7), também denominado grupo controle positivo.

Esse grupo realizou todos os procedimentos descritos para o grupo A, com a diferença que, em todos os cinco dias de desafio, os animais foram desafiados com solução salina contendo OVA a 1% (GRADE V; >98% de pureza; Sigma, St. Luis, MO) para desenvolverem asma.

O **GRUPO C** (n=7), também denominado tratamento padrão.

Esse grupo de animais seguiu todos os procedimentos do grupo B, a exceção de que os camundongos desse grupo são tratados com dexametasona via i.p. (30mg/kg diluída em 0,1 ml de salina) ministrada cerca de uma hora antes dos desafios.

O **GRUPO D** (n=9), também denominado grupo comparativo da intervenção.

- Esse grupo fez os mesmos procedimentos de imunização e desafio dos GRUPOS B, C, E e F;
- Para se verificar os efeitos estressores do exercício sobre os animais com a asma induzida por OVA e as possíveis diferenças na distância percorrida antes da indução de asma e durante o período de asma, esse grupo foi submetido a um protocolo de exercício estafante (tabela 4) no período que antecede o desenvolvimento da inflamação. O mesmo protocolo foi repetido durante o período de desafio e os resultados obtidos pelo grupo foram comparados em ambas as etapas. Assim como no grupo A, esses animais receberam apenas 0,1mL de água destilada/propilenoglicol (50:50 v:v).

O **GRUPO E** (n=10), também denominado de grupo quercetina, teve os mesmos procedimentos de imunização e desafio dos grupos B, C e D e F.

- Cerca de 1 hora antes de cada desafio, os animais receberam 20mg/kg de quercetina via i.p. em 0,1ml de água/propilenoglicol (50:50 v:v).

O **GRUPO F**, também denominado de grupo quercetina + exercício, teve os procedimentos de imunização e desafio dos GRUPOS B, C e D e E.

- Os animais desse grupo foram submetidos ao mesmo protocolo de esforço sumarizado na tabela 4 e aplicados aos animais do grupo D;
- Os animais desse grupo também receberam via i.p. a mesma solução dada aos animais do grupo E.

Todos os procedimentos realizados em cada grupo do Estudo piloto (A/B/C/D/E/F) encontram-se sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Procedimentos realizados em cada grupo experimental. ESTUDO PILOTO.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E	Grupo F
1ª Imunização (T0) e 2ª imunização (T14)	X	X	X	X	X	X
Desafio com salina	X					
Desafio com OVA a 1%		X	X	X	X	X
Veículo* (propilenoglicol + água)	X	X		X		
Dexametasona (30mg/kg)			X			
Quercetina (20mg/kg + veículo*)					X	X
Avaliação funcional em esteira ergométrica				X		X

No **Estudo principal**, os animais das linhagens BALB/c (N=21) e C57Bl/6 (N=21) foram divididos aleatoriamente em quatro grupos denominados **GRUPO A**,

GRUPO B, GRUPO C e GRUPO D. Cada grupo sofreu um tipo diferente e específico de intervenção. Embora cada grupo compreenda animais das duas linhagens, os resultados encontrados em cada uma delas são, por motivos óbvios, apresentados separadamente na discussão e conclusão deste trabalho.

O **GRUPO A** (n=11, 6 camundongos BALB/c e 5 camundongos C57Bl/6), também denominado grupo controle negativo.

- Imunizados normalmente com OVA na dosagem de 0,1ml (10µg, GRADE V; >98% de pureza; Sigma, St. Luis, MO) diluída em água destilada com 2mg/mL de hidróxido de alumínio (AlumImject; Pierce, Rockford, IL);
- Os animais foram desafiados a partir do dia 28, durante cinco dias consecutivos. A câmara foi ligada a um nebulizador de uso comercial contendo apenas solução salina. Os animais permaneceram sob nebulização por um período de aproximadamente 15 minutos em cada um dos dias de desafio.

O **GRUPO B** (n=11, 6 camundongos BALB/c e 5 camundongos C57Bl/6), também denominado grupo controle positivo.

Esse grupo realizou todos os procedimentos descritos para o grupo A, com a diferença que, em todos os cinco dias de desafio, os animais foram desafiados com solução salina contendo OVA a 1% (GRADE V; >98% de pureza; Sigma, St. Luis, MO) para desenvolverem asma. Esses animais também receberam, por meio de gavagem, uma solução de microemulsão elaborada especialmente para essa fase de estudo, sem quercetina.

O **GRUPO C** (n=10, 5 camundongos BALB/c e 5 camundongos C57Bl/6), também denominado tratamento padrão.

Esse grupo de animais seguiu todos os procedimentos do grupo B, a exceção de que os camundongos desse grupo foram tratados com dexametasona via i.p. (30mg/kg diluída em 0,1 ml de salina) ministrada cerca de uma hora antes dos desafios. Durante a injeção de dexametasona, um dos camundongos BALB/c veio a óbito, portanto, o número final de animais desse grupo foi 10.

O **GRUPO D** (n=9, 4 camundongos BALB/c e 5 camundongos C57Bl/6), também denominado grupo quercetina.

- Esse grupo fez os mesmos procedimentos de imunização e desafio dos GRUPOS B e C;
- Os animais desse grupo receberam, por meio de gavagem, uma solução formulada como microemulsão (100µg a 6% de quercetina).

Nesse grupo, dois animais da linhagem BALB/c e um animal da linhagem C57Bl/6 vieram a óbito durante a inoculação da microemulsão, totalizando um número final de 9 animais.

Todos os procedimentos realizados em cada grupo do Estudo principal (A/B/C/D) encontram-se sumarizados na tabela 2.

Tabela 2. Procedimentos realizados em cada grupo experimental. ESTUDO PRINCIPAL.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
1ª Imunização (T0) e 2ª imunização (T14)	X	X	X	X
Desafio com salina	X			
Desafio com OVA a 1%		X	X	X
Veículo (microemulsão sem quercetina)		X		
Dexametasona (30mg/kg)			X	
Quercetina (microemulsão a 6% de quercetina)				X

Imunização

O processo inflamatório das vias aéreas foi induzido conforme descrito por Vasconcelos *et al.* (2008). Os animais foram imunizados com 10 μ g de OVA (GRADE V; >98% de pureza; Sigma, St. Luis, MO) no volume final de 0,1ml diluída em água destilada com 2 mg/mL de hidróxido de alumínio (AlumImject; Pierce, Rockford, IL). A imunização aconteceu no primeiro dia (TO) com um reforço no 14^o dia (T14) do estudo e foi realizada por meio de injeção subcutânea na região póstero-inferior do animal, próximo à cauda, seguindo todas as recomendações do PROTOCOLO DE PROCEDIMENTOS CEUA 004 – 2009 (IMUNIZAÇÃO).

Sensibilização e desafio com OVA

A inalação foi executada em caixa de acrílico, tendo sido iniciada no 28^o dia, com exposição de ovalbumina (OVA), inalada durante 15 minutos por dia, durante cinco dias consecutivos, a partir do 28^o dia até o dia 32. A solução salina contendo uma concentração de 1% de OVA foi ministrada por meio de nebulização com o auxílio de um compressor de ar ligado a um nebulizador (RespiraMax, SN, Brasil). Os animais que foram sensibilizados, mas não desafiados (grupo controle negativo) receberam solução salina sem OVA como nebulização, nos mesmos moldes dos demais grupos. Um número não superior a 25 animais foi colocado na caixa, para evitar estresse demasiado para os camundongos. As etapas de imunização e desafio encontram-se sumarizadas na FIGURA 3.

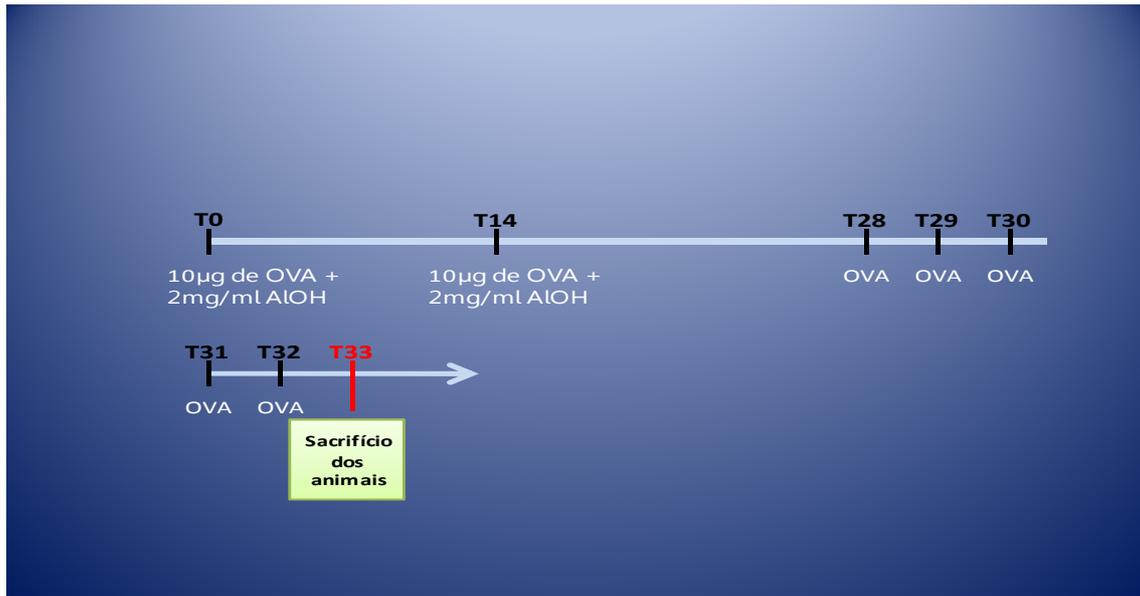


Figura 3. Diagrama com as etapas de sensibilização e desafio com OVA.

Tratamento

A quercetina foi cedida pela professora doutora Lidércia Cavalcanti Ribeiro Cerqueira e Silva, Professora da Faculdade de Farmácia – UFBA. A concentração deste fitoterápico utilizada nos dois estudos foi de 20 mg/kg. O protocolo escolhido para a aplicação de quercetina no Estudo Piloto e Estudo Principal encontra-se descrito na tabela 3. No presente estudo, os animais recebiam o fitoterápico cerca de 1 hora antes da nebulização com OVA e a quercetina foi diluída com propilenoglicol e água destilada neste estudo (0,1ml, 50:50v/v).

Tabela 3. Protocolo de aplicação de quercetina no Estudo piloto e no Estudo principal. Dosagem utilizada em cada dia de Desafio.

1º dia de desafio c/ OVA	2º dia de desafio c/ OVA	3º dia de desafio c/ OVA	4º dia de desafio c/ OVA	5º dia de desafio c/ OVA
Quercetina 20mg/kg				

Para o Estudo principal, os animais foram tratados com quercetina introduzida em microemulsão, ministrada aos camundongos via gavagem. O sistema de aplicação da microemulsão contendo quercetina seguiu o mesmo protocolo dos animais do Estudo piloto (Tabela 3). A formulação da microemulsão foi desenvolvida como se segue: lecitina (50g); palmitato de isopropila (50g), ácido ascórbico (1g), polaxamer 407* (20g), sorbato de potássio (0,2g), água destilada qsp (100mL). Cada dose de gavagem dada aos animais continha 20mg/kg. A concentração de 20mg/kg foi escolhida baseado no fato de que não há um protocolo padrão estabelecido para o tratamento de asma experimental e quercetina. Assim, as concentrações do fitoterápico e as doses utilizadas variaram nos diferentes estudos pesquisados (JUNG *et al.*, 2010; JAUARAJ *et al.*, 2007; ROGERIO *et al.*, 2010b). Doses de 0,1mL foram dadas aos animais em cada gavagem. Em ambos os estudos, os animais do grupo tratado com o esteróide sintético foram tratados com dexametasona (Sigma, Aldrich) na concentração de 30 mg/kg (VASCONCELOS, 2007).

Avaliação funcional

O teste de esforço foi desenvolvido a partir de protocolo utilizado no trabalho de SHE *et al.* (2010). Para estabelecer o protocolo de análise funcional utilizado no Estudo piloto, cinco camundongos foram submetidos a alguns testes na esteira ergométrica desenvolvida especialmente para esse trabalho. As especificações da fabricação da esteira encontram-se disponíveis no ANEXO 2.

Sumariamente, para se determinar estafa e retirada dos animais, teorizou-se um critério semi-quantitativo, baseado no fato que os camundongos começaram a sinalizar exaustão quando mudaram o padrão de locomoção na esteira, ficando mais tempo do que o habitual na proximidade da plataforma de choque. Assim, mediante a exaustão, eles passaram a sofrer choques numa frequência mais elevada e então foi determinado como critério, que mesmo quando o animal não permanecesse no choque, quando ele entrava em contato – mesmo que muito breve – com a plataforma eletricamente carregada mais do que cinco vezes em quinze segundos, por dois períodos consecutivos, eles também eram retirados do teste. De outro

modo, também foram retirados os animais que permaneceram continuamente no choque por período igual ou superior a 5 segundos.

Outras conclusões para o desenvolvimento do protocolo no Estudo piloto foram baseadas também na observação do comportamento de corrida de camundongos C57Bl/6 do gênero masculino chagásicos, estudados na esteira ergométrica do CBTC (Centro de Biotecnologia e Terapia Celular) – Hospital São Rafael – Salvador, BA. A tabela 4 sumariza o protocolo desenvolvido para o Estudo piloto. A aplicação da Avaliação Funcional encontra-se sumarizada na FIGURA 4.

Tabela 4. Protocolo de exaustão física em esteira ergométrica para os camundongos – Avaliação Funcional.

TEMPO (minutos)	Velocidade (m/min)	Distância acumulada em cada tempo (metros)
0-5	15	75
5-10	15	150
10-15	17	235
15-20	17	320
20-25	19	415
25-30	19	510
30-35	21	615
35-40	21	720
40-45	23	835
45-50	23	950
50-55	25	1075
55-60	25	1200

*Obs.: a aplicação do teste ergométrico foi feito com a esteira numa inclinação fixa de aproximadamente 10°.

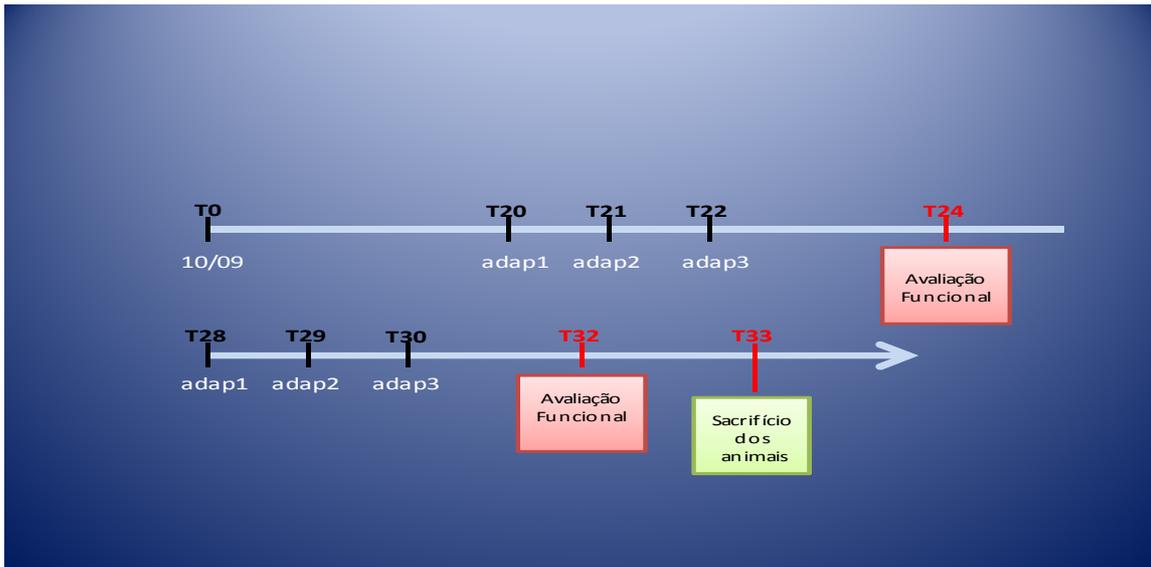


Figura 4. Diagrama com as etapas de aplicação do protocolo de avaliação funcional nos animais. Avaliação antes da indução de asma experimental e durante o auge da inflamação.

