

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**TALISSA MOZZINI MONTEIRO**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E IMUNOMODULADORA**  
**DO GAMA-TERPINENO**

João Pessoa – PB

2018

**TALISSA MOZZINI MONTEIRO**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E IMUNOMODULADORA  
DO GAMA-TERPINENO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS.**

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam

João Pessoa - PB

2018

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

M775e Monteiro, Talissa Mozzini.

Estudo da atividade ansiolítica e imunomoduladora do gama-terpineno / Talissa Mozzini Monteiro. - João Pessoa, 2018.

177 f. : il.

Orientação: Márcia Regina Piuvezam.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Gama-terpineno - Ação anti-inflamatória. 3. Lesão Pulmonar Aguda. I. Piuvezam, Márcia Regina. II. Título.

UFPB/BC

**TALISSA MOZZINI MONTEIRO**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E IMUNOMODULADORA  
DO GAMA-TERPINENO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção de grau de **DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**.

Tese de Doutorado QUALIFICADA dia 21/07/2017.

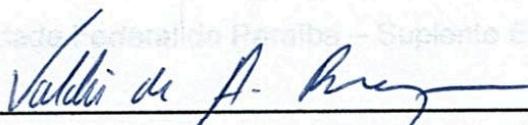
**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam

Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos  
Universidade Federal da Paraíba – Orientadora

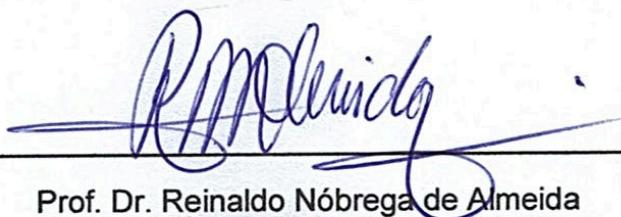
---



Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos  
Universidade Federal da Paraíba – Membro Interno

---



Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos  
Universidade Federal da Paraíba – Membro Interno

**ÀQUELES QUE AMO.**

*Meus tesouros, meus filhos Paulo e Davi,  
Sem amor, nada disto seria possível;  
E ainda que fosse possível, não haveria sentido.*

## AGRADECIMENTOS

"Para poder amar, é preciso ter um coração puro e é preciso rezar.

O fruto da oração é o aprofundamento da fé.

O fruto da fé é o amor.

E o fruto do amor é o serviço ao próximo. Isso nos conduz à paz."

(Madre Teresa de Calcutá)

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,

mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser,

mas Graças a Deus,

não sou o que era antes".

(Marthin Luther King)

**A Deus**, que sempre me fez sentir Sua presença durante várias batalhas, capacitando-me e fortalecendo-me, mesmo quando sentia-me impotente, para conquistar mais uma vitória em minha vida.

**Aos meus pequenos grandes filhos, Paulo e Davi**, pelo sorriso, abraço e amor. Obrigado por entenderem a minha ausência necessária para a conclusão deste trabalho. Vocês me fortalecem! Vocês são a razão da minha existência!

Ao meu amado companheiro **Paulo**, pelos incentivos, compreensão e amor. Juntos somos uma equipe e tanto! Te amo!

Aos meus pais, **Marcos Fernando e Silvana**, pelo amor incondicional; por ser meu exemplo e pelos constantes incentivos. Aos meus irmãos, **Marcos Henrique e Camila** pelo amor, amizade e suporte de todas as horas. A minha querida e amada Vó, a **Bisa Teozene**, pelo amor, companheirismo, pelas orações, pelo suporte com os meus filhos, enfim, por tudo! **Aos meus familiares**: tios, tias, primos e primas, por

estarem presentes e se alegrarem em minhas vitórias. **A família do meu marido**, pelo suporte!

As minhas queridas amigas **Cinara, Luciana e Viviane** pela linda amizade que construímos, que tenho certeza, será eterna! Essa amizade foi fundamental para mim em diversos momentos.

À minha orientadora, professora **Márcia Regina Piuvezam** minha gratidão pela acolhida, confiança em mim depositada, e por todo o conhecimento transmitido.

Ao professor **Dr. Eugene Nalivaiko**, minha profunda gratidão pela amizade, paciência em me ensinar e principalmente, por acreditar em mim!

Aos professores **Dr. Valdir, Dr. Reinaldo Nobrega e Dr. Isac Almeida de Medeiros**, minha gratidão por me receberem em seus laboratórios. A querida amiga Fátima, que sempre me ajudou, tanto com palavras de incentivo, como em meus experimentos.

À minha querida amiga de longa data **Carlúcia Ithamar Franco**, por ter plantado essa sementinha da neurociência em mim. Com certeza aprendi muito com a nossa convivência. Sua amizade, mesmo que distante é eterna para mim!

**Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos**, que foram essenciais ao longo destes anos.

**Aos amigos e companheiros da turma de Mestrado do PGPNSB**, especialmente **Janine, Bruna, Millen, Carol, e Ana Luísa**, obrigada pelo conhecimento compartilhado nos seminários intermináveis, amizade e pelas boas risadas nos momentos de diversão.

**A todos os companheiros de bancada do Laboratório de Imunofarmacologia**, ilustres protagonistas da história que será contada aqui. **Hermann, Fagner, Laércia, Larissa, Grasiela, Talita, Rachel, Priscila, Ana Luiza, Danilo, Jacqueline, Luiz, Ícaro, Byanca, Anne, José Guilherme e Adriano**, serei eternamente grata pela ajuda, indispensável na superação de cada obstáculo com que me deparei durante o mestrado. Além de todo conhecimento e experiência que dividimos, levarei comigo uma grande saudade de todos. Sintam-se por mim abraçados! Em especial meus colegas diretos de bancada, **Fagner, Laercia e**

**Larissa!** Os experimentos com vocês são fantásticos. A querida amiga **Priscila**, que mesmo distante, nunca hesitou em me ajudar! Obrigado amiga!

Ao amigo de longa data e funcionário **Crispim**, pela sua solícita presença em todo o meu trabalho. Aos funcionários **Mônica**, linda e sempre sorridente e **Luiz** pela presteza. Sem o auxílio de vocês nada disso seria possível.

**À Universidade Federal da Paraíba**, pela viabilidade técnica fundamental ao desenvolvimento de minhas atividades.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo suporte financeiro.

Enfim, à todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigado à todos!

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

**José de Alencar**

## RESUMO

A inflamação é gerada em resposta a estímulos nocivos, tais como agentes patogênicos, podendo estar associada a uma patogênese aguda ou evoluir para um processo crônico. O gama-terpineno (GT) é um monoterpeneo que, em estudos prévios, apresentou ação anti-inflamatória em processos inflamatórios agudos. O presente trabalho teve como objetivo elucidar os mecanismos anti-inflamatórios e ansiolíticos do GT em modelos murinos de inflamação aguda - Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e inflamação crônica - rinite e asma. Para tal, camundongos BALB/c foram desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) para induzir a LPA e foram tratados, uma hora após o desafio, com GT (12,5; 25 e 50 mg/kg) por três dias. Após 72 h os animais foram eutanasiados para coleta do fluido do lavado broncoalveolar (BALF). Para os modelos murinos de rinite e asma, camundongos BALB/c foram sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA) e foram tratados com GT (12,5; 25 e 50 mg/kg) ou droga padrão (dexametasona 2 mg/kg) 1 h antes de cada desafio com OVA. Após o último desafio, os animais foram submetidos à análise de sintomas clínicos da rinite e testes de ansiedade e imunológicos no modelo de asma. Na LPA, os animais tratados com GT (50 mg/kg) apresentaram diminuição, no lavado do fluido nasal (NALF), na migração das células totais, diferenciais (neutrófilos e células mononucleares), na concentração de proteínas totais, bem como no peso pulmonar quando comparados ao do grupo OVA (doente). Estudos histopatológicos mostraram que o tratamento com GT50 diminuiu o infiltrado celular nas regiões alveolares e vasculares, edema, hemorragia. Na análise de parâmetros imunológicos, houve diminuição das citocinas inflamatórias, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , bem como diminuição da expressão do receptor TLR4, da MAPquinase p38 e do p65NFkB. No protocolo de rinite, o tratamento com GT50 apresentou diminuição dos sintomas clínicos, como fricção nasal e espirros, além de diminuição no BALF de células totais e diferenciais, principalmente eosinófilos. Na histopatologia da cavidade nasal, o tratamento com GT50 promoveu diminuição nesta área: do infiltrado celular, da secreção de muco e do número de mastócitos. Na asma, o tratamento com GT50 diminuiu significativamente os índices de ansiedade em comparação com animais do grupo OVA (doente) de forma semelhantes ao diazepam (1 mg/kg), apresentando efeito ansiolítico. O tratamento com o GT50 também diminuiu a expressão de c-fos em áreas cerebrais como o núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) e núcleo central da amígdala (CeA) quando comparado com o grupo OVA. Nas análises histológicas houve diminuição do infiltrado e da secreção de muco no tecido pulmonar. Em adição, o tratamento com GT50 diminuiu parâmetros imunológicos como: níveis de IgE-OVA-específica; migração de células totais e diferenciais principalmente eosinófilo no BALF e modulação da resposta Th2 por induzir tanto a citocinas do perfil Th1 como IFN $\gamma$  como do perfil regulatório IL-10. O tratamento com GT50 também foi capaz de diminuir as citocinas Th2, como a IL-4 e IL-13 além de diminuir a ativação da MAPquinase p38 e a expressão do p65NFkB. Esses dados indicam que o GT possui ambas as propriedades: ansiolítica e anti-inflamatória em processos agudos e crônicos pela inibição da MAP quinase p38 e do fator de transcrição NFkB .