Eutanásia dos animais

O procedimento de eutanásia seguiu as recomendações do PROTOCOLO DE PROCEDIMENTO CEUA 003/2009 - MÉTODOS PARA EUTANÁSIA EM CAMUNDONGOS. Os animais do Estudo piloto receberam uma super dosagem de anestésico tiopental via i.p. (200 µl/animal); os animais do Estudo principal receberam uma superdosagem de anestésico (200µl de quetamina/xilazina 3:1 diluídos em salina). A dose de anestésico não foi imediatamente letal para os animais, porém, os procedimentos tiveram que ser feitos em um período de tempo relativamente curto para se evitar a coagulação sanguínea, sobretudo para o Estudo piloto. Depois de anestesiados, o sangue dos animais foi extraído via plexo braquial e colocado em *ependorfs* de 0,65ml (PROTOCLO DE PROCEDIMENTO CEUA 001- COLETA DE SANGUE). Em seguida, a cavidade torácica do animal foi cuidadosamente aberta e a traquéia foi exposta para a etapa seguinte.

Lavado Brônquio Alveolar (LBA)

Após a sedação dos animais, a pele do abdômen e tórax foram retiradas para exposição da traquéia. Um volume de 1 mL de solução tampão fosfato (PBS) gelado foi injetado na traquéia com uma agulha e aspirado novamente, repetindo-se o mesmo processo por três vezes. O líquido recuperado foi colocado em um tubo plástico Eppendorf em banho de gelo, posteriormente centrifugado a 1500 r.p.m. por 10 minutos à 10° C para coleta de sobrenadante para quantificação de citocinas. Mais 1 ml de PBS gelado foi injetado pela traquéia para repetição da lavagem do pulmão e para a contagem de células no LBA, as células do primeiro lavado foram somadas às do segundo para quantificação.

Retirada dos pulmões

Os pulmões dos animais foram instilados com formol para melhor fixação e preservação dos tecidos. O formol foi injetado pela traquéia (cerca de 2ml de formol a 4%) e os pulmões foram extraídos. O pulmão esquerdo foi seccionado em duas partes e armazenado em tubos contendo formol a 4% (3ml em cada tubo) para formatação em lâminas e análise histopatológica do órgão. O pulmão direito foi coletado e armazenado em eppendorf de 1,5ml e congelado a -70°C para análises posteriores.

Contagem de leucócitos do LBA

Para se determinar a quantidade de leucócitos no LBA um volume de 200µL de LBA foi adicionado a 200µL de tampão fosfato salina, sendo este volume final citocentrifugado por 5 minutos a 500 rpm. As lâminas foram preparadas com corante hematológico panótico (corante rápido para uso hematológico – Laborclin Produtos para Laboratório Ltda.) Para a estimativa total de leucócitos foram fotografados cinco

campos de cada lâmina e o número estimado de células foi integrado por área. Para a contagem diferencial, 200 leucócitos foram contados por lâmina de acordo com critérios padronizados para diferenciação morfológica dessas células (LORENZI, 2006). O aumento empregado para a análise diferencial de leucócitos das lâminas na microscopia foi de 1000x, com auxílio de óleo de imersão.

Análise histopatológica

O lobo esquerdo do pulmão de cada animal foi removido para análise histopatológica. O pulmão foi inflado por uma cânula traqueal com formalina tamponada a 4%, fixada com a mesma solução e embebida em parafina. Os pulmões foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para a quantificação das células inflamatórias no microscópio óptico. Para cada pulmão, 5 campos foram analisados por sessão num aumento de 400x e os dados foram usados para calcular um número médio de células por mm². A produção de muco foi analisada em seções coradas com PAS (*Periodic acid-Schiff*). Todas as imagens foram digitalizadas usando uma câmara de vídeo digital (CoolSnap cf) adaptada a um microscópio BX41(Olympus, Tóquio, Japão) calibrado com uma referência de slide de medição e utilizando um programa de imagem (Pro image, versão 6.1, Media Cybernetics, San Diego, CA, USA).

Quantificação de Interleucinas

As concentrações de interleucinas (IL)-4, (IL)-5 e (IL)-13 no fluido de LBA foram determinadas por ELISA usando um kit específico de anticorpos (R&D System, Minnesota, MN, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, placas de 96 poços (NUNC – IMMUNO PLATE Maxisorp Surface) foram sensibilizadas com 50 µL do anticorpo de captura (anticorpo monoclonal purificado anticitocina investigada), diluído em PBS, a 4°C durante a noite. As placas

foram lavadas por 3x com PBS 0,05% Tween 20 (Sigma) e foi adicionado 100 µL da solução de PBS contendo 1% de BSA (Sigma) por 1-2 horas à temperatura ambiente, a fim de bloquear sítios não específicos. As placas foram lavadas mais uma vez e foram incubadas com 50 µL das amostras/poço em duplicata e da citocina padrão em várias concentrações por 12 horas à 4° C. Após a lavagem das placas, foi adicionado o anticorpo anti-citocina biotinilado e as placas foram incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente. Após as lavagens, foi adicionado 50 µL/poço de estreptoavidina diluída 1:200, por 20 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagens, a reação foi revelada com 50 µL/poço de solução reveladora contendo 10 mL de tampão citrato-fosfato 1 M, 2 µL de H₂O₂ e uma pastilha TMB (Sigma). O bloqueio da reação foi feito através da adição de 50 µL/poço de ácido fosfórico 1:20. A leitura da densidade óptica foi determinada por espectrofotômetro (Spectra Max 190 - Molecular Devices, alifórnia, EUA), no comprimento de onda de 450 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1 (Molecular Devices).

Todas as etapas metodológicas e os procedimentos de intervenção do Estudo piloto e do Estudo principal encontram-se resumidos nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

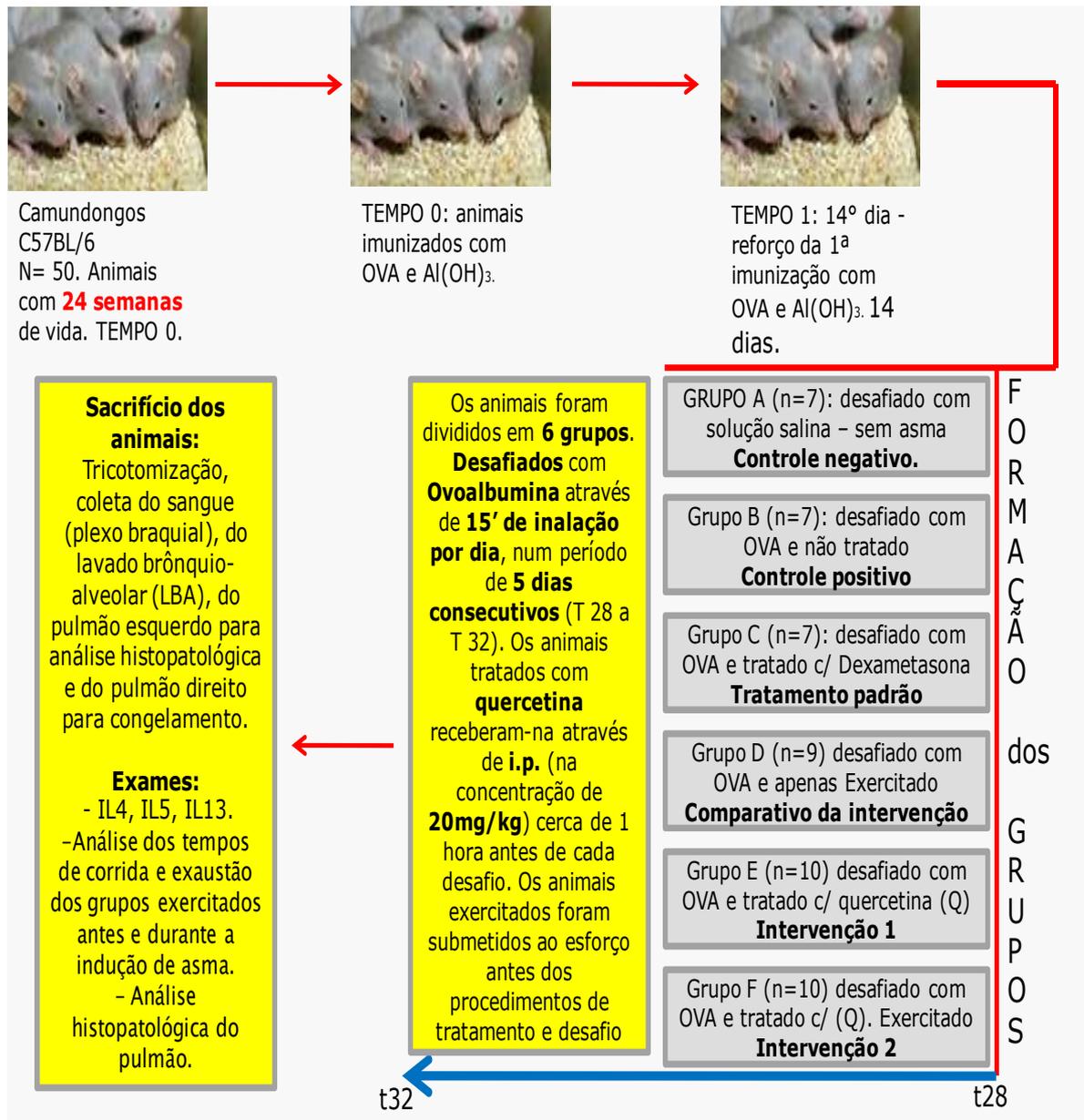


Figura 5. Desenho esquemático de todas as etapas experimentais do ESTUDO Piloto.

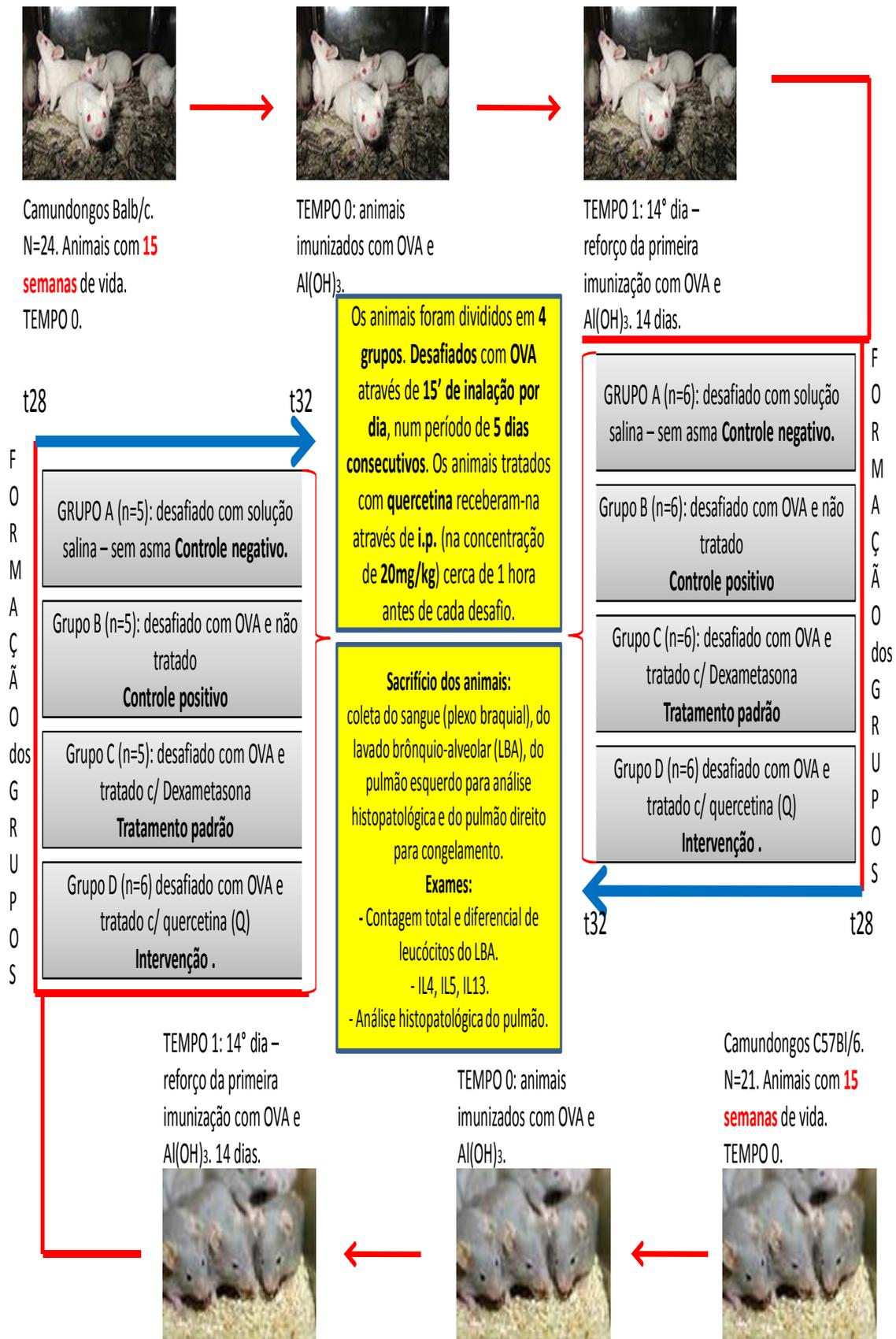


Figura 6. Desenho esquemático de todas as etapas experimentais do Estudo principal.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de 4 a 6 animais por grupo. Todas as análises das curvas obtidas foram feitas pelo teste de análise de variância ANOVA ONE-WAY seguido do Teste Tukey para as comparações múltiplas. O nível de significância foi de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Apenas os resultados encontrados no Estudo principal serão apresentados no presente trabalho.

Concentração de leucócitos no LBA dos animais

Tanto para a linhagem de camundongos BALB/c quanto para a linhagem de camundongos C57Bl/6, a quercetina não induziu uma diminuição estatisticamente significativa na concentração de células leucocitárias totais no lavado brônquico alveolar (LBA), quando comparamos este grupo aos animais que não receberam o fitoterápico e foram desafiados normalmente, ou seja, controle positivo. FIGURA 7 e FIGURA 8.

Em média, houve uma redução de celularidade leucocitária no LBA do grupo de camundongos C57Bl/6 de aproximadamente 38,5% quando esses animais receberam quercetina como tratamento para a inflamação, em relação ao grupo controle positivo (FIGURA 8).

Comparando os gráficos das figuras 7 e 8 podemos notar que a linhagem de camundongos C57Bl/6 foi mais sensível ao protocolo estabelecido de indução da inflamação do que os camundongos BALB/c com relação à quantidade de leucócitos no LBA. A celularidade de leucócitos no LBA do controle positivo dos camundongos C57Bl/6 foi de 72×10^4 , contra aproximadamente 20×10^4 nos BALB/c, conferindo uma porcentagem de diferença na ordem de 360%.

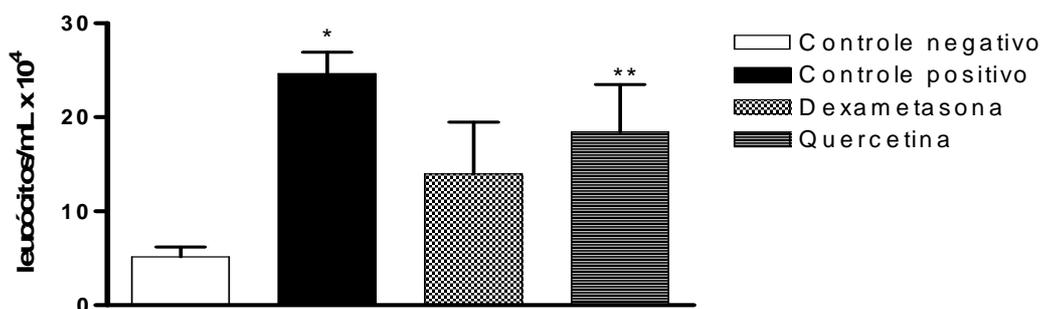


FIGURA 7. Contagem total de leucócitos no LBA. Foi analisada a contagem de leucócitos totais no LBA em diferentes grupos de camundongos BALB/c no Estudo principal. Os valores representam a Média e o Erro Padrão dos diferentes grupos. Mínimo de 4 e máximo de 6 animais por grupo. * $P < 0,01$ comparando controle negativo com controle positivo. ** $P < 0,05$ comparando controle negativo com grupo quercetina.