**Palavras-chave:** gama-terpineno (GT), Lesão Pulmonar Aguda (LPA), Rinite, Asma, camundongos OVA-sensibilizados; Psicoimunologia.

## ABSTRACT

Inflammation is generated in response to noxious stimuli, such as pathogens, and may be associated with an acute pathogenesis or progress to a chronic process. Gamma-terpinene (GT) is a monoterpene that, in previous studies, presented anti-inflammatory action in acute inflammatory processes. The present work aimed to elucidate the anti-inflammatory and anxiolytic mechanisms of GT in murine models of acute (Acute Pulmonary Injury - ALI) and chronic inflammation (rhinitis and asthma). For this, BALB/c mice were challenged with lipopolysaccharide (LPS) to induce ALI and were treated one hour post challenge with GT (12.5, 25 and 50 mg/kg) for three days. After 72 h the animals were euthanized for collection of bronchoalveolar lavage fluid (BALF). For murine models of rhinitis and asthma, BALB/c mice were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) and were treated with GT (12.5; 25 and 50 mg/kg) or standard drug (dexamethasone 2 mg/kg) 1 h before each challenge with OVA. After the last challenge, animals were submitted to clinical symptoms analysis of rhinitis and anxiety and immunological tests in the asthma model. In the ALI protocol, animals GT-treated (50 mg/kg) presented, in nasal fluid lavage (NALF), a decrease in the migration of total and differential cells (neutrophils and mononuclear cells), total protein concentration, as well as lung weight, when compared with OVA group. Histopathological studies showed that treatment with GT50 decreased the cellular infiltrate in the alveolar and vascular regions, edema and hemorrhage. In immunological parameters, GT50 treatment presented a decrease in inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , as well as decreases in the expression of the TLR4 receptor, p38 MAPKinase and p65NFkB. In rhinitis protocol, treatment with GT50 showed a decrease in clinical symptoms, such as nasal friction and sneezing, in addition to a decrease in BALF of total and differential cells, mainly eosinophils. Histopathological analyses of the nasal cavity, the treatment with GT50 promoted a decrease in cell infiltrate, mucus secretion and mast cell number. The treatment with GT50 in asthma protocol showed a significantly decrease in anxiety rates compared to OVA animals (sick), effect similar to diazepam (1 mg/kg), presenting an anxiolytic effect. Treatment with GT50 also decreased c-fos expression in brain areas such as the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and central nucleus of the amygdala (CeA) when compared to the OVA group. In the histological analyzes there was a decrease in cell infiltration and mucus secretion in the lung tissue. In addition, treatment with GT50 decreased immunological parameters such as: IgE-OVA-specific levels; migration of total and differential cells mainly eosinophil in BALF and modulation of the Th2 response by inducing both Th1 profile by secretion of IFN $\gamma$  cytokine and regulatory profile, by secretion of cytokine IL-10. Treatment with GT50 was also able to decrease Th2 profile cytokines, such as IL-4 and IL-13, in addition to decreasing the activation of p38 MAPkinase and p65NFkB receptor expression. These data indicate that GT has both anxiolytic and anti-inflammatory properties in acute and chronic processes by inhibition of MAP kinase38 and the transcription factor NFkB.

**Keywords:** gamma-terpinene (GT), Acute Lung Injury (ALI), Rhinitis, Asthma, OVA-sensitized mice; Psychoimmunology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema demonstrando os fenótipos e endotipos da asma e seus grupos.....	39
Figura 2. Representação esquemática dos fenótipos da asma. ....	39
Figura 3. Respostas imunes de tipo 2 na asma. ....	44
Figura 4. Asma como doença da musculatura lisa que é modificada pelo processo inflamatório presente em cada endotipo. ....	46
Figura 5. Neurônios nociceptores liberam neuropeptídeos que regulam as funções das células imunes adaptativas e inatas. ....	55
Figura 6. Esquema ilustrativo das interações entre os sistemas nervoso, endócrino e imune. ....	57
Figura 7. Esquema representativo mostrando a relação entre asma, respiração e ansiedade. ....	59
Figura 8. Estrutura química dos monoterpeno gama-terpineno.....	62
Figura 9. Resumo do protocolo de lesão pulmonar aguda (LPA). ....	71
Figura 10. Resumo do protocolo de Rinite Alérgica.....	74
Figura 11. Labirinto em Cruz Elevado (LCE). ....	77
Figura 12. Placa Perfurada (PP). ....	78
Figura 13. Resumo do protocolo de Inflamação Pulmonar Alérgica Experimental .....	86
Figura 14. Resumo esquemático das metodologias utilizadas no estudo do GT. ....	87
Figura 15. Efeito do tratamento com gama terpineno (GT) no tecido pulmonar de animais com lesão pulmonar aguda.....	93
Figura 16. Efeito do tratamento com gamaterpineno (GT) na histologia pulmonar usando Tricômico de Gomori (TG) .....	94
Figura 17. Efeito do tratamento com GT na expressão de moléculas sinalizadoras nas células do BALF de animais com Lesão Pulmonar Aguda (LPA) .....	97
Figura 18. Efeito do tratamento com GT no tecido da cavidade nasal de animais com rinite alérgica experimental.....	103
Figura 19. Efeito do tratamento com GT na expressão de c-fos no cérebro de animais com asma alérgica experimental .....	110

<b>Figura 20. Efeito do tratamento com GT no tecido pulmonar dos animais com asma alérgica experimental .....</b>	<b>116</b>
<b>Figura 21. Análise das populações celulares em citometria de fluxo na asma .....</b>	<b>121</b>
<b>Figura 22. Atuação do GT50 na Lesão Pumonar Aguda (LPA) .....</b>	<b>148</b>
<b>Figura 23. Efeito do tratamento do GT50 na Asma e Rinite .....</b>	<b>149</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito do tratamento com gama terpineno (GT) na migração de células totais e diferenciais para a cavidade broncoalveolar na lesão pulmonar aguda experimental .....	91
Gráfico 2. Efeito do tratamento com gamaterpineno (GT) no edema pulmonar na lesão pulmonar aguda experimental .....	92
Gráfico 3. Efeito do tratamento com gama terpineno (GT) no tecido pulmonar de animais com lesão pulmonar aguda.....	94
Gráfico 4. Efeito do tratamento com gamaterpineno (GT) na histologia pulmonar usando Tricômico de Gomori (TG) .....	95
Gráfico 5. Efeito do tratamento com GT nas concentrações de citocinas pro-inflamatórias no BALF de animais com Lesão Pulmonar Aguda (LPA).....	96
Gráfico 6. Efeito do tratamento com GT na expressão de moléculas sinalizadoras nas células do BALF de animais com Lesão Pulmonar Aguda (LPA) .....	98
Gráfico 7. Efeito do tratamento com GT nos sinais clínicos, espirro e fricção nasal nos animais com rinite alérgica experimental .....	99
Gráfico 8. Efeito do tratamento com gama terpineno (GT) na migração de células totais e diferenciais para a cavidade nasal na rinite alérgica experimental.....	101
Gráfico 9. Efeito do tratamento com GT no tecido da cavidade nasal de animais com rinite alérgica experimental.....	104
Gráfico 10. Efeito do tratamento com GT no teste do LCE na ansiedade nos animais com asma alérgica experimental .....	106
Gráfico 11. Efeito do tratamento com GT no teste PP na ansiedade nos animais com asma alérgica experimental .....	108
Gráfico 12. Efeito do tratamento com GT na expressão de c-fos no cérebro de animais com asma alérgica experimental .....	111
Gráfico 13. Efeito do tratamento com GT na migração de células inflamatórias para a cavidade broncoalveolar nos animais com asma alérgica experimental .....	113
Gráfico 14. Efeito do tratamento com GT no título de IgE OVA-específica.....	114

<b>Gráfico 15. Efeito do tratamento com GT no tecido pulmonar dos animais com asma alérgica experimental .....</b>	<b>117</b>
<b>Gráfico 16. Efeito do tratamento com GT na quantificação de citocinas na asma .....</b>	<b>119</b>
<b>Gráfico 17. Análise das populações celulares em citometria de fluxo na asma .....</b>	<b>121</b>
<b>Gráfico 18. Análise da expressão das quinases p38 e JNK nas células do lavado bronco alveolar de animais com asma alérgica experimental.....</b>	<b>123</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamento direcionado ao endotipo inflamatório perfil Th2 da asma. .....	53
Tabela 2. Grupos de camundongos BALB/c no protocolo de Lesão Pulmonar Aguda.....	69
Tabela 3. Disposição dos grupos animais na rinite.....	73
Tabela 4. Disposição dos grupos animais na asma. ....	76
Tabela 5. Núcleos cujos neurônios Fos-ir foram contados e suas respectivas correspondências de áreas de contagem com Paxinos e Franklin (2008) .....	79
Tabela 6. Parâmetros e scores do material biológico (pulmões e foças nasais) nas análises histológicas .....	85

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>AERD</b>	<i>Aspirin-exacerbated respiratory disease</i>
<b>AHR</b>	Hiperreatividade das vias aéreas
<b>AIE</b>	Asma induzida pelo exercício
<b>AIO</b>	Asma induzida pela obesidade
<b>AMPC</b>	3"5"- monofosfato de adenosina cíclico
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AP1</b>	Ativador de proteína 1
<b>APC</b>	Célula apresentadora de antígeno
<b>ARIA</b>	<i>Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma</i>
<b>AT</b>	Azul de toluidine
<b>B.A.</b>	Braços Abertos
<b>BALF</b>	Fuido do lavado broncoalveolar
<b>BFR</b>	Baixa Frequência Respiratória
<b>B220</b>	CD45R do linfócito B com peso de 220 Kda
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íons cálcio bivalente
<b>CCR</b>	Receptor para quimiocinas
<b>CD</b>	<i>Cluster differentiation</i>
<b>CD</b>	Celulas dendríticas
<b>CeA</b>	Núcleo central da amígdala
<b>cisLT</b>	Receptor cis-leucotrieno
<b>COX</b>	Ciclooxigenases
<b>cPGES</b>	Prostaglandina E sintetase citosólica
<b>CRTh2</b>	Receptor quimioatraente homólogo a molécula expressa em células Th2
<b>CRF</b>	Fator de liberação de corticotropina
<b>CTLA4</b>	Antígeno 4 do linfócito T citotóxico
<b>CysLT1R</b>	Receptor de cisteinil leucotrienos
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>d.C</b>	Depois de Cristo
<b>DC</b>	Célula dendríticas
<b>Dexa</b>	Dexametasona

<b>EHt</b>	Extrato de <i>Herissantia tiubae</i>
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintase endotelial
<b>EROS</b>	Espécies reativas do oxigênio
<b>FcεRI</b>	Receptor de alta afinidade pela região Fc da imunoglobulina E
<b>FeNO</b>	Fração exalada de óxido nítrico
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FOXP3</b>	<i>Forkhead Box P3</i>
<b>FR</b>	Frequência Respiratória
<b>FRD</b>	Frequência Respiratória Dominante
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
<b>GATA 3</b>	Proteína 3 ligante do GATA
<b>GT</b>	Gama-terpineno
<b>H1</b>	Receptor de histamina 1
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina eosina
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>i.m.</b>	Intramuscular
<b>i.p</b>	Intraperitoneal
<b>ICAM</b>	Molécula de adesão intercelular
<b>ICOS</b>	Co-estimulador induzível
<b>IFN-γ</b>	Interferon γ
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleucina
<b>ILC2</b>	Celulas linfóides inatas 2
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzível
<b>IRF3</b>	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
<b>JNK</b>	Kinase c-jun N-terminal
<b>KC</b>	Quimiocina derivada de queratinócito
<b>KCa</b>	Canais de K <sup>+</sup> dependentes de Ca <sup>2+</sup>
<b>LCE</b>	Labirinto em Cruz Elevado
<b>LPA</b>	Lesão pulmonar aguda
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LTD4</b>	Leucotrieno D4
<b>MAPKs</b>	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotática para monócitos-1

<b>MHC-II</b>	Complexo Maior de Histocompatibilidade classe II
<b>MIP-2</b>	Proteína Inibitória de Macrófagos 2
<b>MLCK</b>	Kinase da cadeia leve de miosina
<b>mPGES</b>	Prostaglandina E sintetase associada à membrana
<b>NALF</b>	Fluido do lavado nasal
<b>NAR</b>	Rinite não-alérgica
<b>NAS</b>	Sulfato de amônio e níquel
<b>NF-kB</b>	Fator nuclear kappa potencializador de cadeia leve
<b>NFAT1</b>	Fator de ativação nuclear da célula T
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OVA</b>	Ovalbumina
<b>PAF</b>	Fator de ativação plaquetária
<b>PAS</b>	Ácido periódico de Schiff
<b>PBS</b>	Tampão fosfato de sódio
<b>PCA</b>	Anafilaxia cutânea passiva
<b>PFE</b>	Pico de fluxo expiratório
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PGD2</b>	Prostaglandina D 2
<b>PP</b>	Placa perfurada
<b>PRR</b>	Receptores de reconhecimento de padrão
<b>PVN</b>	Núcleo paraventricular do hipotálamo
<b>RA</b>	Rinite alérgica
<b>RANTES</b>	<i>Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
<b>ROR<math>\gamma</math>t</b>	Fator de transcrição receptor do ácido retinóico relacionado ao receptor órfão $\gamma$ t
<b>ROR<math>\alpha</math></b>	Fator de transcrição receptor do ácido retinóico relacionado ao receptor órfão $\alpha$
<b>SAPK</b>	<i>Stress-activated protein kinases</i>
<b>s.c.</b>	Subcutâneo
<b>SDRA</b>	Síndrome do desconforto respiratório agudo
<b>SI</b>	Sistema imune
<b>SN</b>	Sistema nervoso
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SP</b>	Substância P
<b>STAT</b>	<i>Signal transducer and activator transcription</i>

<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>TG</b>	Tricômico de Gomori
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Fator de transformação de crescimento $\beta$
<b>Th</b>	Linfócito t <i>helper</i>
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>Treg</b>	Linfócito T regulatório
<b>TSLP</b>	Linfopoietina do estroma tímico
<b>VIP</b>	Peptídeo intestinal vasoativo
<b>v.o.</b>	Via oral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>1.1 Inflamação Aguda</b> .....	<b>27</b>
<b>1.2 Lesão Pulmonar Aguda</b> .....	<b>28</b>
<b>1.3 Inflamação Crônica</b> .....	<b>30</b>
<b>1.3.1 Rinite</b> .....	<b>31</b>
<b>1.3.2 Rinite e Asma</b> .....	<b>34</b>
<b>1.3.3 Asma</b> .....	<b>35</b>
<b>1.3.3.1. Fenótipos da Asma</b> .....	<b>40</b>
<b>1.3.3.2 Asma: Participações de Diversas Células</b> .....	<b>46</b>
<b>1.3.4 Farmacoterapias na Asma</b> .....	<b>51</b>
<b>1.3.5 Psiconeuroimunologia</b> .....	<b>54</b>
<b>1.3.6 Óleos Essenciais e Monoterpenos</b> .....	<b>60</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>64</b>
<b>2.1 Geral</b> .....	<b>64</b>
<b>2.2 Específicos</b> .....	<b>64</b>
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>67</b>
<b>3.1 Substâncias, sais, aparelhos e equipamentos</b> .....	<b>67</b>
<b>3.2 Animais</b> .....	<b>67</b>
<b>3.3 Condições Experimentais</b> .....	<b>67</b>
<b>3.4 Preparo do Gama-Terpineno</b> .....	<b>68</b>
<b>3.5 Protocolos Experimentais</b> .....	<b>68</b>
<b>3.5.1 Lesão Pulmonar Aguda (LPA)</b> .....	<b>68</b>
<b>3.5.1.1 Grupos Experimentais</b> .....	<b>69</b>
<b>3.5.1.2 Contagem de células Totais e Diferenciais no BALF no protocolo de Lesão Pulmonar Aguda</b> .....	<b>70</b>