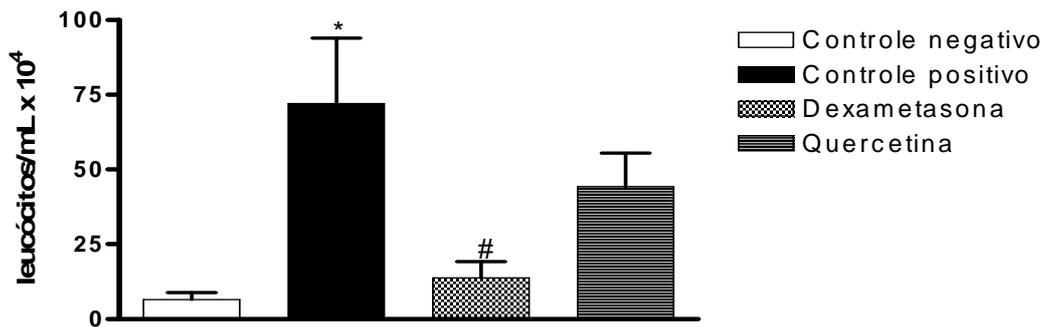


FIGURA 8. Contagem total de leucócitos no LBA. Foi analisada a contagem de leucócitos totais no LBA em diferentes grupos de camundongos C57Bl/6 no Estudo principal. Os valores representam a Média e o Erro Padrão dos diferentes grupos. Mínimo de 4 e máximo de 6 animais por grupo. * $P < 0,01$ comparando grupo controle negativo com grupo controle positivo. # $P < 0,01$ comparando controle positivo com grupo dexametasona.

Contagem diferencial de leucócitos

Foi executada também a contagem diferencial de leucócitos encontrados no lavado brônquio-alveolar. Duzentos leucócitos foram contados e, por meio dos seus aspectos morfológicos e coloração, foram divididos em três grupos: macrófagos, linfócitos e eosinófilos.

O grupo de camundongos da linhagem BALB/c não tratado com quercetina ou dexametasona apresentou um aumento na proporção de leucócitos eosinófilos de 6,75 vezes com relação ao grupo controle negativo. Já os animais do grupo que foi tratado com quercetina obtiveram um aumento muito semelhante àqueles animais que foram tratados com dexametasona e, com relação ao grupo controle negativo, apresentaram um aumento de 3,35 vezes no número de eosinófilos/200 leucócitos (FIGURA 9).

Com relação aos camundongos da linhagem C57Bl/6 do Estudo principal, há um número maior de eosinófilos/200 leucócitos em todos os grupos de camundongos dessa linhagem no LBA, comparando esta linhagem com aos camundongos BALB/c. Entretanto, não há qualquer diferença nessa proporção entre os animais que foram tratados com quercetina e os animais que não sofreram qualquer tipo de tratamento (FIGURA 10).

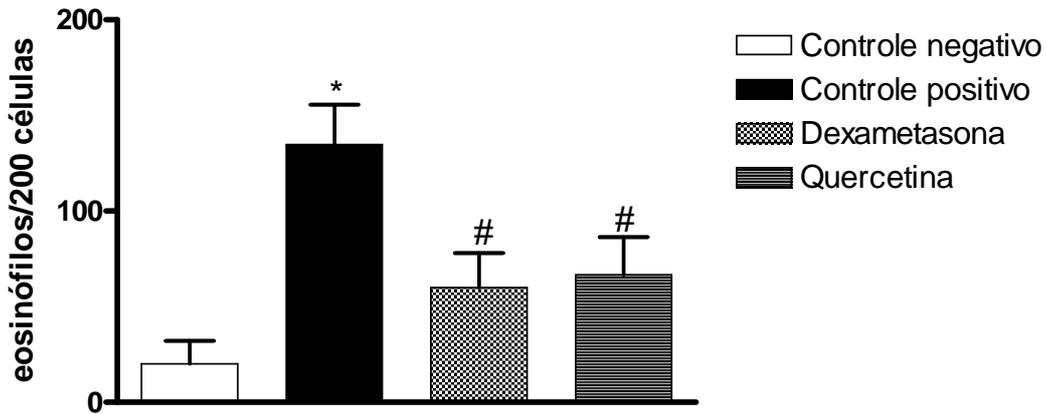


FIGURA 9. Contagem diferencial de leucócitos no LBA. Foi analisada a contagem diferencial de leucócitos no LBA em diferentes grupos de camundongos BALB/c no Estudo principal. Os valores representam a Média e o Erro Padrão dos diferentes grupos. Mínimo de 4 e máximo de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$ comparando o grupo controle negativo com o grupo controle positivo. # $P < 0,05$. Comparando o grupo controle positivo com os grupos dexametasona e quercetina.

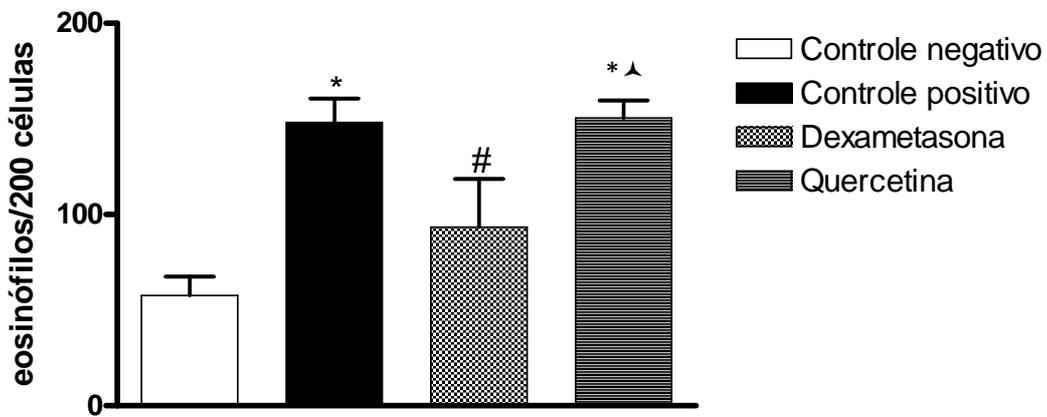


FIGURA 10. Contagem diferencial de leucócitos no LBA. Foi analisada a contagem diferencial de leucócitos no LBA em diferentes grupos de camundongos C57Bl/6 na FASE 2 do estudo. Os valores representam a Erro e o Desvio Padrão dos diferentes grupos. Mínimo de 3 e máximo de 6 animais por grupo. * $P < 0,01$ comparando controle negativo com controle positivo e grupo quercetina. $P < 0,05$ comparando controle negativo com grupo dexametasona. ▲ $P < 0,05$ comparando grupo dexametasona com grupo quercetina.

Quantificação de interleucinas no LBA

A quantificação de interleucinas foi determinada apenas para os camundongos da linhagem BALB/c. As células inflamatórias do LBA destes camundongos tratados no estudo com microemulsão contendo quercetina produziram uma concentração 37,84% menor de IL-4 do que os animais do grupo controle positivo. (FIGURA 11).

Podemos observar que os animais tratados com quercetina têm uma redução de 37,86% na produção de IL-13 em relação aos animais que não sofreram qualquer tipo de intervenção (controle positivo). Entretanto, a concentração de IL-13 no LBA destes camundongos ainda é 5,38 vezes maior do que os animais que foram tratados com dexametasona e 29,6 vezes maior do que aqueles animais que não foram desafiados com OVA (FIGURA 12).

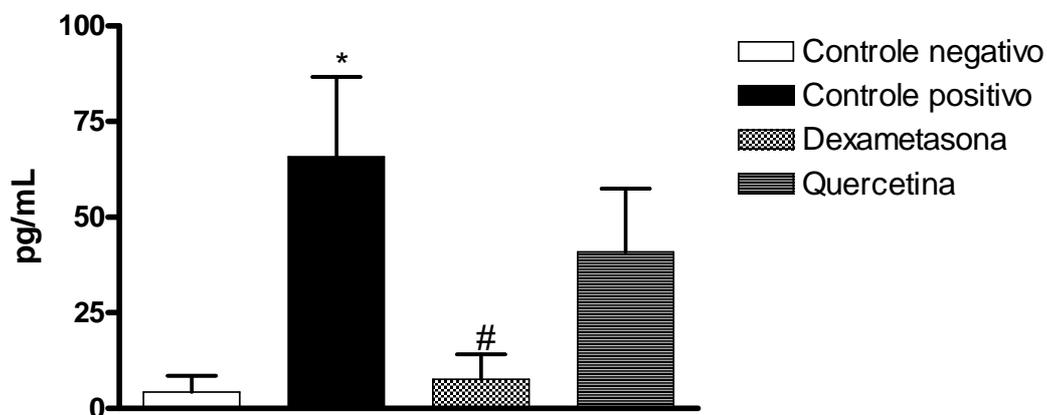


FIGURA 11. Detecção da produção de IL-4 no LBA. Foi analisada a quantificação de IL-4 em diferentes grupos de camundongos BALB/c no Estudo principal. Os valores representam a Média e o Desvio Padrão dos diferentes grupos. Mínimo de 4 e máximo de 6 animais por grupo. * $P < 0,001$ comparando controle negativo com controle positivo. # $P < 0,05$ comparando controle positivo com grupo dexametasona.

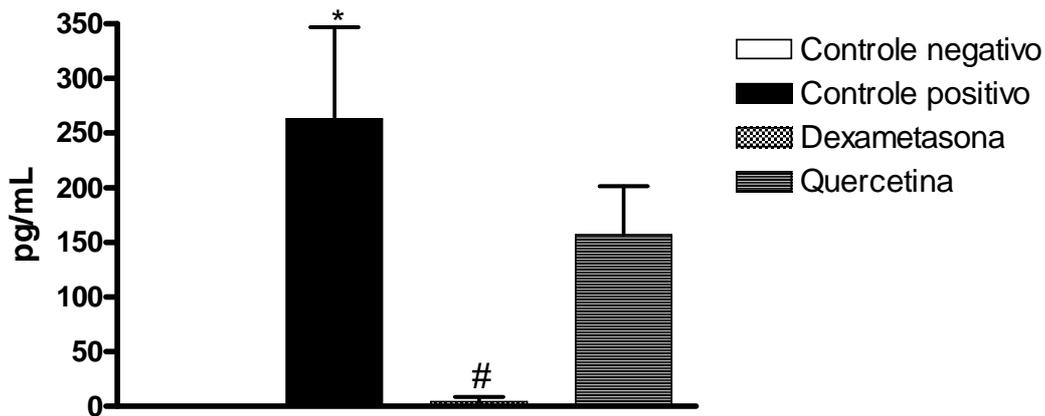


FIGURA 12. Detecção da produção de IL-13 no LBA. Foi analisada a quantificação de IL-13 em diferentes grupos de camundongos BALB/c no Estudo principal. Os valores representam a Média e o Erro Padrão dos diferentes grupos. Mínimo de 4 e máximo de 5 animais por grupo. * $P < 0,001$ comparando grupo controle negativo com grupo controle positivo. # $P < 0,001$ comparando grupo controle dexametasona com grupo controle positivo.

Análise histopatológica do tecido pulmonar

No Estudo principal, os camundongos da linhagem C57Bl/6 tratados com quercetina apresentaram uma produção de muco mais elevada do que os camundongos que não foram tratados de nenhuma forma e desafiados com OVA. Também para essa linhagem, a dexametasona diminuiu a produção do muco, mas numa porcentagem muito pequena com relação ao controle positivo e sem significância estatística. Mais uma vez, todos os animais desafiados com solução salina nesta linhagem não apresentaram nenhuma produção de muco, comprovando a eficiência do protocolo estabelecido (dados não apresentados).

Diferente da linhagem C57Bl/6, os camundongos BALB/c tratados com quercetina apresentaram uma redução na produção de muco na ordem de 54,31% com relação ao grupo controle positivo, enquanto o grupo tratado com dexametasona teve uma redução de 68,67% na produção de muco com relação ao mesmo controle (FIGURA 13).

É possível observar que os camundongos da linhagem BALB/c, incluídos no Estudo principal, apresentaram uma redução da celularidade leucocitária nos

bronquíolos, sendo que a quercetina foi quase tão eficiente quanto a dexametasona para promover essa redução (FIGURA 14).

A quercetina mostrou-se ineficaz no tratamento dos camundongos C57Bl/6 do Estudo principal. Estes apresentaram exatamente o mesmo nível de celularidade leucocitária nos bronquíolos quando comparados aos animais do grupo controle positivo, além disso, o tratamento com dexametasona inibiu esse processo na ordem de 42,86% com relação ao mesmo grupo (dados não apresentados).

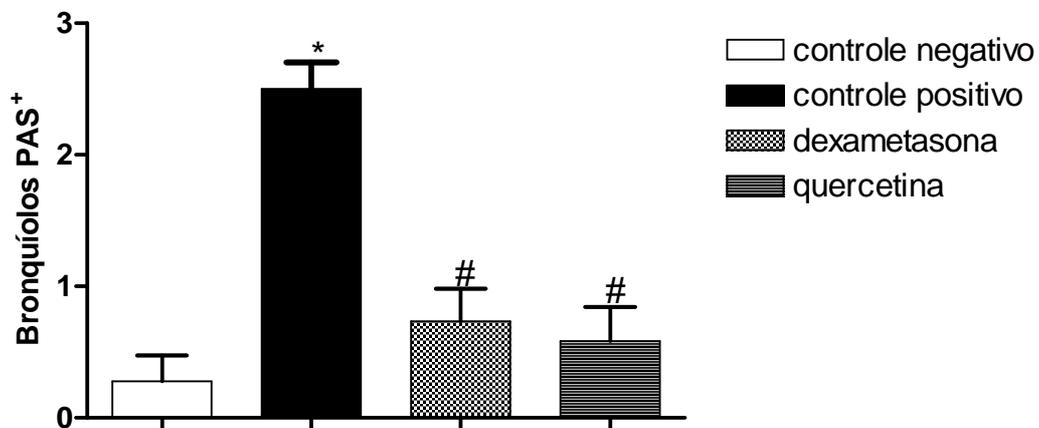


FIGURA 13. Detecção da produção de muco. Foi analisada a quantificação da produção de muco em lâminas de pulmão coradas com PAS vistas sob um aumento de 400x nos diferentes grupos de camundongos BALB/c no Estudo principal. Os valores representam a Média e o Erro Padrão dos diferentes grupos. Mínimo de 4 e máximo de 6 animais por grupo. * $P < 0,001$ comparando grupo controle negativo com grupo controle positivo. # $P < 0,001$ comparando grupo controle positivo com grupo dexametasona e quercetina.

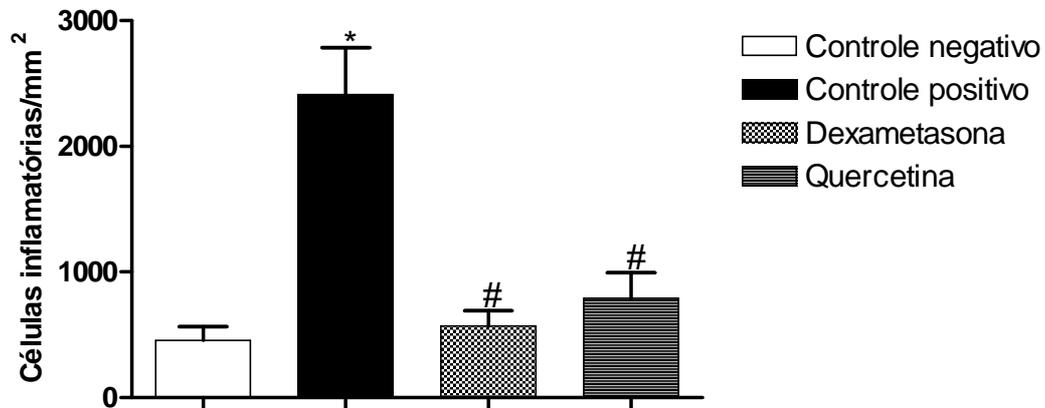


FIGURA 14. Quantificação de leucócitos nos bronquíolos. Foi quantificada a infiltração de leucócitos nos bronquíolos em lâminas de pulmão coradas com HE vistas sob um aumento de 400x nos diferentes grupos de camundongos BALB/c no Estudo principal. Os valores representam a Média e o Erro Padrão dos diferentes grupos. Mínimo de 4 e máximo de 6 animais por grupo. * $P < 0,001$ comparando grupo controle negativo com grupo controle positivo. # $P < 0,001$ comparando grupo controle positivo com grupo dexametasona e quercetina.