3.5.1.3	Quantificação de Proteínas Totais e Taxa de Pulmão Úmido/Seco (U/S).....	70
3.5.2	Rinite alérgica experimental .....	71
3.5.2.1	Grupos Experimentais .....	72
3.5.2.2	Sinais Clínicos.....	73
3.5.2.3	Coleta do Fluido do Lavado Nasal (NALF).....	73
3.5.2.4	Contagem Total e Diferencial de Células do NALF .....	73
3.5.3	Inflamação pulmonar alérgica experimental – protocolo de asma experimental .....	75
3.5.3.1	Grupos Experimentais .....	75
3.5.3.2	Análise Comportamental .....	76
3.5.3.3	Análise de c-fos no tecido cerebral.....	78
3.5.3.4	Coleta de sangue e obtenção do soro .....	80
3.5.3.5	Coleta do Fluido do Lavado Pulmonar (BALF).....	81
3.5.3.6	Quantificação das citocinas no BALF.....	81
3.5.3.7	Citometria de Fluxo .....	82
3.5.4	Coleta dos pulmões (asma experimental) e cabeças (rinite experimental) para as análises histológicas .....	83
3.6	RESUMO DAS METODOLOGIAS .....	87
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	88
4.	RESULTADOS .....	90
4.1	Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) na migração de células inflamatórias para a cavidade broncoalveolar de animais com Lesão Pulmonar Aguda (LPA).....	90
4.1.1	Quantificação de proteínas e medida do peso pulmonar dos animais com lesão pulmonar aguda .....	91
4.1.2	Efeito do GT no tecido pulmonar de animais com Lesão Pulmonar Aguda (LPA), analisado por técnicas histológicas .....	92
4.1.3	Quantificação de citocinas no lavado broncolaveolar de animais com Lesão Pulmonar Aguda (LPA) .....	95

4.1.4. Análise da expressão de moléculas sinalizadoras nas células do BALF, por Citometria de Fluxo, de animais com Lesão Pulmonar Aguda (LPA).....	96
4.2 Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) nos sinais clínico na Rinite alérgica experimental .....	98
4.2.1 Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) na migração de células inflamatórias para a cavidade nasal de animais com Rinite alérgica experimental .....	99
4.2.2 Análise histológica do tecido da região nasal dos animais com rinite alérgica experimental e tratados com o gama-terpineno .....	101
4.3 Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) na inflamação pulmonar crônica.....	104
4.3.1 Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) no comportamento dos animais no protocolo experimental de asma alérgica .....	105
4.3.2 Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) na expressão da proteína c-fos no cérebro dos animais no protocolo experimental de asma alérgica.....	108
4.3.3 Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) na migração de células inflamatórias para a cavidade broncoalveolar nos animais com asma alérgica experimental .....	111
4.3.4 Efeito do tratamento com GT na produção de IgE-OVA específica em animais com asma alérgica experimental.....	113
4.3.5 Efeito do tratamento com GT no tecido pulmonar em animais com asma alérgica experimental .....	114
4.3.6 Efeito do tratamento com GT na produção de citocinas por células presentes no lavado broncoalveolar dos animais com asma alérgica experimental .....	117
4.3.7 Efeito do tratamento com GT no perfil de células presentes na cavidade pulmonar em animais com asma alérgica experimental .....	120
4.3.8 Efeito do tratamento com GT na expressão de moléculas sinalizadoras em células do lavado bronco alveolar de animais com asma alérgica experimental .....	122

<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>125</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>146</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>151</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>174</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>175</b>

# *INTRODUÇÃO*

## 1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta fisiológica protetora e intensamente regulada, gerada por estímulos nocivos, tais como agentes patogênicos, células potencialmente cancerígenas, células mortas ou injúria tecidual (MEDZHITOV, 2010; GUO et al., 2015; KOTAS; MEDZHITOV, 2015).

O primeiro pesquisador a definir os sinais clínicos da inflamação foi o médico romano Cornélio Celsus. No século 1 d.C., Celsus observou que durante o processo inflamatório, o microambiente sofre diversas alterações as quais ficaram conhecidas como os quatro sinais cardinais clínicos da inflamação: calor, rubor, edema e dor. Os mecanismos fisiológicos dos quatro sinais cardinais da inflamação foram descritos por Augustus Waller (1846) e Júlio Conheim (1867), que evidenciaram que a resposta inflamatória aguda é caracterizada por uma intensa migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para o sítio inflamatório, além de outras alterações vasculares e tendo como participantes diferentes células e mediadores (MEDZHITOV, 2010; GUO et al., 2015; KOTAS; MEDZHITOV, 2015). No entanto, o quinto sinal cardinal, perda da função, foi adicionado por Rudolph Virchow, 18 séculos depois, em 1858, em seu livro *Cellular Pathologie* (MEDZHITOV, 2010).

Os eventos inflamatórios podem ser divididos em padrões agudo e crônico. A inflamação é considerada aguda quando apresenta duração relativamente curta e é auto limitada podendo durar minutos, horas ou alguns dias, caracterizada por vasodilatação, exsudação de líquido plasmático rico em proteínas e migração de células para o local da lesão. Já a inflamação crônica apresenta maior tempo de duração e está histologicamente associada à presença de linfócitos e de macrófagos, angiogênese (proliferação de vasos sanguíneos), fibrose e necrose tecidual (SHERWOOD, E. R; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Uma grande variedade de eventos, incluindo danos mecânicos, infecções, lesões químicas, queimaduras, radiação e injúria tecidual, podem induzir a inflamação aguda (SCHMID-SCHONBEIN, 2006), a qual tem um papel fisiológico importante na defesa do hospedeiro levando ao processo de reparo tecidual, que pode ser regeneração ou cicatrização

resultando na homeostasia tecidual. Porém, quando esse processo é exacerbado pode haver lesão tecidual e esta evoluir para um processo crônico, podendo ocasionar várias doenças, como: doenças pulmonares, cardiovasculares, neurológicas, diabetes, câncer, entre outras (PORTH, 2010). Para que isto não ocorra, é necessário controlar o processo inflamatório à tempo, pela eliminação ou parada dos eventos que acontecem nesse processo, como o infiltrado celular que geram produtos potencialmente tóxicos e a vasodilatação.

### **1.1 Inflamação Aguda**

O processo inflamatório agudo é iniciado a partir da ativação de células teciduais (macrófagos) e migratórias (neutrófilos). Células fagocíticas incluindo macrófagos teciduais, neutrófilos e monócitos circulantes desenvolvem importante papel na resposta inflamatória aguda. Estas células produzem os mediadores pró-inflamatórios (MATZINGER, 1994), os quais atuam localmente e/ou sistematicamente colaborando para o aparecimento dos sinais cardinais característicos do processo inflamatório agudo, os quais podem ser acompanhados ou não da perda de função do tecido ou órgão afetado (ROCHA e SILVA, 1994). Estes, são gerados no local da lesão tais como, o Fator de Necrose Tumoral ( $TNF-\alpha$ ), a Interleucina-1beta ( $IL-1\beta$ ), prostaglandinas (PGs) e leucotienos (LT), cininas e componentes intracelulares, como o ATP (trifosfato de adenosina), além de citocinas, tais como interferon- $\gamma$  ( $IFN-\gamma$ ), IL-6, IL-12, entre outras. (VESTWEBER, 2015).

Os vários mediadores inflamatórios normalmente atuam restringindo as consequências e a extensão do dano tecidual, induzindo somente os sinais cardinais localmente. Entretanto, dependendo da persistência e/ou intensidade da lesão, alguns mediadores podem difundir-se e mediar sinais e sintomas sistêmicos como febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda, leucocitose, ativação do sistema complemento, aumento da produção de glicocorticoides, alterações metabólicas e das concentrações plasmáticas de metais como ferro, cobre e zinco. Esta resposta sistêmica é denominada reação de fase aguda e nessas situações pode-se observar que o sistema

nervoso central e imune estão funcionalmente conectados e integrados, já que nessa fase as citocinas produzidas no sítio inflamatório interagem com o sistema nervoso central, gerando por exemplo, febre, a qual é resultante da ação de citocinas como a IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$  no hipotálamo (MOON et al., 2014).

## **1.2 Lesão pulmonar aguda**

A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma síndrome inflamatória de insuficiência respiratória aguda, resultante de uma variedade de lesões no parênquima dos pulmões, que se não tratada pode levar a forma mais grave da doença denominada síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (MATTHAY; ZEMANS, 2011; HU et al., 2017). A taxa de mortalidade em pacientes com LPA/SDRA é de aproximadamente 40%, por não haver medicações eficazes para esta doença (PHUA et al., 2009; SPRAGG et al., 2010; HU et al., 2017).

Doenças infecciosas, como pneumonia e sepse, são as principais causas da LPA, que podem gerar uma insuficiência respiratória persistente e dependência prolongada de ventilação mecânica, fatores que aumentam a suscetibilidade à disfunção de múltiplos órgãos, como também podem levar a morte (D'ALESSIO et al., 2009).

O epitélio alveolar contém dois tipos de células. As células planas do tipo I que constroem a estrutura da parede alveolar, e representam 20% das células epiteliais, mas cobrem 80% da área de superfície alvéolos. As células cúbicas tipo II, que respondem por 80% das células alveolares, essas células secretam moléculas surfactantes que diminuem a tensão superficial e regulam o equilíbrio de fluidos no epitélio alveolar. As células alveolares tipo II podem regenerar as células do tipo I após um processo de lesão (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011).

Estudos em animais revelaram que a lesão endotelial aparece dentro de minutos a horas após a indução da LPA e resulta em lacunas intercelulares do endotélio. A formação de lacunas intercelulares pode ser considerada como a base para o aumento da permeabilidade microvascular (MATUTE-BELLO et al.,

2008). A lesão epitelial leva a transporte de fluido e células e consequentemente a formação de edema pulmonar. Além disso, a contribuição de lesão epitelial à progressão da LPA para a SDRA tem se tornado cada vez mais evidente.

O edema pulmonar e as lesões endotelial e epitelial são acompanhados por um intenso influxo de neutrófilos para o interstício e espaço broncoalveolar. A ativação e transmigração dos neutrófilos desempenham um papel fundamental na progressão da LPA e SDRA (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011). A prova da importância dos neutrófilos na LPA tem sido demonstrada a partir de dados clínicos e em modelos animais. Análises histopatológicas demonstraram que a LPA, em humanos, é caracterizada por uma resposta inflamatória aguda nos pulmões e alveolite neutrofílica (WARE; MATTHAY, 2000; MEI et al., 2007). A fase final da doença pode resultar em recuperação ou morte. A morte geralmente está associada com o desenvolvimento da falência múltipla dos órgãos. O sucesso da resolução da doença pode estar relacionado às mudanças nas características histológicas dos alvéolos. Os neutrófilos são substituídos por macrófagos alveolares, e ocorre repopularização epitelial, reabsorção do fluido alveolar, limpeza dos resíduos de proteínas associadas ao influxo do edema observado na fase exsudativa, e finalmente na resolução de fibrose (ADENIJI; STEEL, 2012; ANGUS, 2012).

O lipopolissacarídeo (LPS) presente em paredes de bactérias Gram (-) induz, em modelos animais, sintomas que se assemelham a LPA em humanos, sendo uma importante ferramenta para explorar estratégias de tratamentos e desvendar mecanismos inflamatórios na LPA (MEI et al., 2007; XU et al., 2008; MUNOZ et al., 2009). Na LPA, a ligação do LPS aos TLRs (Receptores do tipo *toll*) presentes em células pulmonares inicia a inflamação pulmonar aguda (MATTHAY et al., 2012). As citocinas e quimiocinas são secretadas a partir do epitélio pulmonar e estimulam os macrófagos alveolares a iniciar o recrutamento dos neutrófilos nos espaços aéreos através da barreira alvéolo-capilar (THORLEY et al., 2007; LI et al., 2011; BHATIA et al., 2012). Os neutrófilos ativados liberam uma variedade de mediadores, incluindo proteases, EROS (espécies reativas ao oxigênio), histonas e peptídeos, os quais causam lesões no endotelial vascular e no epitélio alveolar (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011). O consequente aumento da permeabilidade da barreira alvéolo-capilar

leva ao acúmulo de fluido extravascular rico em proteínas (KROPSKI et al., 2009). O rompimento da capacidade para remoção de líquidos e produção de surfactante devido a lesão epitelial pulmonar também agrava o edema pulmonar (WARE; MATTHAY, 2001).

Os neutrófilos são células importantes para o desenvolvimento da patogênese da LPA e a IL-8 (CXCL8) tem sido indicada como o principal fator quimiotático para neutrófilos no fluido de pulmão de pacientes com LPA/SDRA (AZOULAY et al., 2002; PALLISTER et al., 2002; BAO et al., 2010). A IL-8 pode aumentar a atividade de migração de neutrófilos e induzir a migração através da barreira alvéolo-capilar, resultando numa acumulação de neutrófilos nos espaços alveolares (BAO et al., 2010).

Apesar da extensa investigação destinada ao diagnóstico e o tratamento das reações patogênicas iniciais na LPA, terapias específicas ainda não foram identificadas (CEPKOVA; MATTHAY, 2006; RAGHAVENDRAN et al., 2008). Portanto, o investimento e realização de novas terapias devem ser intensificadas.

### **1.3 Inflamação Crônica**

O termo crônico refere-se a tempo (cronologia), significando que a inflamação é de longa duração e acontece dentro de semanas ou meses.

Entendemos que a inflamação pode ser definida como o conjunto de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas em resposta a estímulos agressivos ao organismo. Na resposta de fase aguda, que ocorre logo após a agressão, há aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, com recrutamento de leucócitos no foco da lesão e liberação de mediadores inflamatórios. A transição para a fase crônica é caracterizada pelo desenvolvimento da resposta humoral específica e da resposta imune celular. Embora possa suceder a inflamação aguda, a inflamação crônica, com frequência, começa de maneira insidiosa, como resposta de baixo grau, latente e, muitas vezes, assintomática (KHOVIDHUNKIT et al., 2004; KUMAR et al., 2004).

Tanto na resposta de fase aguda quanto na crônica, mediadores inflamatórios agem de maneira local ou sistêmica, ativando outras células envolvidas com o processo inflamatório (células endoteliais, fibroblastos e células do sistema fagocítico mononuclear), ampliando, assim, a resposta inicial ao agente lesivo, podendo promover a formação de abscessos e fibrose, como observado em várias doenças pulmonares, incluindo asma e DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica). Além disso, um processo inflamatório exacerbado contra substâncias, que para a maioria das pessoas são inócuas, pode levar a uma inflamação alérgica crônica. As doenças alérgicas mais comuns são: rinite, asma, alergia alimentar, dermatite atópica e o angioedema (HOLGATE e POLOSA, 2008).

### **1.3.1 Rinite**

A rinite alérgica (RA) se caracteriza por ser uma inflamação das vias aéreas superiores, especificamente da mucosa. Esse processo inflamatório tem como sintomas: congestão nasal, rinorréia, espirros, coceira e prurido nasal (NG & WANG, 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS), estima que cerca de 25% da população mundial seja portadora de rinite alérgica (PAHO, 2015), afetando cerca de 500 milhões de pessoas no mundo (GOMÉZ et al., 2015)

A RA é uma doença que promove um impacto negativo na vida social, no desempenho escolar e na produtividade do trabalho dos pacientes, além de elevar os custos com essa doença no país (GOMÉZ et al., 2015). Geralmente a RA está associada a outras doenças, tais como: conjuntivite alérgica, rinossinusite e especialmente a asma (GOMÉZ et al., 2015).

Na RA a ligação dos anticorpos específicos do tipo IgE, presentes na membrana basal de células como mastócitos, aos seus antígenos na mucosa nasal resulta no processo inflamatório local, promovendo assim a expressão clínica da doença com sintomas como: coriza, espirros, obstrução nasal e prurido (BOUSQUET et al., 2008). Trata-se da forma mais comum de rinite, a qual acomete mais de 100 milhões de pessoas na Europa e cerca de 60

milhões nos Estados Unidos (HANKIN et al., 2014), contudo não há relatos da prevalência dessa doença em adultos no Brasil.