DISCUSSÃO

O presente estudo procurou determinar o efeito terapêutico da quercetina em camundongos das linhagens C57Bl/6 e BALB/c com asma induzida por meio da administração de OVA. Também foi desenvolvido um protocolo de Avaliação Funcional (AF) no estudo piloto, para se verificar se os animais com asma induzida perdem o rendimento físico quando avaliados em dois momentos deste estudo: no quinto dia de desafio (T32) e antes do período de indução de asma experimental. Em média, os resultados da AF não mostraram diferença porque provavelmente a esteira desenvolvida para o estudo não tenha sensibilidade para detectar a exaustão nos animais. Além disso, para melhor critério de avaliação, faz-se necessário o emprego de tecnologia mais avançada, como, por exemplo, a análise respirométrica de gases. Sugerimos ainda a aplicação de outro protocolo de exaustão e o pareamento longitudinal dos animais para efeito de comparação, animal a animal.

Em estudos com quercetina envolvendo asma nos modelos experimentais, as formas de inoculação mais comuns do fitoterápico nos animais ocorrem por via oral (gavagem), por via intraperitoneal (i.p.), ou ainda por inalação. Nosso trabalho escolheu a via i.p. para o estudo piloto e gavagem para o estudo principal. Não existe nem uma concentração padronizada nos estudos que envolvem a aplicação da quercetina, assim como não há disponível um protocolo padrão para executar esta terapia. Os estudos sobre este fitoterápico utilizam concentrações que vão de 10 mg/kg aplicados de maneira única (JUNG *et al.*, 2010), até uma concentração elevada de 200mg/kg realizada também em uma única aplicação (JAYARAJ *et al.*, 2007). Portanto, a concentração escolhida para os protocolos do presente trabalho foi de 20 mg/kg.

Um trabalho sugere que a quercetina administrada por via oral, na forma de suspensão, tem uma absorção muito limitada no trato digestivo (ROGÉRIO *et al.*, 2010b), sendo que, segundo os mesmos autores, a quercetina administrada via gavagem nas mesmas concentrações, por meio de microemulsão, produziu os resultados esperados. Inusitadamente, embora esses autores tenham realizado um estudo para comprovar essa hipótese, outro trabalho publicado no mesmo ano, com a aplicação desse fitoterápico diluído em suspensão, via oral, demonstrou bons resultados (ROGÉRIO *et al.*, 2010a).

Os resultados encontrados no estudo piloto realizados com camundongos C57Bl/6, divergem dos trabalhos já descritos que fizeram a utilização da quercetina em modelo de asma experimental, portanto, no estudo principal, foi testado um protocolo similar àquele do estudo piloto, numa linhagem de camundongos com resultados positivos já referidos na literatura (BALB/c). Durante este estudo foi novamente usada a linhagem de camundongos C57Bl/6, para efeitos de comparação.

Acrescentamos ainda que o estudo piloto demonstrou resultados nunca antes descritos nos demais modelos experimentais nas bases de dados pesquisadas, que testaram o efeito terapêutico da quercetina em modelos de asma experimental. Brevemente, durante a necropsia dos animais, depósitos da solução contendo quercetina estavam nitidamente presentes na cavidade peritoneal dos camundongos, sugerindo que possivelmente a absorção do fitoterápico não tenha sido eficiente. Apesar da via de administração e diluente utilizados estarem devidamente respaldados por outros trabalhos da literatura, fez-se necessário repetir o Estudo buscando novas alternativas, assim como testar outra forma de administração (gavagem) e outro diluente da quercetina (microemulsão) nos animais. Assim, o Estudo principal foi desenvolvido a partir de resultados, observações e conclusões do Estudo piloto, bem como análise da literatura disponível sobre o assunto.

Embora a quercetina seja absorvida no trato gastrointestinal, um estudo demonstrou que isso só acontece de maneira eficiente quando a quercetina é dada na forma glicosilada e que diferentes alimentos que contêm quercetina possuem concentrações diferentes do fitoterápico ligado à glicose, assim como também a porção de carboidrato ocupada sítios de ligação diferentes com a molécula, influenciando também na capacidade de absorção da mesma (HOLLMAN *et al.*, 1995). Outro estudo dos mesmos autores também demonstrou que formas de quercetina não glicosiladas têm absorção deficiente. (HOLLMAN *et al.*, 1997). Portanto, a utilização da microemulsão foi uma alternativa encontrada para o aumento da absorção do fitoterápico dando um caráter anfipático à molécula.

Dos seis parâmetros avaliados para se determinar a redução da inflamação causada pelo protocolo de indução por meio do desafio com OVA no estudo principal com camundongos da linhagem BALB/c, todos demonstraram uma diminuição quando o grupo de animais tratados com quercetina foi comparado ao

grupo controle positivo, o que corrobora com os resultados de Park e colaboradores (2009). Entretanto, apesar da similaridade nos resultados positivos apresentados em ambos os trabalhos, adotamos também o tratamento com dexametasona, com o intuito de correlacionar a eficiência da quercetina mediante um tratamento já bem estabelecido na literatura para o controle da asma. Assim, embora alguns dos parâmetros inflamatórios analisados no grupo quercetina não tenham tido uma diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle positivo, os principais parâmetros inflamatórios como a produção de muco e infiltração leucocitária pulmonar tiveram, em média, uma redução similar aos animais tratados com dexametasona e até ao próprio grupo controle. Nossos resultados estão em consonância com o trabalho de Rogério *et al.*, (2010b), utilizando a mesma linhagem de camundongos, o que enfatiza a capacidade do fitoterápico em inibir a eosinofilia e a produção de muco nos animais tratados com essa molécula.

A comparação de um grupo tratado com quercetina e um grupo tratado com dexametasona na asma induzida experimentalmente por OVA também foi objeto do trabalho de autores que investigaram o efeito deste flavonóide sobre cobaias com asma induzida tanto nas reações de hiperresponsividade imediata (HRI) quanto na fase tardia da resposta asmática. Os resultados encontrados demonstraram que, embora a dexametasona seja mais efetiva do que a quercetina no tratamento da asma experimental, o fitoterápico foi quase tão eficaz quando os animais dos dois grupos comparados. Adicionalmente, enquanto o corticóide não apresenta ação sobre a resposta imediata, a administração do fitoterápico apresentou resultados estatisticamente significantes nesta fase (JUNG *et al.*, 2007). Diferentemente dos trabalhos já publicados, nosso trabalho avaliou apenas o efeito da quercetina na fase tardia da resposta asmática, que é a principal fase de ação e intervenção na qual atuam os corticóides. O nosso trabalho encontrou resultados mais expressivos na utilização do fitoterápico do que os autores supracitados quando os efeitos da quercetina foram comparados diretamente com as funções principais destes antiinflamatórios estereoidais.

Num estudo de Rogério *et al.* (2010b) realizado para verificar os efeitos da quercetina em camundongos BALB/c do gênero feminino, dada aos animais por meio de microemulsão, os resultados demonstraram por meio de marcadores importantes, que o fitoterápico apresenta efeitos similares, e neste estudo até mesmo superiores, com relação ao 1 mg/kg do antiinflamatório esteroideal

(dexametasona) administrado via subcutânea. Os autores creditam a diminuição do processo inflamatório à redução da presença de citocinas dosadas no LBA (IL-4 e IL-5), reduzindo a resposta inflamatória, a eosinofilia e a produção de muco. Nessa investigação, o possível mecanismo de redução da produção das interleucinas dosadas foi proposto por meio da diminuição da expressão do fator NF κ B nos animais tratados com quercetina, levando à supressão nos mecanismos que induzem a exacerbação na resposta Th2, embora nenhuma variação da produção de Interferon γ tenha sido evidenciada neste estudo. Considerando as similaridades do efeito antiinflamatório da quercetina encontradas tanto no nosso estudo como no desenvolvido por Rogério *et al.* (2010b), destacamos que o presente trabalho não dosou nem a produção de IL-5 no LBA e nem a expressão do fator nuclear κ B. Em compensação, nós dosamos a IL-13, enquanto os referidos autores não o fizeram; ainda sim, a diferença principal entre o nosso estudo e o trabalho supracitado está no fato de que as dosagens de interleucinas encontradas no nosso trabalho não nos permite concluir que a inibição da eosinofilia e da produção de muco são decorrentes de uma redução significativa da resposta Th2, sugerindo que a quercetina provavelmente age também em outros mecanismos para minimizar os efeitos pró inflamatórios provocados pelo desafio com OVA na asma experimental.

Portanto, a redução da eosinofilia na linhagem de camundongos BALB/c no nosso trabalho, assim como a menor produção de muco nos grupos desafiados com OVA e tratados com quercetina nessa linhagem, provavelmente pode ser explicada, apenas em parte, por meio da redução na taxa de secreção de IL-4 e IL-13. No entanto, ressalta-se que a diminuição da produção dessas interleucinas ocorreu de forma muito mais acentuada no grupo tratado com dexametasona e ainda sim, para os parâmetros inflamatórios avaliados, a quercetina apresentou resultados similares quando os animais são comparados com este grupo considerado padrão ouro.

As interleucinas 4 e 13 estão ligadas a um processo de coordenação nas vias de sinalização de resposta Th2 na migração dos eosinófilos do leito vascular para o tecido pulmonar. Esta via provavelmente controla o acúmulo de eosinófilos no órgão, modulando vias de adesão de leucócitos por meio da regulação da produção local de eotaxina e IL-5 no pulmão (FOSTER *et al.*, 2001). Isto reitera a necessidade de trabalhos posteriores envolvendo quercetina dosarem também a IL-5, para que uma relação de interação dessas três citocinas, atuando em conjunto, esclareça a

influência da molécula do fitoterápico sobre a dinâmica da resposta imunológica na asma experimental.

A relação entre a expressão de uma proteína denominada GATA-3, que é responsável por ativar fatores de transcrição específicos para células T, diferenciação destes linfócitos para um padrão Th2 e secreção das IL-4, IL-5 e IL-13, com a expressão de outro fator de transcrição específico para a produção de interferon γ e do fenótipo Th1, conhecido como T-bet (T-box expresso em células T) foi estabelecida num estudo envolvendo quercetina, nas doses de 8mg/kg/dia e 16mg/kg/dia, e asma induzida por OVA. Os resultados apresentados pelos autores desse estudo demonstraram uma dose dependência na ingestão desse fitoterápico ligada à mudança de padrão imunológico de resposta, com diminuição da resposta Th2 e incremento da resposta Th1 (PARK *et al*, 2009). Este estudo reforça a importância da possível relação entre o padrão de resposta Th1/Th2 com a melhoria no quadro da asma experimental causada pela quercetina. Vale ressaltar, que embora o nosso estudo não tenha elementos para corroborar essa relação de maneira tão estrita, ela provavelmente se fez presente.

Linfócitos Th2 secretam citocinas que estimulam a mudança do isótipo de cadeia pesada da imunoglobulina para IgE nos linfócitos B. O anticorpo IgE é responsável por sensibilizar os mastócitos e proporciona o reconhecimento do antígeno para as reações de hipersensibilidade imediata (ABBAS *et col.*, 2005). Desse modo, também novos estudos devem investigar a hipótese de que os possíveis efeitos protetores desse fitoterápico na diminuição dos parâmetros inflamatórios pode estar associada à diminuição na secreção de IgE nos animais tratados com a quercetina, quando comparado aos demais grupos, tendo em vista que essa imunoglobulina ocupa um papel central nas reações de hipersensibilidade imediata nos modelos experimentais.

Os resultados do nosso trabalho apontam que um possível mecanismo que deve ser investigado está associado ao receptor das interleucinas IL-4 e IL-13, tendo em vista que nos modelos de asma induzidos por antígenos solúveis de ovo (ASO), injeções de antígenos induzem pico de extravasamento de eosinófilos nas vias aéreas 48 horas após a inoculação. Animais tratados com anticorpos anti IL-4 demonstraram um influxo de eosinófilos para as vias aéreas em cerca de 10 vezes e uma redução total na celularidade de leucócitos nos pulmões. O excesso de produção de muco está correlacionado com a eosinofilia. Experimentos com

camundongos geneticamente modificados, com linfócitos Th2 incapazes de produzir IL-4 (Th2 IL-4 -/-), demonstraram que estes animais ainda são capazes de produzir muco em níveis normais. Entretanto, células Th2 IL-4-/- não induzem produção de muco em camundongos que não expressam o receptor celular para IL-4 (IL-4R α -/-) e o LBA destes camundongos está ausente de eosinófilos. Na ausência de IL-4, IL-13 pode realmente substituir a produção de muco e a eosinofilia gerada por IL-4 secretada por células Th2, demonstrando que IL-4R α desempenha um papel essencial na produção de muco estimulada pelas células Th2 e a importância da ação redundante dessas duas interleucinas em modelos de asma experimental (OKADA & LOTZE, 2003). Assim, novos estudos devem investigar a hipótese de que o efeito da quercetina pode estar relacionado com a uma possível capacidade de modulação na expressão dos receptores IL-4R α , ou até mesmo devido à modulação de processos pós acionamento do receptor.

A importância dos eosinófilos na asma está associada também a um grande número de evidências demonstrando que a gravidade desta doença depende do acúmulo destas células e sua ativação no interior das vias aéreas. Eosinófilos contém um grande número de substâncias que quando liberadas diretamente nas mucosas causam danos e contribuem para os distúrbios fisiológicos no pulmão. Os produtos dos eosinófilos incluem proteína básica principal, proteínas catiônicas, neurotoxinas derivadas de eosinófilos, eosinófilo peroxidase, assim como metabólicos de oxigênio e nitrogênio (ROITT *et al.*,2001). Estas células também liberam mediadores lipídicos, incluindo fatores ativadores de plaquetas, leucotrienos B4 e C4, quimiocinas e citocinas que são capazes de amplificar a resposta eosinofílica. Nesta cascata de eventos, participam também células estruturais que liberam ainda mais fatores de amplificação da resposta inflamatória (OLIVEIRA & LUCAS, 2003). Portanto, sabendo-se das inúmeras propriedades anti-oxidantes e citoprotetoras encontradas em diversos estudos envolvendo a quercetina (DORTA, 2007; HERTOOG *et al.* 1993; JAYARAJ *et al.* 2007), há a necessidade de se investigar as propriedades desse fitoterápico sobre as diversas substâncias catabólicas e inflamatórias liberadas pelos eosinófilos no processo de inflamação induzida por OVA em modelos experimentais e, tendo em vista a moderna teoria de que essas células não são o produto final e plenamente diferenciado de uma linhagem celular, mas um conjunto capaz de diferenciação e acionamento de diversos mecanismos inflamatórios e de regulação, é necessário se investigar

diretamente o efeito que esse fitoterápico produz nessa linhagem de células. Assim, uma vez que o nosso estudo mostrou que há uma diminuição significativa na presença de eosinófilos no LBA e uma diminuição no infiltrado inflamatório, interessante seria investigar os mecanismos de um modelo onde a presença das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 estivessem apenas relativamente diminuídas, mas os infiltrados leucocitários estivessem significativamente ausentes.

Embora existam trabalhos na literatura que ressaltem a igualdade no desenvolvimento de asma seguindo protocolos similares de indução entre as linhagens C57Bl/6 e BALB/c, com respostas Th2 similares (LU *et al.*, 2010), outros enfatizam o maior desenvolvimento de inflamação e hipersensibilidade em animais da linhagem BALB/c, com recrudescimento da eosinofilia e produção de IgE (FUKUNAGA *et al.*, 2007). No entanto, outros trabalhos que demonstram justamente o oposto, mostrando uma resposta Th2 mais exacerbada em camundongos da linhagem C57Bl/6 quando comparados aos BALB/c (MOROKATA *et al.*, 1999). Diversos modelos experimentais para o estudo da asma utilizam as duas linhagens de camundongos, C57Bl/6 e BALB/c. No nosso estudo piloto, devido à disponibilidade de animais, optamos pela utilização da linhagem C57Bl/6. Os resultados preliminares com essa linhagem de camundongos demonstraram que a quercetina não teve a capacidade de atenuar os parâmetros inflamatórios analisados, tais como, a quantificação de leucócito nos bronquíolos, quantificação da produção de muco e, por fim, detecção da produção de IL-4 e IL-5 pelas células do LBA (dados não apresentados). Embora os camundongos desse estudo tenham desenvolvido asma quando desafiados normalmente com OVA, até mesmo os animais tratados com dexametasona em alta dosagem (30mg/kg) tiveram uma resposta antiinflamatória aquém com relação aos camundongos da linhagem BALB/c tratados exatamente da mesma maneira no estudo principal. Entretanto, mesmo com a resposta à dexametasona diminuída, os resultados do tratamento tradicional foram estabelecidos em ambas as linhagens na maioria dos parâmetros avaliados. Os dados com C57Bl/6 do estudo principal confirmaram os resultados preliminares do estudo piloto.

Nosso trabalho não demonstrou respostas similares quando comparamos os controles positivos das duas linhagens, com uma exacerbação maior no número de leucócitos encontrados no LBA e no tecido pulmonar, com maior presença de eosinófilos na contagem diferencial das células do LBA da linhagem C57Bl/6.

Também, os animais desta linhagem apresentaram uma diminuição na resposta antiinflamatória da dexametasona e, ao contrário da linhagem BALB/c, estes animais não tiveram uma redução estatisticamente significativa em nenhum dos parâmetros inflamatórios avaliados no grupo que utilizou a quercetina como terapia. Ainda, ambos os grupos controle negativo não apresentaram resultados de inflamação, fato que ratificou o sucesso do protocolo de indução empregado. Como última análise, também a produção de muco não foi alterada nos animais C57Bl/6 que utilizaram a quercetina no estudo piloto e no estudo principal.

Os resultados encontrados mostram que as diferentes linhagens de camundongos estudadas apresentam uma carga genética que provavelmente atua de maneira específica mediante o mesmo estímulo que induziu asma nos animais. Embora as duas linhagens tenham manifestado asma experimental, o modelo foi mais agressivo na exacerbação da asma para os camundongos C57Bl/6. Além disso, embora os camundongos tenham sido pareados por idade e sexo, animais desta linhagem apresentam um peso consideravelmente menor do que a linhagem de camundongos BALB/c, fato que pode ter influenciado as diferenças de grau de inflamação encontradas para o mesmo protocolo de indução empregado. Também, camundongos C57Bl/6 tiveram uma diminuição menor na atividade antiinflamatória do grupo tratado com dexametasona.

Dessa forma, sugerimos que a quercetina seja empregada em camundongos C57Bl/6 com um protocolo de indução de asma menos agressivo, para que os possíveis efeitos protetores desse fitoterápico possam ser verificados e comprovados, se de fato existirem nessa linhagem.

CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo sugerem que na asma experimental a produção de muco, a eosinofilia no LBA e o infiltrado leucocitário no nível dos bronquíolos ocupam um papel central no processo inflamatório induzido por imunização e desafio por OVA em camundongos das linhagens BALB/c e C57Bl/6. Além disso, os resultados demonstraram que estes processos se manifestam em intensidades diferentes mediante um mesmo protocolo de indução para as duas linhagens. A microemulsão de quercetina foi capaz de reduzir parâmetros inflamatórios como liberação de citocinas pro-inflamatórias, celularidade, eosinofilia e produção de muco, apenas na linhagem de camundongos BALB/c, demonstrando o seu potencial terapêutico como ação anti asmática, entretanto, o mecanismo de ação desse fitoterápico ainda precisa ser melhor compreendidos.

REFERENCIAS CIENTÍFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Hipersensibilidade tardia. In: *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier 2007. Pag. 441-462.
- AMÁLIA, P.M.; POSSA, M.N.; AUGUSTO, M.C.; FRANCISCA, L.S. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci*, 2007. 52: 2616-2621.
- AUGER, C.; TEISSEDE, P.L.; GÉRAIN, P.; LEQUEUX, N; BORNET, A.; SERISIER, S.; BESANÇON, P.; CAPORICCIO, B.; CRISTOL, J.P.; ROUANET, J.M. Dietary wine phenolic catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 2005. 53: 2015-2021.
- BARNES, P.J. Corticosteroids: the drug to beat. *European Journal of Pharmacology*. 2006. 533:2-14.
- British Thoracic Society (1993). Guidelines for the management of asthma: a summary. *Br Med J*. 306:776-782.
- CHOI, E. J.; CHEE, K.W.; LEE, B. H. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2003. 281-285.
- CHOI, I.; SEOG, H.; PARK, Y.; KIM, Y; CHOI, H. Suppressive effects of germinated buckwheat on development on fatty liver in mice fed with high-fat diet. *Phytomedicine*. 2007: 563-567.
- DORTA, D.J. *Efeitos citoprotetor e/ou citotóxico dos flavonóides: estudo estrutural-atividade envolvendo mecanismos mitocondriais, com ênfase na apoptose*. 2007. 134 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- DU, G.; LIN, H.; YANG, Y.; ZHANG, S.; WU, X.; WANG, M.; JI, L.; LU, L.; YU, L.; HAN, G. Dietary quercetin combining intratumoral doxorubicin injection synergistically induces rejection of established breast cancer in mice. *International immunopharmacology*. 2010. 1-8.
- FOSTER, P.S.; MOULD, A.W.; YANG, M.; MACKENZIE, J.; MATTES, J.; HOGAN, S.P.; MAHALINGAM, S.; MACKENZIE, A.N.; ROTHENBERG, M.E.; YOUNG, I.G.;

MATTHAEI, K.I.; WEBB, D.C. Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. *Immunological Reviews*. 2010. 179: 173-181.

FUKUNAGA, J.; MASAYOUSHI, A.; MURAI, A.; AKITAKE, Y.; HOSOKAWA, M.; TAKAHASHI, M. Comparative study to elucidate mechanism underlying the difference in airway hyperresponsiveness between two mouse strains. *International Immunopharmacology*. 2007. 7:1852-1861.

HERTOG, M.G.; FESKENS, E.J.; HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993. 342:1007–1011.

HEWITT, M.; CREEL, A.; ESTELL, K.; DAVIS, I.C.; SCHWIEBERT, L.M. Acute exercise decreases airway inflammation, but not responsiveness, in a allergic asthma model. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2009. 40:83-89.

HOLGATE, S.T. Pathogenesis of asthma. *Clinical and Experimental Allergy*. 2008. 38:6: 872-897.

HOLLMAN P.C.; VRIES, J.H.; LEEUWEN, S.D.; MENGELERS, M.J.; KATAN, M.B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1995. Vol. 62:6: 1276-1282.

HOLLMAN, P.C.; TRIJP, J.M.; GAAG, M.S.; MENGELERS, M.J.; VRIES, J.H.; KATAN, M.B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *Febs Letters*. 1997. Vol. 418: 152-156

HOSHINO, T.; TODA, R.; AIZAWA, H. Pharmacological treatment in Asthma and COPD. *Allergology International*. 2009. 58: 341-346.

JAYARAJ, R.; DEB, U.; BHASKAR, A.S.B.; PRASAD, G.B.K.S.; RAO, P.V.L. Hepatoprotective efficacy of certain flavonoids against microcystin induced toxicity in mice. *Inter Science*. 2007. 472:479.

JUNG, C.H.; LEE, J.Y.; CHO, C.H.; KIM, C.J. Anti-asthmatic action of quercetin and rutin in conscious guinea-pigs challenged with aerosolized ovalbumin. *Archives of Pharmacal Research*. 2007. 30: 1599-1607.

JUNG, WY; PARK, SJ; PARK, DH; KIM, JM; KIM, DH; RYU, JH. Quercetin impairs learning and memory in normal mice via suppression of hippocampal phosphorylated cyclic AMP response element-binding protein expression. *Toxicology Letters*. 2010. 10:1016.

JUNGSUWADEE, P.; DEKAN, G.; STINGL, G.; EPSTEIN, M.M. Inhaled dexamethasone differentially attenuates disease relapse and established allergic asthma in mice. *Clin. Immunol*. 2004. 110:13–21.

KAY, A.B. The role play of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends in Molecular Medicine*. 2005. 11:4: 148-152.

KOK, C.C.; SCHWENGER, G.T.; OSMOND, R.I.; URWIN, D.L.; SANDERSON, C.J. Chapter 11: Interleukin – 5. In: *The cytokine handbook*. Ed. Academic press. 2003. Vol. 1: 268.

KUMAR, R.K. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis of improvements in therapy? *Pharmacology & Therapeutics*. 2001. 91:2: 93-104.

LEE, F.P.; SHIH, C.M.; SHEN, H.Y.; CHEN, C.M.; CHEN, C.M.; KO, W.C. Ayanin, a non-selective phosphodiesterase 1-4 inhibitor, effectively suppress ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness without affecting xylazine/ketamine-induced anesthesia. *Pulmonary, Gastrointestinal and Urogenital Pharmacology*. 2010. 635:198-203.

LORENZI, T.F. Manual de hematologia – propedêutica e clínica. ed. Guanabara Koogan – 4ª edição. 2006.

LOWDER, T.; DUGGER, K.; DESHANE, J.; ESTELL, K.; SCHWIEBERT, L.M. Repeated bouts of aerobic exercise enhance regulatory T cell responses in a murine asthma model. *Brain Behavior, and Immunity*. 2010. 24:153-159.

LU, Y.; SJÖSTRAND, M.; MALMHALL, C.; RADINGER, M.; JEURINK, P.; LÖTVALL, J.; BOSSIOS, A. New production of eosinophils and the corresponding TH1/TH2 balance in the lungs after allergen exposure in BALB/c and C57BL/6 mice. *Scandinavian Journal of immunology*. 2010. 71:3:176-185.

MAUAD, T.; SOUZA, A.S.; SALDIVA, P.H.; DOLHNIKOFF, M. Remodelamento brônquico na asma. *Jornal de Pneumologia*. 2000. 26:2:91-98.

MISHRA, D; FLORA, S.JS. Quercetin administration during chelation therapy protects arsenic-induced oxidative stress in mice. *Biol Trace Elem Res.* 2008. 122:137-147.

MOROKATA, T.; ISHIKAWA, J.; IDA, K.; YAMADA T. C57Bl/6 mice are more susceptible to antigen-induced pulmonary eosinophilia than BALB/c mice. *Immunology.* 1999. 98:3:345-351.

NAKAMURA, H.; WEISS, S.T.; ISRAEL, E.; LUSTER, A.D.; DRAZEM, J.M.; LILLY, C.M. Eotaxin and impaired lung function in asthma. *Am. J. Respir Crit Care Med.* 1999. 160:1952-1956.

NICKEL, T.; HANSEN, H.; SISIC, C.; PFEILER, S.; SUMMO, C.; SCHMAUSS, D.; HOSTER, E.; WEIS, M. Immunoregulatory effects of the flavonol quercetin in vitro and in vivo. *Eur. J. Nutr.* 2010. 23.

OLIVEIRA, S.H.; LUKACS, N.W. The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reaction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2003. 36:1455:1463.

OKADA, H.; BANCHEREAU, J.; LOTZE, M.T. Chapter 10: Interleukin – 4. In: THONSON, A.W.; LOTZE, M.T. The cytokine handbook. Ed. Academic press. 2003. Vol. 1: 245-246.

PARK, H.; LEE, C.M.; JUNG, I.D.; LEE, J.S.; JEONG, Y.; CHANG, J.H.; CHUN, S.H.; KIM, M.J.; CHOI, I.W.; AHN, S.C.; SHIN, Y.K.; YEOM, S.R.; PARK, Y.M. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *International immunopharmacology.* 2009. 9:261-267.

ROGÉRIO, A.P.; KANASHIRO, A.; FONTANARI, C.; SILVA, E.V.; VALIM, Y.M.; SOARES, E.G.; FACCIOLI, L.H. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercetin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation research.* 2007. 56:402-408.

ROGÉRIO, A.P.; DORA, C.L.; ANDRADE, E.L.; CHAVES, J.S.; SILVA, L.F.; SENNA, E.L.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacological Research.* 2010a. 61: 288-297.

ROGÉRIO, A.P.; NUNES, A.S.; FACCIOLI, L.H. The activity of medicinal plants and secondary metabolites on eosinophilic inflammation. *Pharmacological research*. 2010b. 62:298-307.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Hipersensitivity – type I. In: *Immunology*. Edinburgh: Mosby 2001. Pag. 324-344.

SHE, P.; ZHOU, Y.; ZHANG, Z.; GRIFFIN, K.; GOWDA, K.; LYNCH, C.J. I. Disruption of BCAA metabolism in mice impairs exercise metabolism and endurance. *J. Appl Physiol*. 2010. 4: 941-949.

SINTOV, A.C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration *in vitro* and cutaneous drug bioavailability *in vivo*. *J. Control Release*, 200. 95:173-183.

VASCONCELOS, J.F.; TEIXEIRA, M.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; LÚCIO, A.S.S.C.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUEIROZ, L.P.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. *Immunopharmacol*. 2008. 8:1216-1221.

VASCONCELOS, J.F. Avaliação da atividade farmacológica de substâncias purificadas a partir de plantas do semi-árido brasileiro no modelo de asma brônquica. 2007. 55 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

VIEIRA, R.P.; DUARTE, A.C.; SANTOS, A.B.; MEDEIROS, M.C.; MAUAD, T.; MARTINS, M.A.; CARVALHO, C.R.; DOLHNIKOFF, M. Exercise reduces effects of creatine on lung. *International Journal Sport Medicine*. 2009. 30:684-690.

The International study of asthma and allergy in childhood (ISSAC) steering committee. Worldwide variation in prevalence of asthma symptoms: The International study of asthma and allergy in Childhood (ISSAC). *Eur Respir J* 1998;12:315-35.

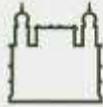
WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology Medicine*. 2004. 36:829-837.

WANG, L.; TU, Y.C.; LIAN, T.W.; HUNG, J.T.; YEN, J.H.; WU, M.J. Distinctive antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006. 9798-9804.

ZHOU, W.; KALLIFATIDIS, G.; BAUMANN, B.; RAUSCH, V.; MATTERN, J.; GLADKICH, J.; GIESE, N.; MOLDENHAUER, G.; WIRTH, T.; BÜCHLER, M.W.; SALNIKOV, A.V.; HERR, I. Dietary polyphenol quercetin targets pancreatic cancer stem cells. *International Journal of Oncology*. 2010. 37: 551-556.

NHLBI/WHO Workshop Report (1995). Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Publication Number 95-3659. Bethesda: National Institutes of Health.

ANEXO 1



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: 004/2011

PROJETO: "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA QUERCETINA SOBRE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM ASMA AGUDA INDUZIDA POR OVALBUMINA"

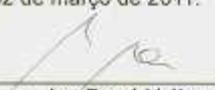
COORDENADORA: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
<i>Mus musculus</i> da linhagem C57B16 machos.	50 por ano

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 25/02/2011, e tem validade até 25/02/2013.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 02/25/2011, being valid until 02/25/2013.

Salvador, 02 de março de 2011.


 Dr^a Maria Lourdes Farré Vallve

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

Maria Lourdes Farré Vallve
 Pesquisadora Adjunta
 CPqGM - FIOCRUZ
 SIAPE - 156098-0

ANEXO 2

A esteira foi fabricada com uma plataforma rolante total de 40x45cm. A plataforma foi dividida por acrílico em cinco baias individualizadas e uma esteira rolante de borracha gira livremente sobre uma superfície de acrílico.

A esteira gira conectada a uma correia e impulsionada por um motor trifásico de 0,3 cavalos de potência e 220 volts de tensão. Sobre a plataforma rolante, encontra-se uma superfície metálica que sustenta um choque ajustável (0 a 2 mA, 0 a 80 volts de tensão) conectado a um transformador, as dimensões da plataforma de choque são de 10x35cm.

Um potenciômetro foi regulado e calibrado para que a cada aumento de 5 hertz no painel digital correspondesse a um incremento de velocidade na ordem de 1 km/h. A esteira desenvolve uma velocidade máxima de 10 km/h.