A RA constitui um sério fator de risco para a asma além de estar associada a doenças crônicas como a rinosinusite, como mencionado anteriormente (HENS et al., 2008). Além dos sintomas clássicos, o impacto geral da rinite em executar tarefas diárias bem como o desvio comportamental, psicológico e a deficiência em executar tais tarefas não devem ser subestimados (LEDFOORD, 2003; MELTZER et al., 2012).

A rinite pode ser o resultado de etiologias diversas, mais comumente por infecções ou respostas alérgicas imediatas, porém outros desencadeantes podem promover o surgimento da rinite, incluindo: medicamentos, desequilíbrio hormonal e disfunção neuronal. A rinite é classicamente dividida em 3 grandes fenótipos clínicos: a.) rinite alérgica (RA), b.) rinite infecciosa e c.) rinite não-alérgica e não infecciosa (NAR), com a possibilidade de combinações (ROBERTS et al., 2013; MURARO et al., 2016).

Os fenótipos de rinite foram descritos em relação à gravidade e duração e principais sintomas, padrão de apresentação, sensibilização, presença de comorbidades e nível de controle depois do tratamento. Os fenótipos de rinite têm sido a base para o tratamento baseados em evidências (MURARO et al., 2016). Além dos fenótipos, há a necessidade de caracterizar os endotipos, pois uma porcentagem significativa de pacientes com RA têm doença descontrolada (HELLINGS et al., 2013), ressaltando na necessidade de tratamento específico e eficaz para estes pacientes com RA. Afim de obter maior precisão houve a necessidade de categorizar os pacientes com RA em endotipos e deve ser enfatizado que pacientes com rinite podem ter um endotipo complexo e que a compreensão atual dos processos celulares e moleculares requer um estudo mais aprofundado (MURARO et al., 2016).

Os endotipos podem ser:

a.) Rinite tipo Th2

Este endotipo é também denominada RA. Na primeira exposição ao alérgeno através do epitélio, células dendríticas (CD) capturam este alérgeno, processam e apresentam nos órgãos linfoides, via complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II) a linfócitos inicialmente virgens ou Th0, os quais irão diferenciar-se em linfócitos Th2, com o auxílio de moléculas co-

estimulatórias CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) (LLOYD et al., 2001). Em adição, a diferenciação de células Th2 é favorecida pelo próprio epitélio, que expressa receptores (ICAM e VCAM) e é, portanto, ativado pelo alérgeno, liberando citocinas como a interleucina (IL)-25, IL-33 e a linfopoetina do estroma tímico (TLSP). As células Th2, sob influência das citocinas IL-4 e IL-13 promovem a ativação do linfócito B em plasmócito produtor de IgE e IgG1 (Imunoglobulina E ou G1) específica ao alérgeno sensibilizante (WILLS-KARP, 1998). Esta IgE ou IgG1 ligam-se a receptores de alta afinidade em mastócitos dos tipos Fc $\epsilon$ RI ou Fc $\gamma$ RI respectivamente, sensibilizando essas células. Contatos subsequentes do mesmo alérgeno com a submucosa, promovem uma ligação cruzada entre o alérgeno e as IgE/IgG1 presentes na superfície dos mastócitos e basófilos, através de uma reação antígeno-anticorpo, provocando a desgranulação destas células e a liberação de mediadores pré-formados (histamina) e derivados dos fosfolípidicos de membrana (serotonina, leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos, fator de ativação plaquetária (PAF)), capazes de causar inflamação (MURARO et al., 2016; GINA 2017). Isso geralmente é acompanhado por uma resposta imune sistêmica dominada por citocinas do tipo 2 produzidas por células TCD4<sup>+</sup>, associado também a uma eosinofilia nasal (BENTLEY et al., 1992).

#### b.) Rinite tipo Th1

Uma resposta imune inata e adaptativa do tipo 1 ou Th1/IL-17 leva a influxo de neutrófilos e células TCD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , geralmente ocorre na rinite infecciosa (WANG et al., 2013; GINA 2017).

#### c.) Rinite Neurogênica

Este endotipo em particular é caracterizado por um aumento na expressão de canal potencial de receptor transiente (TRP) no nervo trigêmeo e altas concentrações de substância P, bem como neurocininas. Este endotipo está ligado à rinite gustativa, rinite dos idosos e rinite idiopática com hiperreatividade nasal (VAN GERVEN et al., 2014; GINA 2017).

#### d.) Disfunção epitelial

A disfunção epitelial pode ser primária ou secundária tanto a inflamação da rinite tipo Th2, como da rinite tipo Th1. Pode também ser dividida na via da disfunção ciliar (primário versus secundário) e a via da disfunção na barreira (STEELANT et al., 2016). Vários outros fenótipos de rinite, como drogas, senis,

e rinite hormonal, são mal caracterizados por falta de biomarcadores e de mecanismos moleculares e celulares envolvidos. Na prática clínica, os esforços na caracterização podem ser feitos em pacientes com rinite medindo-se os níveis de IgE total e averiguando alérgenos específicos.

O tratamento atual desta doença envolve a prevenção do contato com o alérgeno, o que muitas vezes é difícil e impraticável. Para prevenir ou reduzir os sintomas de RA, vários medicamentos são utilizados na clínica medica tais como corticosteroides, anti-histamínicos, descongestionantes, anticolinérgicos e antagonistas dos receptores de leucotrienos. Poucos destes, no entanto, permitem o alívio completo dos sintomas sem complicações. Além disso, esses medicamentos geralmente requerem administração frequente uma ou duas vezes por dia por um período de tempo relativamente longo, interferindo assim na qualidade de vida dos pacientes (AOISHI et al., 2015; GINA 2017).

### **1.3.2 Rinite e Asma**

Em 2012 foi publicada a ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*), um estudo que confirmou a relação entre a rinite e a asma, identificada há dois séculos atrás (BUSQUET et al., 2012). No entanto, antes do estudo ARIA, a asma e sua comorbidade com a rinite era desconsiderada (CRUZ et al., 2007). A maioria dos pacientes com asma (asma alérgica e não alérgica) também possuem rinite, enquanto 10% a 40% dos pacientes com RA possuem comorbidade na asma (CRUZ et al., 2007). Alguns estudos sugerem que a asma é mais comum em pacientes com rinite persistente de moderada a grave do que aqueles com os outros tipos de rinite. Existem fortes interações entre asma e rinite devido a ambientes ocupacionais (MOSCATO et a., 2008).

A rinite geralmente não é o primeiro sintoma em crianças pré-escolares durante a sua marcha atópica. No entanto, a rinite em indivíduos sem asma é um fator de risco para asma em adultos (SHAABAN et al., 2007; ROCHAT et al., 2010). Na idade adulta, o desenvolvimento de asma em pacientes com rinite é frequentemente independente da alergia, (SHAABAN et a., 2008) enquanto que na infância, frequentemente está associado a alergia (ROCHAT et al., 2010).

### 1.3.3 Asma

A asma é uma das doenças inflamatórias crônicas mais comuns que afeta cerca de 300 milhões de pessoas no mundo sendo a sua prevalência duplicada a cada década (LAMBRECHT et al. 2015), com consequências negativas para os indivíduos e sociedade. Tais consequências, como dias e custos decorrentes de hospitalizações, ocasionam impacto econômico e social para o país.

No Brasil a asma atinge 6,4 milhões de brasileiros acima de 18 anos, tendo uma prevalência de 39% a mais entre o sexo feminino. Em 2014, foram registradas 105,5 mil internações pela doença originando um custo de R\$ 57,2 milhões para a rede pública de saúde (BRASIL, 2015).

A taxa média de mortalidade no país, entre 1998 e 2007, foi de 1,52/100.000 habitantes (variação, 0,85-1,72/100.000 habitantes), com estabilidade na tendência temporal desse período (SBPT, 2012). Essa taxa vem decrescendo e em 2010 atingiu 0,44 mortes/100.000 habitantes (LOTUFO, 2012).