O ARTIGO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DA QUERCETINA SOBRE CAMUNDONGOS BALB/C COM ASMA AGUDA INDUZIDA POR OVALBUMINA

Eduardo H. Fortes^{a,c}, Juliana F. Vasconcelos^{a,e}, Thayse F. S. Lins^b, Rosângela P. de Jesus^c, Simone G. Macambira^{a,e}, Milena B. P. Soares^{a,e,*}

^a Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, 40296-750, Salvador, BA, Brasil

^b Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Faculdade de Medicina, 40050-420, Salvador, BA, Brasil

^c Universidade Federal da Bahia, Escola de Nutrição, 40110-150, Salvador, BA, Brasil

^d Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, 44031-640, Feira de Santana, BA, Brasil

^e Hospital São Rafael. Av. São Rafael, 2152. São Marcos 41253-190, Salvador, BA, Brasil

Resumo

Introdução: A asma é uma doença inflamatória complexa e os corticóides são a principal classe de medicamentos utilizada no seu tratamento. Estas drogas apresentam diversos efeitos colaterais e a sua eficácia foi questionada em alguns pacientes cuja causa do óbito foi a asma. Assim, o efeito terapêutico da quercetina, na concentração de 20 mg/kg, foi investigado num modelo experimental de asma brônquica onde camundongos BALB/c foram imunizados subcutaneamente e desafiados com inalação de ovalbumina dias após a imunização. **Resultados:** O tratamento com quercetina reduziu a eosinofilia no lavado brônquio-alveolar, nos bronquíolos e diminuiu a infiltração de células inflamatórias neste tecido. Adicionalmente, também o nível de produção de muco foi reduzido no grupo de animais tratados com o fitoterápico em relação ao grupo controle. Os resultados para esses parâmetros inflamatórios foram similares aos apresentados pelos animais tratados com dexametasona. A microemulsão de quercetina foi capaz de reduzir parcialmente os níveis das interleucinas 4 e 13. **Conclusões:** Nas condições da presente pesquisa a quercetina atenuou as características inflamatórias da asma

experimental em camundongos BALB/c, embora seus mecanismos de ação não tenham sido evidenciados. Novas investigações usando este fitoterápico em modelos desenvolvidos com técnicas mais avançadas podem contribuir para o desenvolvimento de novas drogas no tratamento da asma.

Palavras-chaves: asma experimental; OVA; quercetina

Abstract

Background: Asthma is a complex inflammatory disease and corticosteroids are the major class of drugs used in treatment. These drugs have several side effects and its effectiveness was questioned in some patients whose cause of death was asthma. Thus, the therapeutic effect of quercetin, 20 mg / kg was investigated in an experimental model of asthma where BALB/c mice were immunized subcutaneously and challenged with inhaled ovalbumin days after immunization. Results: Treatment with quercetin reduced eosinophilia in broncho-alveolar lavage, in the bronchioles and decreased infiltration of inflammatory cells in this tissue. Moreover, the level of mucus production was reduced in animals treated with herbal medicine in relation to the control group. Results for these inflammatory parameters were similar to those of the animals treated with dexamethasone. The microemulsion of quercetin was able to reduce partially the levels of interleukins 4 and 13. Conclusions: Under the conditions of the present study, quercetin attenuated the inflammatory characteristics of asthma in mice BALB / c, although its mechanisms of action have not been disclosed. Further investigations using this herbal medicine in the developed models with more advanced techniques can contribute to the development of new drugs to treat asthma.

Keywords: experimental asthma, OVA; quercetin

Introdução

A asma alérgica é uma doença inflamatória complexa caracterizada pela dificuldade na ventilação das vias aéreas superiores, que espontaneamente se contraem muito ou são obstruídas facilmente em resposta a uma grande variedade de estímulos. O termo asma não se refere a um único tipo de desordem orgânica, mas sim a um grande grupo de patologias que têm características fenotípicas em comum, tais como obstrução reversível das vias aéreas e sintomas associados (HOLGATE, 2008). As diferentes manifestações clínicas de asma envolvem vários fatores ambientais que interagem com as vias aéreas causando inflamação aguda e/ou crônica. A asma é considerada um bom exemplo de interação entre fatores genéticos e ambientais, embora um único gene ou condição ambiental específica sejam *per si* incapazes de causar a doença (ROITT, 2001).

No nível tissular a asma gera uma resposta multicelular que ocasiona hipersecreção de muco pelas células caliciformes, alterações nas vias aéreas (células epiteliais, fibroblastos, células musculares lisas) com ou sem sinais de remodelamento e um aumento da presença de células inflamatórias, tais como linfócitos, neutrófilos, células dendríticas e mastócitos, com um recrudescimento exacerbado no número de eosinófilos na região, bem como um aumento da presença dessas células no sangue. No caso da asma não ser controlada, ocorre uma presença maciça também de eosinófilos no lavado brônquio alveolar (LBA) (KEY, 2010).

Estudos de inflamação brônquio-pulmonar alérgica em modelos animais têm facilitado a identificação de vários mediadores chave e têm aumentado a compreensão de vários mecanismos regulatórios da asma e, embora eles não sejam a única maneira de se constatar modelos de intervenção terapêutica, trazem sem dúvida uma série de vantagens sobre outras formas de investigação científica (KUMAR, 2001). Apesar de nenhum modelo com roedores conseguir replicar perfeitamente os mecanismos de remodelamento da asma em humanos, esses modelos experimentais oferecem uma compreensão dos mecanismos de fisiopatologia da doença, assim como o potencial efeito de drogas terapêuticas sobre os mecanismos inflamatórios (NAKAMURA *et. al*, 1999).

Medicamentos esteróides para o tratamento de asma apresentam-se como objeto de intenso estudo nas últimas três décadas, seus mecanismos de ação, sua estrutura, regulação e receptores são hoje muito mais compreendidos e pesquisados (BARNES, 2006). Os corticosteróides são a principal classe de medicamentos empregada para o tratamento da asma devido seus benefícios antiinflamatórios. Ademais, mesmo os glicocorticóides modernos apresentam ainda efeitos colaterais relacionados a sua utilização crônica (BARNES, 2006). Assim, fica claro que os corticóides são a maneira mais efetiva de tratamento para pacientes asmáticos, entretanto seus efeitos adversos exigem esforços para se desenvolver esteróides com potenciais efeitos colaterais reduzidos e/ou identificação de substâncias capazes de substituí-los no tratamento dessa doença.

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroflavona) é um bioflavonóide polifenólico de ampla distribuição em vegetais tais como maçã, cebola, batata, brócolis, chás e etc. (HERTOG *et al.*, 1993). Ela tem se destacado pelo seu amplo efeito antioxidante, antiinflamatório e citoprotetor sendo, por isso, utilizada em diversos estudos que procuram estabelecer uma relação causa-efeito entre a dosagem usada de quercetina e as concentrações de enzimas e agentes antioxidantes (AMÁLIA *et al.*, 2007). Contudo, embora os flavonóides apresentem inúmeras propriedades farmacológicas, o seu uso terapêutico ainda é empírico, tendo em vista que essa classe de fitoquímicos é mais antiga que o desenvolvimento das análises farmacológicas modernas. Além disso, a eficiência de seus metabólitos e os mecanismos de ação *in vivo* não são plenamente estabelecidos e compreendidos (DORTA, 2007).

Assim, o presente estudo pretende investigar por meio de modelo experimental de asma aguda com camundongos BALB/c o potencial terapêutico da microemulsão de quercetina na dosagem de 20mg/kg administrada por gavagem.

Materiais e métodos

Animais

A amostra foi composta por 21 camundongos BALB/c (n=21) do gênero masculino com aproximadamente 15 semanas de vida. Todos os animais foram criados e mantidos no Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, (CpQGM – FIOCRUZ,

BA). Os animais foram alimentados com ração própria e água *ad libitum*. O trabalho encontra-se devidamente aprovado pelo Comitê de Ética do CPqGM sob número 004/2011

Divisão dos grupos

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos denominados **GRUPO A**, **GRUPO B**, **GRUPO C** e **GRUPO D**. Cada grupo sofreu um tipo diferente e específico de intervenção.

O **GRUPO A** (n=06), também denominado grupo controle negativo.

- Imunizados normalmente com OVA na dosagem de 0,1ml (10µg, GRADE V; >98% de pureza; Sigma, St. Luis, MO) diluída em água destilada com 2mg/mL de hidróxido de alumínio (AlumImject; Pierce, Rockford, IL);
 - Os animais foram desafiados a partir do dia 28, durante cinco dias consecutivos apenas com solução salina.

O **GRUPO B** (n=06) também denominado grupo controle positivo.

Esse grupo realizou todos os procedimentos descritos para o grupo A, com a diferença que, em todos os cinco dias de desafio, os animais foram desafiados com solução salina contendo OVA a 1% (GRADE V; >98% de pureza; Sigma, St. Luis, MO) para desenvolverem asma. Esses animais também receberam, por meio de gavagem, uma solução de microemulsão elaborada especialmente para essa fase de estudo, sem quercetina.

O **GRUPO C** (n=05), também denominado tratamento padrão.

Esse grupo de animais seguiu todos os procedimentos do grupo B, a exceção de que os camundongos desse grupo são tratados com dexametasona via i.p. (30mg/kg diluída em 0,1 mL de salina) ministrada cerca de uma hora antes dos desafios.

O **GRUPO D** (n=04), também denominado grupo quercetina.

- Esse grupo fez os mesmos procedimentos de imunização e desafio dos GRUPOS B e C;
- Os animais desse grupo receberam, por meio de gavagem, uma solução formulada como microemulsão (100µg a 6% de quercetina).

Todos os procedimentos realizados em cada grupo (A/B/C/D) encontram-se sumarizados na TABELA 1.

Imunização

O processo inflamatório das vias aéreas foi induzido conforme descrito por VASCONCELOS et al. (2008). Os animais foram imunizados com 10µg de OVA (GRADE V; >98% de pureza; Sigma, St. Luis, MO) no volume final de 0,1ml diluída em água destilada com 2 mg/mL de hidróxido de alumínio (AlumImject; Pierce, Rockford, IL). A imunização aconteceu no primeiro dia (TO) com um reforço no 14º dia (T14) do estudo.

Sensibilização e desafio com OVA

A inalação foi executada em caixa de acrílico, tendo sido iniciada no 28º dia, com exposição de ovalbumina (OVA), inalada durante 15 minutos por dia, durante cinco dias consecutivos, a partir do 28º dia até o dia 32. A solução salina contendo uma concentração de 1% de OVA foi ministrada por meio de nebulização com o auxílio de um compressor de ar ligado a um nebulizador (RespiraMax, SN, Brasil). Os animais que foram sensibilizados, mas não desafiados (grupo controle negativo) receberam solução salina sem OVA como nebulização, nos mesmos moldes dos demais grupos.

Tratamento

Os animais recebiam o fitoterápico cerca de 1 hora antes da nebulização com OVA. Eles foram tratados com quercetina introduzida em microemulsão, ministrada aos camundongos via gavagem. A formulação da microemulsão foi desenvolvida

como se segue: lecitina (50g); palmitato de isopropila (50g), ácido ascórbico (1g), polaxamer 407* (20g), sorbato de potássio (0,2g), água destilada qsp (100mL). Cada dose de gavagem dada aos animais continha 20mg/kg. Doses de 0,1mL foram dadas aos animais em cada gavagem.

* **Observação:** POLAXAMER 407: Sinônimo: Pluronic F127; Polyethylene-polypropyleneglycol; Polyoxyethylene-Polyoxypropylene Block Copolymer; Poly(Ethylene oxide-co-Polypropylene oxide), Block; Block Copolymer of Ethylene Oxide and Propylene Oxide. Chemical Name: Pluronic F127. (C3-H6-O.C2-H4-O)_x

Eutanásia dos animais

Os animais receberam uma superdosagem de anestésico via i.p. (200µl de quetamina/xilazina 3:1 diluídos em salina). Depois de anestesiados, o sangue dos animais foi extraído via plexo braquial e colocado em *eppendorfs* de 0,65ml.

Lavado Brônquio Alveolar (LBA)

A pele do abdome e tórax foi retirada para exposição da traquéia. Um volume de 1 mL de solução tampão fosfato (PBS) gelado foi injetado na traquéia com uma agulha e aspirado novamente, repetindo-se o mesmo processo por três vezes. O líquido recuperado foi colocado em um tubo plástico Eppendorf em banho de gelo, posteriormente centrifugado a 1500 r.p.m. por 10 minutos à 10° C para coleta de sobrenadante para quantificação de citocinas. Mais 1 ml de PBS gelado foi injetado pela traquéia para repetição da lavagem do pulmão e para a contagem de células no LBA, as células do primeiro lavado foram somadas às do segundo para quantificação.

Retirada dos pulmões

Os pulmões dos animais foram instilados com formol para melhor fixação e preservação dos tecidos. O pulmão esquerdo foi seccionado em duas partes e

armazenado em tubos contendo formol a 4% (3ml em cada tubo) para formatação em lâminas e análise histopatológica do órgão.

Contagem de leucócitos do LBA

Para se determinar a quantidade de leucócitos no LBA um volume de 200µL de LBA foi adicionado a 200µL de tampão fosfato salina, sendo este volume final citocentrifugado por 5 minutos a 500 rpm. As lâminas foram preparadas com corante hematológico panótico (corante rápido para uso hematológico – Laborclin Produtos para Laboratório Ltda.) Para a estimativa total de leucócitos foram fotografados cinco campos de cada lâmina e o número estimado de células foi integrado por área. Para a contagem diferencial, 200 leucócitos foram contados por lâmina de acordo com critérios padronizados para diferenciação morfológica dessas células.

Análise histopatológica

Os pulmões foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para a quantificação das células inflamatórias no microscópio óptico. Para cada pulmão, 5 campos foram analisados por sessão num aumento de 400x e os dados foram usados para calcular um número médio de células por mm². A produção de muco foi analisada em seções coradas com PAS (*Periodic acid-Schiff*). Todas as imagens foram digitalizadas usando uma câmara de vídeo digital (CoolSnap cf) adaptada a um microscópio BX41(Olympus, Tóquio, Japão) calibrado com uma referência de slide de medição e utilizando um programa de imagem (Pro image, versão 6.1, Media Cybernetics, San Diego, CA, USA).

Quantificação de Interleucinas (IL) 4 e (IL) 13

As concentrações de interleucinas (IL)-4 e (IL)-13 no fluido de LBA foram determinadas por ELISA usando um kit específico de anticorpos (R&D System, Minnesota, MN, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de 4 a 6 animais por grupo. Todas as análises das curvas obtidas foram feitas pelo teste de análise de variância ANOVA ONE-WAY seguido do Teste Tukey para as comparações múltiplas. O nível de significância foi de $p < 0.05$.

Resultados

Concentração de leucócitos e contagem diferencial destas células no LBA dos animais

A FIGURA 2 mostra que a quercetina não induz uma diminuição significativa na concentração de células leucocitárias totais no LBA, quando comparado aos animais que não receberam o fitoterápico e foram desafiados normalmente (grupo controle positivo). A redução não foi significativa para os camundongos. Entretanto, o número de leucócitos dos animais dessa linhagem, tratada com dexametasona, também tiveram uma redução da concentração no LBA inferior àquela esperada (apenas 30,24%).

Foi executada também a contagem diferencial de leucócitos encontrados no lavado brônquio-alveolar. Duzentos leucócitos foram contados e, através de seus aspectos morfológicos e coloração, foram divididos em três grupos: macrófagos, linfócitos e eosinófilos.

O grupo de camundongos não tratados com quercetina ou dexametasona apresentou um aumento na proporção de leucócitos eosinófilos de 6,75 vezes com relação ao grupo controle negativo. Já os animais do grupo que foram tratados com quercetina têm um aumento muito semelhante àqueles que foram tratados com dexametasona e, com relação ao grupo controle negativo, apresentaram um aumento de 3,35 vezes no número de eosinófilos/200 leucócitos. Os dados estão apresentados na FIGURA 3.

Quantificação de interleucinas no LBA

As células inflamatórias do LBA dos camundongos BALB/c tratados no estudo com microemulsão contendo quercetina produziram uma concentração de IL-4 37,84% menor do que os animais do grupo controle positivo (FIGURA 4).

Quantificada a IL-13 no LBA, podemos observar que os animais tratados com quercetina têm uma redução de 37,86% em relação aos animais que não sofreram qualquer tipo de intervenção (controle positivo). Entretanto, a concentração de IL-13 no LBA destes camundongos ainda é 5,38 vezes maior do que os animais que foram tratados com dexametasona e 9,6 vezes maior do que aqueles animais que não foram desafiados com OVA (FIGURA 5).

Análise histopatológica do tecido pulmonar

Os camundongos tratados com quercetina apresentaram uma redução na produção de muco na ordem de 60,31% com relação ao grupo controle positivo, este resultado é similar àquele encontrado para o grupo de animais tratados com dexametasona (FIGURA 6).

A partir da análise da FIGURA 7, é possível observar que os camundongos apresentaram uma redução da celularidade leucocitária nos bronquíolos na ordem de 52,68%.