Esta redução pode ter ocorrido devido a maiores conhecimentos sobre a doença por médicos e pacientes, bem como à implementação de políticas públicas pelo governo, as quais oferecem corticosteroides inalatórios, entre outras medicações, para pacientes com asma grave. Este programa reduziu os custos relacionados com a asma ao Sistema Único de Saúde (SUS) em relação às hospitalizações (SOUZA-MACHADO et al., 2010; SOLÉ et al., 2017). No entanto, a asma ainda é uma das 20 razões mais comuns para visitas a hospitais no Brasil, representando a terceira principal causa de hospitalização dentro do SUS (CRUZ et al., 2012; SOLÉ et al., 2017).

Uma análise individual para cada centro de atendimento revelou que todos os pacientes com diagnóstico médico de asma em São Paulo foram tratados com agonistas beta 2 de curta ação e corticosteroides orais, enquanto 22% desses pacientes receberam corticosteroides inalados como uma forma de tratamento anti-inflamatório, revelando insuficiência no tratamento para esses pacientes (CAVALCANTI et al., 2014; SOLÉ et al., 2017).

O nível de controle da asma, a gravidade da doença e os recursos médicos utilizados por asmáticos brasileiros são pouco documentados. Em um estudo, observou-se que o custo direto da asma (utilização de serviços de saúde e medicações) foi o dobro entre pacientes com asma não controlada que aqueles com asma controlada, sendo a falta de controle da asma o maior componente relacionado à utilização dos serviços de saúde. Entretanto, o gasto direto relacionado às medicações foi maior entre os portadores de asma controlada, sendo que 82,2% desses utilizavam regularmente corticoides inalatórios. O custo da asma aumenta proporcionalmente com a gravidade da doença. O custo indireto (número de dias perdidos de escola e trabalho) foi superior no grupo com asma não controlada (MILLER et al., 2005). Além disso, o difícil acesso a serviços médicos, o preço das medicações e falta de informação da população afetada torna a situação ainda mais complicada (RAMOS et al., 2006).

Recentemente Stirbulov e colaboradores (2016) mostraram que o governo tem feito grande esforço para melhorar os índices de crises de asma, ao fornecer acesso a medicamentos para pacientes de famílias de baixa renda, através de programas como: "Farmácia Popular do Brasil (2004)", "Aqui tem Farmácia Popular (2006)" e "Saúde Não Tem Preço (2011)", em que os pacientes podem adquirir medicamentos para asma com preços diferenciados ou até mesmo grátis. Porém, apesar de todos esses avanços, a asma continua a ser um problema de saúde pública no Brasil. Nos últimos cinco anos, essa condição foi responsável por aproximadamente 2.500 mortes por ano, o que significa haver 7 mortes por dia (BRASIL, 2015).

Há registros de que a prevalência da asma esteja aumentando em todo o mundo, inclusive no Brasil, tendo em vista o agravamento dos fatores causais (poluição) e o crescente número de publicações científicas com estudos epidemiológicos (GERGEN, 2001; STRIBULOV et al., 2009). Muitos fatores têm contribuído para o aumento da prevalência da asma brônquica, tais como, o aumento da poluição atmosférica e a rápida modernização. O aumento da urbanização explica em parte, a modificação na tradicional baixa incidência da asma nos países subdesenvolvidos (RAMOS et al., 2006).

Alguns estudos relatam que a exposição a determinados antígenos durante a infância pode estar relacionada à proteção contra a asma (RIEDLER

et al., 2001; EGE et al., 2007). Porém, os mecanismos envolvidos nessa proteção ainda não estão claramente definidos (MUTIUS; VERCELLI, 2010), sendo a etiologia da asma multifatorial, uma vez que podem estar envolvidos tanto fatores genéticos que predisõem o indivíduo à doença, quanto os fatores ambientais como poluição atmosférica, fumo e exposição à poeira (SOUSA, 2011).

A asma afeta todas as idades, porém com maior magnitude em crianças e adolescentes, podendo os sintomas variar quanto à gravidade e frequência. É relatada também uma maior incidência de crises de asma no período noturno e na realização de atividades físicas (BOUSQUET et al., 2005).

Durante uma crise de asma, a mucosa dos brônquios intumescce, resultando em estreitamento das vias aéreas e redução do fluxo de ar para dentro e para fora dos pulmões e conseqüente falta de ar. A falta de ar retrata uma das principais condições dos asmáticos, pois afeta não apenas a respiração, mas produz outras complicações como a insônia, promovendo a fadiga diurna e níveis reduzidos de atividade. Esse quadro tem um significativo impacto na qualidade de vida desses indivíduos, sendo o responsável por absentismos escolares e no trabalho.

A asma é um problema de saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, tanto pelo fato de apresentar tratamentos apenas sintomáticos e não curativos, quanto por ser uma doença sub-diagnosticada.

Estima-se que entre 20 a 30% das pessoas que, apesar de apresentarem sintomas graves característicos, não sejam diagnosticadas corretamente, causando conseqüências substanciais à saúde, por não receberem o tratamento adequado (STRIBULOV et al., 2016). Além disso, o sub-diagnóstico e o sub-tratamento da asma são, indubitavelmente, os responsáveis ou corresponsáveis por grande parte das hospitalizações pediátricas, sendo, em alguns casos, o intervalo entre a primeira visita ao médico por sintomas respiratórios e o estabelecimento do diagnóstico de asma de 16 consultas ou três anos. O atraso no diagnóstico da asma na criança resulta em agravamento dos sintomas, tensão entre os familiares e aumento dos custos com o tratamento (STRIBULOV et al., 2016).

De acordo com GINA (2017), o diagnóstico clínico da asma é sugerido por um ou mais sintomas, como dispneia, tosse crônica, sibilância, opressão ou

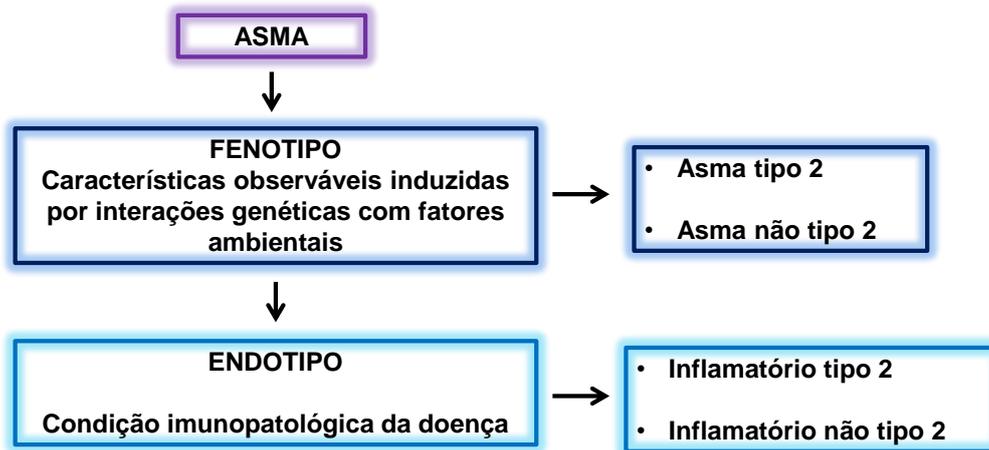
desconforto torácico, sobretudo à noite ou nas primeiras horas da manhã. As manifestações que sugerem fortemente o diagnóstico de asma são a variabilidade dos sintomas, o desencadeamento de sintomas por irritantes inespecíficos (como fumaças, odores fortes e exercício) ou por aeroalérgenos (como ácaros e fungos), a piora dos sintomas à noite e a melhora espontânea ou após o uso de medicações específicas para asma (WENZEL et al., 2016).

O exame físico do asmático geralmente é inespecífico. A presença de sibilos é indicativa de obstrução ao fluxo aéreo; contudo, pode não ocorrer em todos os pacientes. Embora o diagnóstico clínico da asma em sua forma clássica (asma alérgica) de apresentação não seja difícil, a confirmação deve ser feita por um método objetivo, uma vez que os sinais e sintomas da asma não são exclusivos dessa condição. Os testes diagnósticos disponíveis na prática clínica incluem espirometria (antes e após o uso de broncodilatador), testes de broncoprovocação e medidas seriadas de Pico de Fluxo Expiratório (PFE). Em certos casos, a comprovação da reversibilidade da obstrução ao fluxo aéreo pode ser demonstrada apenas com o teste terapêutico com corticoide oral (GINA, 2017).

A asma foi considerada uma única doença durante anos. Sua tradicional definição de hiperresponsividade brônquica das vias aéreas tornou-se muito ampla e inespecífica, uma vez que estudos recentes abordam sua heterogeneidade, promovendo o conceito de que a asma pode apresentar vários fenótipos e endotipos (WENZEL, 2006).