Discussão

Em estudos com quercetina envolvendo asma nos modelos experimentais, as formas de inoculação mais comuns do fitoterápico nos animais ocorrem por via oral (gavagem), por via intraperitoneal (i.p.), ou ainda por inalação; Nosso trabalho escolheu a via gavagem. Não existe nem uma concentração padronizada nos estudos que envolvem a aplicação da quercetina, assim como não há disponível um protocolo padrão para executar esta terapia. Os estudos sobre este fitoterápico utilizam concentrações que vão de 10 mg/kg aplicados de maneira única (JUNG *et al.*, 2010), até uma concentração elevada de 200 mg/kg realizada também em uma única aplicação (JAYARAJ *et al.*, 2007). Portanto, a concentração escolhida para os protocolos do presente trabalho foi de 20 mg/kg.

Um trabalho sugere que a quercetina administrada por via oral, na forma de suspensão, tem uma absorção muito limitada no trato digestivo (ROGÉRIO *et al.*, 2010b), sendo que, segundo os mesmos autores, a quercetina administrada via gavagem nas mesmas concentrações, por meio de microemulsão, produziu os resultados esperados.

Embora a quercetina seja absorvida no trato gastrointestinal, um estudo demonstrou que isso só acontece de maneira eficiente quando a quercetina é dada na forma glicosilada e que diferentes alimentos que contém quercetina possuem concentrações diferentes do fitoterápico ligado à glicose, assim como também a porção de carboidrato ocupada sítios de ligação diferentes com a molécula, influenciando também na capacidade de absorção da mesma (HOLLMAN *et al.*, 1995). Outro estudo dos mesmos autores também demonstra que formas de quercetina não glicosiladas têm absorção deficiente. (HOLLMAN *et al.*, 1997). A microemulsão é uma alternativa para o aumento da absorção do fitoterápico dando um caráter anfipático à molécula.

Dos seis parâmetros avaliados para se determinar a redução da inflamação causada pelo protocolo de indução por meio do desafio com OVA, todos demonstraram uma diminuição quando o grupo de animais tratados com quercetina foi comparado ao grupo controle positivo, o que corrobora com os resultados de Park e colaboradores (2009). Entretanto, apesar da similaridade nos resultados positivos apresentados em ambos os trabalhos, adotamos também o tratamento com dexametasona, com o intuito de correlacionar a eficiência da quercetina mediante um tratamento já bem estabelecido na literatura para o controle da asma. Assim, embora alguns dos parâmetros inflamatórios analisados no grupo quercetina não tenham tido uma diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle positivo, os principais parâmetros inflamatórios como a produção de muco e infiltração leucocitária pulmonar tiveram, em média, uma redução similar aos animais tratados com dexametasona e até ao próprio grupo controle. Nossos resultados estão em consonância com o trabalho de Rogério *et al.*, (2010b).

A comparação de um grupo tratado com quercetina e um grupo tratado com dexametasona também foi objeto do trabalho de autores que investigaram o efeito deste flavonóide sobre cobaias com asma induzida tanto nas reações de hiperresponsividade imediata (HRI) quanto na fase tardia da resposta asmática. Os resultados encontrados demonstraram que, embora a dexametasona seja mais

efetiva do que a quercetina no tratamento da asma experimental, o fitoterápico foi eficaz quando os animais dos dois grupos foram comparados. Adicionalmente, enquanto o corticóide não apresenta ação sobre a resposta imediata, a administração do fitoterápico apresentou resultados estatisticamente significantes nesta fase (JUNG *et al.*, 2007).

Num estudo de Rogério *et al.* (2010b) realizado para verificar os efeitos da quercetina em camundongos BALB/c, dada aos animais por meio de microemulsão, os resultados demonstraram que o fitoterápico apresenta efeitos similares, e neste estudo até mesmo superiores, com relação ao 1 mg/kg do antiinflamatório esteroidal (dexametasona) administrado via subcutânea. Os autores creditam a diminuição do processo inflamatório à redução da presença de citocinas dosadas no LBA (IL-4 e IL-5), reduzindo a resposta inflamatória, a eosinofilia e a produção de muco. Nessa investigação, o possível mecanismo de redução da produção das interleucinas dosadas foi proposto por meio da diminuição da expressão do fator NFκB nos animais tratados com quercetina, levando à supressão nos mecanismos que induzem a exacerbação na resposta Th2, embora nenhuma variação da produção de Interferon γ tenha sido evidenciada neste estudo. Considerando as similaridades do efeito antiinflamatório da quercetina encontradas tanto no nosso estudo como no desenvolvido por Rogério *et al.* (2010b), destacamos que o presente trabalho não dosou nem a produção de IL-5 no LBA e nem a expressão do fator nuclear κB. Em compensação, nós dosamos a IL-13, enquanto os referidos autores não o fizeram; ainda sim, a diferença principal entre o nosso estudo e o trabalho supracitado está no fato de que as dosagens de interleucinas encontradas no nosso trabalho não nos permite concluir que a inibição da eosinofilia e da produção de muco são decorrentes de uma redução significativa da resposta Th2, sugerindo que a quercetina provavelmente age também em outros mecanismos para minimizar os efeitos pró inflamatórios provocados pelo desafio com OVA na asma experimental.

Portanto, a redução da eosinofilia na linhagem de camundongos BALB/c no nosso trabalho, assim como a menor produção de muco nos grupos desafiados com OVA e tratados com quercetina nessa linhagem, provavelmente pode ser explicada, apenas em parte, por meio da redução na taxa de secreção de IL-4 e IL-13. No entanto, ressalta-se que a diminuição da produção dessas interleucinas ocorreu de forma muito mais acentuada no grupo tratado com dexametasona e ainda sim, para

os parâmetros inflamatórios avaliados, a quercetina apresentou resultados similares quando os animais são comparados com este grupo considerado padrão ouro.

A relação entre a expressão de uma proteína denominada GATA-3, que é responsável por fatores de transcrição específicos para células T, atuação na diferenciação destes linfócitos para um padrão Th2 e secreção das IL-4, IL-5 e IL-13; com a expressão de outro fator de transcrição específico para a produção de interferon γ e do fenótipo Th1, conhecido como T-bet (T-box expresso em células T) foi estabelecida num estudo envolvendo quercetina, nas doses de 8mg/kg/dia e 16mg/kg/dia e asma induzida por OVA. Os resultados apresentados pelos autores desse estudo demonstraram uma dose dependência na ingestão desse fitoterápico ligada à mudança de padrão imunológico de resposta, com diminuição da resposta Th2 e incremento da resposta Th1 (PARK *et al*, 2009). O estudo destes autores reforça a importância da relação entre o padrão de resposta Th1/Th2 com a melhoria no quadro da asma experimental causada pela quercetina; embora o nosso estudo não corrobore com essa relação de maneira tão estrita, ela provavelmente se fez presente.

Os resultados do nosso trabalho apontam que um possível mecanismo que deve ser investigado está associado ao receptor das interleucinas IL-4 e IL-13, tendo em vista que nos modelos de asma induzidos por antígenos solúveis de ovo (ASO), injeções de antígenos induzem pico de extravasamento de eosinófilos nas vias aéreas 48 horas após a inoculação. Animais tratados com anticorpos anti IL-4 demonstraram um influxo de eosinófilos para as vias aéreas em cerca de 10 vezes e uma redução total na celularidade de leucócitos nos pulmões. O excesso de produção de muco está correlacionado com a eosinofilia. Experimentos com camundongos geneticamente modificados, com linfócitos Th2 incapazes de produzir IL-4 (Th2 IL-4 $-/-$), demonstraram que estes animais ainda são capazes de produzir muco em níveis normais. Entretanto, células Th2 IL-4 $-/-$ não induzem produção de muco em camundongos que não expressam o receptor celular para IL-4 (IL-4R α $-/-$) e o LBA destes camundongos está ausente de eosinófilos. Na ausência de IL-4, IL-13 pode realmente substituir a produção de muco e a eosinofilia gerada por IL-4 secretada por células Th2, demonstrando que IL-4R α desempenha um papel essencial na produção de muco estimulada pelas células Th2 e a importância da ação redundante dessas duas interleucinas em modelos de asma experimental (OKADA & LOTZE, 2003). Assim, novos estudos devem investigar a hipótese de

que o efeito da quercetina pode estar relacionado com a uma possível capacidade de modulação na expressão dos receptores IL-4R α , ou até mesmo devido à modulação de processos pós acionamento do receptor.

A importância dos eosinófilos na asma está associada também a um grande número de evidências demonstrando que a gravidade desta doença depende do acúmulo destas células e sua ativação no interior das vias aéreas. Eosinófilos contém um grande número de substâncias que quando liberadas diretamente nas mucosas causam danos e contribuem para os distúrbios fisiológicos no pulmão. Os produtos dos eosinófilos incluem proteína básica principal, proteínas catiônicas, neurotoxinas derivadas de eosinófilos, eosinófilo peroxidase, assim como metabólicos de oxigênio e nitrogênio (ROITT *et al.*,2001). Estas células também liberam mediadores lipídicos, incluindo fatores ativadores de plaquetas, leucotrienos B4 e C4, quimiocinas e citocinas que são capazes de amplificar a resposta eosinofílica. Nesta cascata de eventos, participam também células estruturais que liberam ainda mais fatores de amplificação da resposta inflamatória (OLIVEIRA & LUCAS, 2003). Portanto, sabendo-se das inúmeras propriedades anti-oxidantes e citoprotetoras encontradas em diversos estudos envolvendo a quercetina (DORTA, 2007; HERTOOG *et al.* 1993; JAYARAJ *et al.* 2007), há a necessidade de se investigar as propriedades antioxidantes desse fitoterápico sobre as diversas substâncias catabólicas e inflamatórias liberadas pelos eosinófilos no processo de inflamação induzida por OVA em modelos experimentais.

Os resultados desse estudo sugerem que na asma experimental a produção de muco, a eosinofilia no LBA e o infiltrado leucocitário no nível dos bronquíolos ocupam um papel central no processo inflamatório induzido por imunização e desafio por OVA em camundongos da linhagem BALB/c. A microemulsão de quercetina foi capaz de reduzir parâmetros inflamatórios como liberação de citocinas pro-inflamatórias, celularidade, eosinofilia e produção de muco, demonstrando o seu potencial terapêutico como ação anti asmática, entretanto, o mecanismo de ação desse fitoterápico ainda precisa ser melhor compreendidos.

Bibliografia

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Hipersensibilidade tardia. In: *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier 2007. Pag. 441-462.
- AMÁLIA, P.M.; POSSA, M.N.; AUGUSTO, M.C.; FRANCISCA, L.S. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci*, 2007. 52: 2616-2621.
- AUGER, C.; TEISSEDRE, P.L.; GÉRAIN, P.; LEQUEUX, N; BORNET, A.; SERISIER, S.; BESANÇON, P.; CAPORICCIO, B.; CRISTOL, J.P.; ROUANET, J.M. Dietary wine phenolic catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 2005. 53: 2015-2021.
- BARNES, P.J. Corticosteroids: the drug to beat. *European Journal of Pharmacology*. 2006. 533:2-14.
- British Thoracic Society (1993). Guidelines for the management of asthma: a summary. *Br Med J*. 306:776-782.
- CHOI, E. J.; CHEE, K.W.; LEE, B. H. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2003. 281-285.
- CHOI, I.; SEOG, H.; PARK, Y.; KIM, Y; CHOI, H. Suppressive effects of germinated buckwheat on development on fatty liver in mice fed with high-fat diet. *Phytomedicine*. 2007: 563-567.
- DORTA, D.J. *Efeitos citoprotetor e/ou citotóxico dos flavonóides: estudo estrutural-atividade envolvendo mecanismos mitocondriais, com ênfase na apoptose*. 2007. 134 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- DU, G.; LIN, H.; YANG, Y.; ZHANG, S.; WU, X.; WANG, M.; JI, L.; LU, L.; YU, L.; HAN, G. Dietary quercetin combining intratumoral doxorubicin injection synergistically induces rejection of established breast cancer in mice. *International immunopharmacology*. 2010. 1-8.
- FOSTER, P.S.; MOULD, A.W.; YANG, M.; MACKENZIE, J.; MATTES, J.; HOGAN, S.P.; MAHALINGAM, S.; MACKENZIE, A.N.; ROTHENBERG, M.E.; YOUNG, I.G.;

MATTHAEI, K.I.; WEBB, D.C. Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. *Immunological Reviews*. 2010. 179: 173-181.

FUKUNAGA, J.; MASAYOUSHI, A.; MURAI, A.; AKITAKE, Y.; HOSOKAWA, M.; TAKAHASHI, M. Comparative study to elucidate mechanism underlying the difference in airway hyperresponsiveness between two mouse strains. *International Immunopharmacology*. 2007. 7:1852-1861.

HERTOG, M.G.; FESKENS, E.J.; HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993. 342:1007–1011.

HEWITT, M.; CREEL, A.; ESTELL, K.; DAVIS, I.C.; SCHWIEBERT, L.M. Acute exercise decreases airway inflammation, but not responsiveness, in a allergic asthma model. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2009. 40:83-89.

HOLGATE, S.T. Pathogenesis of asthma. *Clinical and Experimental Allergy*. 2008. 38:6: 872-897.

HOLLMAN P.C.; VRIES, J.H.; LEEUWEN, S.D.; MENGELERS, M.J.; KATAN, M.B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1995. Vol. 62:6: 1276-1282.

HOLLMAN, P.C.; TRIJP, J.M.; GAAG, M.S.; MENGELERS, M.J.; VRIES, J.H.; KATAN, M.B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *Febs Letters*. 1997. Vol. 418: 152-156

HOSHINO, T.; TODA, R.; AIZAWA, H. Pharmacological treatment in Asthma and COPD. *Allergology International*. 2009. 58: 341-346.

JAYARAJ, R.; DEB, U.; BHASKAR, A.S.B.; PRASAD, G.B.K.S.; RAO, P.V.L. Hepatoprotective efficacy of certain flavonoids against microcystin induced toxicity in mice. *Inter Science*. 2007. 472:479.

JUNG, C.H.; LEE, J.Y.; CHO, C.H.; KIM, C.J. Anti-asthmatic action of quercetin and rutin in conscious guinea-pigs challenged with aerosolized ovalbumin. *Archives of Pharmacal Research*. 2007. 30: 1599-1607.

JUNG, WY; PARK, SJ; PARK, DH; KIM, JM; KIM, DH; RYU, JH. Quercetin impairs learning and memory in normal mice via suppression of hippocampal phosphorylated cyclic AMP response element-binding protein expression. *Toxicology Letters*. 2010. 10:1016.

JUNGSUWADEE, P.; DEKAN, G.; STINGL, G.; EPSTEIN, M.M. Inhaled dexamethasone differentially attenuates disease relapse and established allergic asthma in mice. *Clin. Immunol.* 2004. 110:13–21.

KAY, A.B. The role play of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends in Molecular Medicine*. 2005. 11:4: 148-152.

KOK, C.C.; SCHWENGER, G.T.; OSMOND, R.I.; URWIN, D.L.; SANDERSON, C.J. Chapter 11: Interleukin – 5. In: *The cytokine handbook*. Ed. Academic press. 2003. Vol. 1: 268.

KUMAR, R.K. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis of improvements in therapy? *Pharmacology & Therapeutics*. 2001. 91:2: 93-104.

LEE, F.P.; SHIH, C.M.; SHEN, H.Y.; CHEN, C.M.; CHEN, C.M.; KO, W.C. Ayanin, a non-selective phosphodiesterase 1-4 inhibitor, effectively suppress ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness without affecting xylazine/ketamine-induced anesthesia. *Pulmonary, Gastrointestinal and Urogenital Pharmacology*. 2010. 635:198-203.

LORENZI, T.F. Manual de hematologia – propedêutica e clínica. ed. Guanabara Koogan – 4ª edição. 2006.

LOWDER, T.; DUGGER, K.; DESHANE, J.; ESTELL, K.; SCHWIEBERT, L.M. Repeated bouts of aerobic exercise enhance regulatory T cell responses in a murine asthma model. *Brain Behavior, and Immunity*. 2010. 24:153-159.

LU, Y.; SJÖSTRAND, M.; MALMHALL, C.; RADINGER, M.; JEURINK, P.; LÖTVALL, J.; BOSSIOS, A. New production of eosinophils and the corresponding TH1/TH2 balance in the lungs after allergen exposure in BALB/c and C57BL/6 mice. *Scandinavian Journal of immunology*. 2010. 71:3:176-185.

MAUAD, T.; SOUZA, A.S.; SALDIVA, P.H.; DOLHNIKOFF, M. Remodelamento brônquico na asma. *Jornal de Pneumologia*. 2000. 26:2:91-98.

MISHRA, D; FLORA, S.JS. Quercetin administration during chelation therapy protects arsenic-induced oxidative stress in mice. *Biol Trace Elem Res.* 2008. 122:137-147.

MOROKATA, T.; ISHIKAWA, J.; IDA, K.; YAMADA T. C57Bl/6 mice are more susceptible to antigen-induced pulmonary eosinophilia than BALB/c mice. *Immunology.* 1999. 98:3:345-351.

NAKAMURA, H.; WEISS, S.T.; ISRAEL, E.; LUSTER, A.D.; DRAZEM, J.M.; LILLY, C.M. Eotaxin and impaired lung function in asthma. *Am. J. Respir Crit Care Med.* 1999. 160:1952-1956.

NICKEL, T.; HANSEN, H.; SISIC, C.; PFEILER, S.; SUMMO, C.; SCHMAUSS, D.; HOSTER, E.; WEIS, M. Immunoregulatory effects of the flavonol quercetin in vitro and in vivo. *Eur. J. Nutr.* 2010. 23.

OLIVEIRA, S.H.; LUKACS, N.W. The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reaction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2003. 36:1455:1463.

OKADA, H.; BANCHEREAU, J.; LOTZE, M.T. Chapter 10: Interleukin – 4. In: THONSON, A.W.; LOTZE, M.T. The cytokine handbook. Ed. Academic press. 2003. Vol. 1: 245-246.

PARK, H.; LEE, C.M.; JUNG, I.D.; LEE, J.S.; JEONG, Y.; CHANG, J.H.; CHUN, S.H.; KIM, M.J.; CHOI, I.W.; AHN, S.C.; SHIN, Y.K.; YEOM, S.R.; PARK, Y.M. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *International immunopharmacology.* 2009. 9:261-267.

ROGÉRIO, A.P.; KANASHIRO, A.; FONTANARI, C.; SILVA, E.V.; VALIM, Y.M.; SOARES, E.G.; FACCIOLI, L.H. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercetin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation research.* 2007. 56:402-408.

ROGÉRIO, A.P.; DORA, C.L.; ANDRADE, E.L.; CHAVES, J.S.; SILVA, L.F.; SENNA, E.L.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacological Research.* 2010a. 61: 288-297.

ROGÉRIO, A.P.; NUNES, A.S.; FACCIOLI, L.H. The activity of medicinal plants and secondary metabolites on eosinophilic inflammation. *Pharmacological research*. 2010b. 62:298-307.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Hipersensitivity – type I. In: *Immunology*. Edinburgh: Mosby 2001. Pag. 324-344.

SHE, P.; ZHOU, Y.; ZHANG, Z.; GRIFFIN, K.; GOWDA, K.; LYNCH, C.J. I. Disruption of BCAA metabolism in mice impairs exercise metabolism and endurance. *J. Appl Physiol*. 2010. 4: 941-949.

SINTOV, A.C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration *in vitro* and cutaneous drug bioavailability *in vivo*. *J. Control Release*, 200. 95:173-183.

VASCONCELOS, J.F.; TEIXEIRA, M.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; LÚCIO, A.S.S.C.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUEIROZ, L.P.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. *Immunopharmacol*. 2008. 8:1216-1221.

VASCONCELOS, J.F. Avaliação da atividade farmacológica de substâncias purificadas a partir de plantas do semi-árido brasileiro no modelo de asma brônquica. 2007. 55 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

VIEIRA, R.P.; DUARTE, A.C.; SANTOS, A.B.; MEDEIROS, M.C.; MAUAD, T.; MARTINS, M.A.; CARVALHO, C.R.; DOLHNIKOFF, M. Exercise reduces effects of creatine on lung. *International Journal Sport Medicine*. 2009. 30:684-690.

The International study of asthma and allergy in childhood (ISSAC) steering committee. Worldwide variation in prevalence of asthma symptoms: The International study of asthma and allergy in Childhood (ISSAC). *Eur Respir J* 1998;12:315-35.

WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology Medicine*. 2004. 36:829-837.

WANG, L.; TU, Y.C.; LIAN, T.W.; HUNG, J.T.; YEN, J.H.; WU, M.J. Distinctive antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006. 9798-9804.

ZHOU, W.; KALLIFATIDIS, G.; BAUMANN, B.; RAUSCH, V.; MATTERN, J.; GLADKICH, J.; GIESE, N.; MOLDENHAUER, G.; WIRTH, T.; BÜCHLER, M.W.; SALNIKOV, A.V.; HERR, I. Dietary polyphenol quercetin targets pancreatic cancer stem cells. *International Journal of Oncology*. 2010. 37: 551-556.

NHLBI/WHO Workshop Report (1995). Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Publication Number 95-3659. Bethesda: National Institutes of Health.

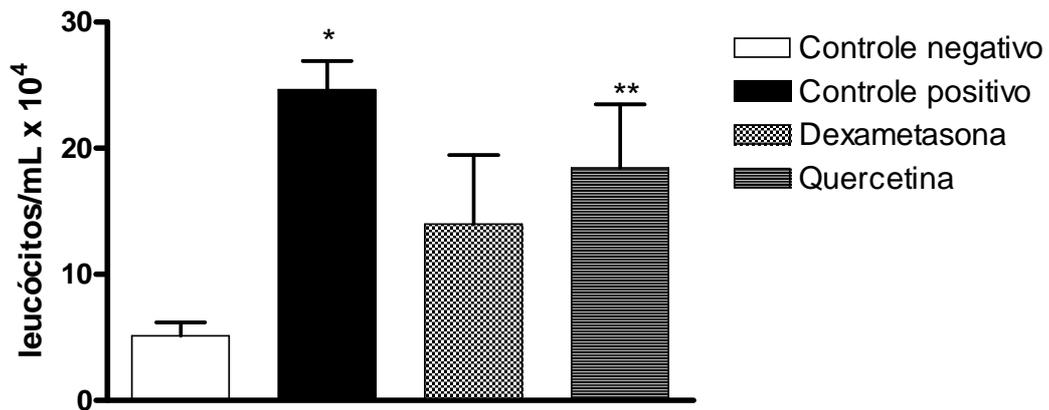


FIGURA 2. Contagem total de leucócitos no LBA. Foi analisada a contagem de leucócitos totais no LBA em diferentes grupos de camundongos do estudo. Os valores representam a Média e o Erro Padrão dos diferentes grupos. Mínimo de 4 e máximo de 6 animais por grupo. * $P < 0,01$ comparando controle negativo com controle positivo. ** $P < 0,05$ comparando controle negativo com grupo quercetina.

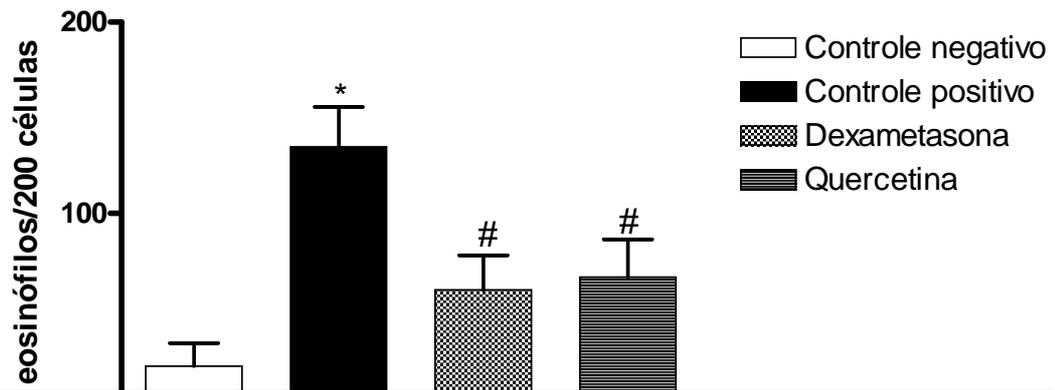


FIGURA 3. Contagem diferencial de leucócitos no LBA. Foi analisada a contagem diferencial de eosinófilos no LBA em diferentes grupos de camundongos do estudo. Os valores representam a Média e o Erro Padrão dos diferentes grupos. Mínimo de 4 e máximo de 5 animais por grupo. * $P < 0,001$ comparando controle negativo com controle positivo. # $P < 0,05$. Comparando controle positivo com grupos dexametasona e quercetina.

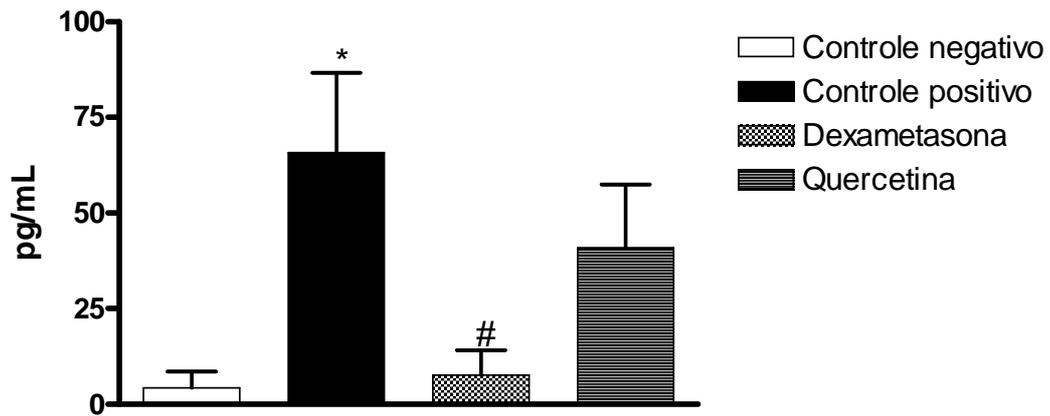


FIGURA 4. Detecção da produção de IL-4 no LBA. Foi analisada a quantificação de IL-4 em diferentes grupos de camundongos. Os valores representam a Média e o Erro Padrão dos diferentes grupos. Mínimo de 4 e máximo de 6 animais por grupo. * $P < 0,001$ comparando controle negativo com controle positivo. # $P < 0,05$ comparando controle positivo com grupo dexametasona.

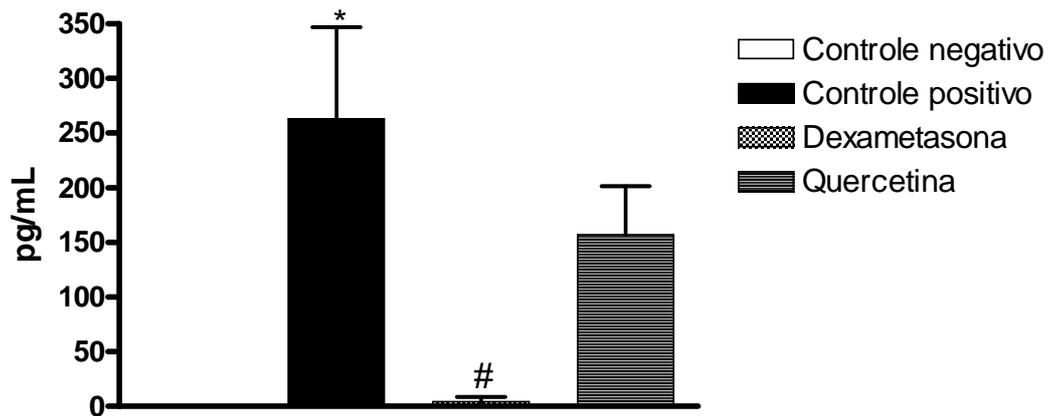


FIGURA 5. Detecção da produção de IL-13 no LBA. Foi analisada a quantificação de IL-13 em diferentes grupos de camundongos BALB/c na FASE 2 do estudo. Os valores representam a Média e o Erro Padrão dos diferentes grupos. Mínimo de 4 e máximo de 5 animais por grupo. * $P < 0,001$ comparando grupo controle negativo com grupo controle positivo. # $P < 0,001$ comparando grupo controle dexametasona com grupo controle positivo.

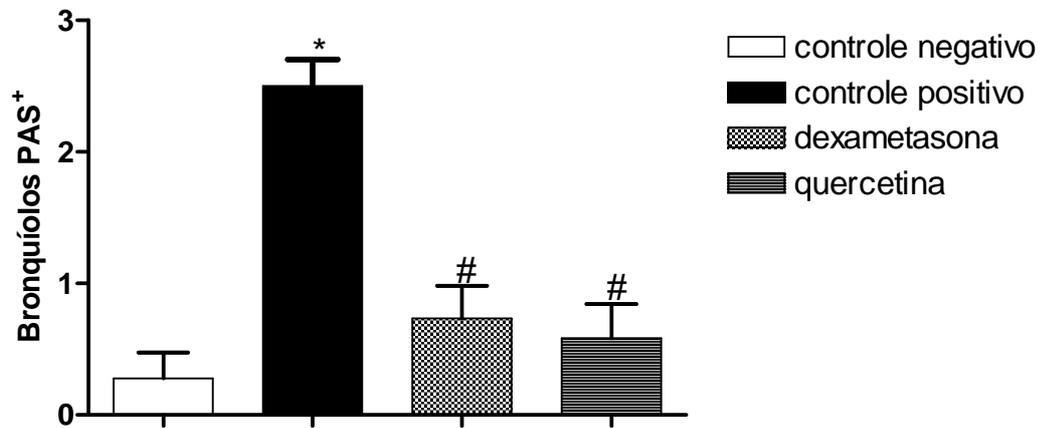


FIGURA 13. Detecção da produção de muco. Foi analisada a quantificação da produção de muco em lâminas de pulmão coradas com PAS vistas sob um aumento de 400x nos diferentes grupos de camundongos BALB/c na FASE 2 do estudo. Os valores representam a Média e o Erro Padrão dos diferentes grupos. Mínimo de 4 e máximo de 6 animais por grupo. * $P < 0,001$ comparando controle negativo com controle positivo. # $P < 0,001$ comparando controle positivo com grupo dexametasona e quercetina.

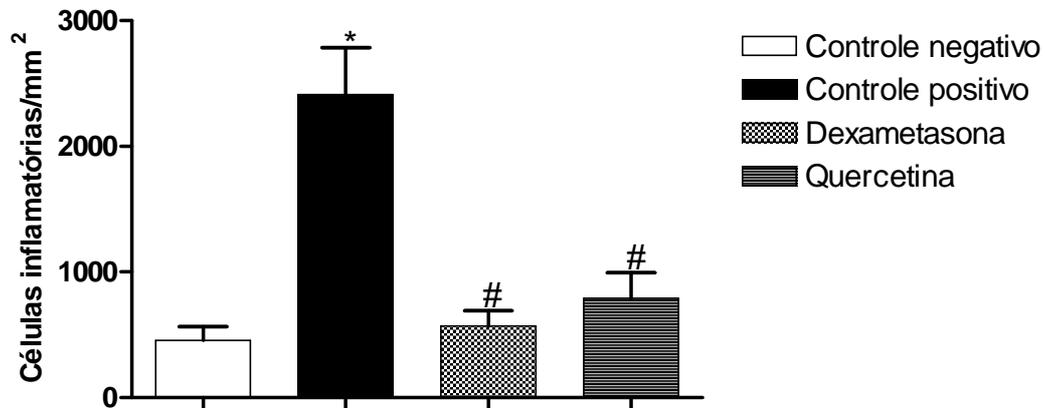


FIGURA 7. Quantificação de leucócitos nos bronquíolos. Foi quantificada a infiltração de leucócitos nos bronquíolos em lâminas de pulmão coradas com HE vistas sob um aumento de 400x nos diferentes grupos de camundongos BALB/c na FASE 2 do estudo. Os valores representam a Média e o Erro Padrão dos diferentes grupos. Mínimo de 4 e máximo de 6 animais por grupo. * $P < 0,001$ comparando controle negativo com controle positivo. # $P < 0,001$ comparando controle positivo com grupo dexametasona e quercetina.

Tabela 1. Procedimentos realizados em cada grupo experimental.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
1ª Imunização (T0) e 2ª imunização (T14)	X	X	X	X
Desafio com salina	X			
Desafio com OVA a 1%		X	X	X
Veículo (microemulsão sem quercetina)		X		
Dexametasona (30mg/kg)			X	
Quercetina (microemulsão a 6% de quercetina)				X

Tabela 2. Protocolo de aplicação de quercetina.

1º dia de desafio c/ OVA	2º dia de desafio c/ OVA	3º dia de desafio c/ OVA	4º dia de desafio c/ OVA	5º dia de desafio c/ OVA
Quercetina 20mg/kg	Quercetina 20mg/kg	Quercetina 20mg/kg	Quercetina 20mg/kg	Quercetina 20mg/kg