Fenótipo é definido como o agrupamento das características observáveis de um organismo, os quais resultam da interação de fatores genéticos com o meio ambiente. Essas características observáveis são: resposta IgE-específica a alérgeno-específicos e funções pulmonares (WENZEL, 2006). Os endotipos da asma, por sua vez, abrangem os mecanismos celulares e moleculares subjacentes as características de doenças observáveis, ou seja, a imunopatologia (LÖTVALL; et al., 2011; AGACHE, 2012). A asma é, portanto, cada vez mais vista como uma síndrome em vez de uma única doença (WENZEL, 2012; WU et al., 2014). Atualmente, os fenótipos da asma compreendem asma tipo 2 e asma não tipo 2 enquanto os endotipos compreendem: inflamatório tipo 2 ( $Th2^{hi}$ ) e não tipo 2 ( $Th2^{lo}$ ) (WENZEL et al., 2016) (Figura 1).

Figura 1. Esquema demonstrando os fenótipos e endotipos da asma e seus grupos.

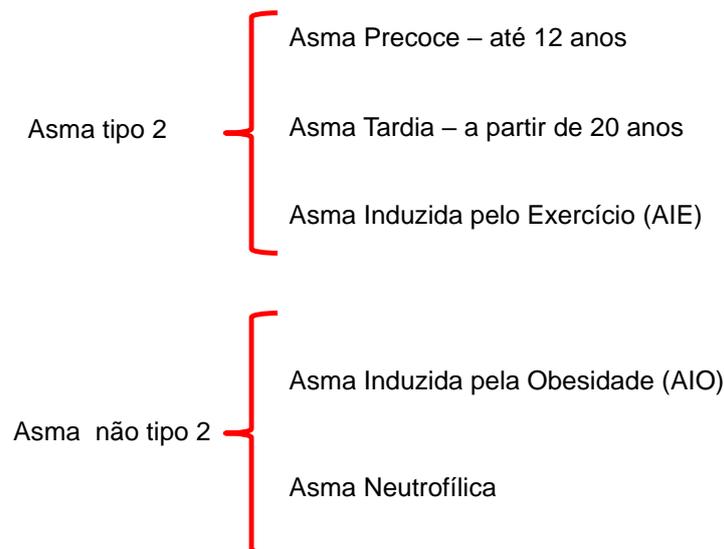


A asma é caracterizada de acordo com os fenótipos, que são as características observáveis, os quais podem ser de dois tipos: asma tipo 2 ou não tipo 2. O endotipo também pode ser classificado de duas formas: inflamatório tipo 2 ou não tipo 2, caracterizando os mecanismos patológicos da doença. Autoria própria.

Os endotipos diferem em termos de susceptibilidade genética, fatores de risco ambientais, idade de início, apresentação clínica, prognóstico e resposta a terapias padrão e novas (WU et al., 2014; WENZEL 2012; WU et al., 2014).

Os fenótipos da asma compreendem vários tipos como demonstrado na figura abaixo:

Figura 2. Representação esquemática dos fenótipos da asma.



Classificação dos fenótipos da asma tipo 2 em: asma precoce, tardia ou induzida por exercício e não tipo 2 em: asma induzida por obesidade ou neutrofílica.

### 1.3.3.1. Fenótipos da Asma

A classificação dos diversos fenótipos na asma deu início nas décadas atrás com os conceitos de asma extrínseca (alérgica) e intrínseca (não alérgica) (RACKEMANN, 1947). Indivíduos com asma extrínseca apresentavam a doença no início da vida e eram caracterizados atópicos (produzem IgE-específica à alérgenos). Por outro lado, asma intrínseca estava relacionada a indivíduos que desenvolviam a doença mais tarde na vida (após 40 anos de idade) e estava relacionada com a exposição à aspirina (*“aspirin-exacerbated respiratory disease - AERD*), mas não com a sensibilização alérgica (WENZEL, 2006). Porém com a publicação de alguns trabalhos realizados em humanos que demonstravam que os níveis de citocinas Th2 eram semelhantes na asma extrínseca e intrínseca, essa distinção não foi mais aceita (HUMBERT et al., 1996; HUMBERT et al., 1999; GINA, 2008).

#### a) Asma Tipo 2

Desde o surgimento do conceito que a resposta imune poderia ser dividida em resposta imune tipo 1 (Th1) e resposta imune tipo 2 (Th2), a asma tem sido considerada uma resposta imune tipo 2 (Th2), associada à atopia e alergia, às reações de hipersensibilidade do tipo imediata, com presença de eosinófilos e a resposta positiva aos corticosteroides. Apesar de estudos recentes demonstrarem a existência de vários fenótipos de asma, ainda ocorre a prevalência da asma tipo Th2 (cerca de 70%) (HALDAR et al., 2008; MOORE et al., 2010). A asma do perfil Th2 compreende: asma precoce, tardia e a asma induzida pelo exercício (AIE) (HALLSTRAND et al., 2005 e 2010).

A patogênese da asma associa-se a mecanismos moleculares e celulares da inflamação das vias aéreas. Na asma alérgica tipo 2 essa inflamação é amplamente dependente da sensibilização de mastócitos e basófilos pela IgE (COSTA et al., 2008) e pela presença de eosinófilos no tecido (BOUSQUET et al., 1990). Observações de diferentes grupos de fenótipos mostraram que vários endotipos de asma apresentam linfócitos Th2<sup>hi</sup> e linfócitos Th2<sup>lo</sup>, com base na presença ou ausência das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, bem como de eosinófilos no sangue e tecido (WOODRUFF et al., 2009).

A presença de IgE sérica (atopia) é o biomarcador da imunidade adaptativa Th2, impulsionada por IL-4 e IL-13, que promovem a troca de isotipo das imunoglobulinas sintetizadas por linfócitos B. Outros biomarcadores também podem correlacionar com a asma tipo Th2<sup>hi</sup>, tais como: níveis de IL-25 no soro e periostatina, uma proteína de matriz extracelular que é secretada pelas células epiteliais após estímulo com IL-13 (CHENG et al., 2014).

No primeiro contato do alérgeno com o organismo, ocorre a apresentação e ativação, com o auxílio do MHC-II e de moléculas co-estimulatórias como CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), aos linfócitos T auxiliares (LT helper – Th0), que são essenciais para a ativação dos linfócitos Th0 e sua diferenciação em linfócitos Th2 (McADAM et al., 2000).

A ligação de CD80 ou CD86 ao CD28 em linfócitos Th0 aumenta a localização nuclear do fator de transcrição NFAT1 (do inglês: *Nuclear factor of activated T cell*) e induz a expressão da proteína 3 ligante do GATA (GATA 3), o principal regulador da diferenciação Th2 (RODRIGUEZ-PALMERO et al., 1999). Esta co-estimulação também é fundamental para a expressão do co-estimulador induzível (ICOS) que é regulado positivamente na ativação pelo receptor de células T (TCR) (McADAM et al., 2000). O ligante para o ICOS (ICOSL) é expresso constitutivamente em células B e células dendríticas favorecendo a comunicação entre estas células e os linfócitos T. A ligação ICOS-ICOSL é importante para: a ativação de células T, produção de citocinas Th2 e a mudança de classe de imunoglobulina para IgE e tem sido relacionada com o desenvolvimento de inflamação alérgica das vias aéreas (MOWEN e GLIMCHER, 2004). Assim como o ICOS, o OX40 (CD134) é expresso em células T após a ligação do TCR. O seu ligante (OX40L) é expresso em APCs após ativação e a expressão de ambos é dependente da interação entre CD28 e CD80/86 (ROGERS et al., 2001). A co-estimulação por OX40 promove a diferenciação Th2 e tem demonstrado ser importante para o desenvolvimento de asma alérgica (HOSHINO et al., 2003)

Em adição, a diferenciação de células Th2 é favorecida pelo próprio epitélio, que expressa receptores e é, portanto, ativado pelo alérgeno, liberando citocinas como a IL-25, IL-33 e TSLP. Estas citocinas ativam diretamente as CDs contribuindo para que induzam a diferenciação em linfócitos Th2, além de desempenharem um importante papel na ativação de basófilos, estimulando a

produção de IL-4, que por sua vez é fundamental para a ativação de genes de citocinas do perfil Th2 (PAUL e ZHU, 2010). Tem sido demonstrado que o estímulo por TLSP para a diferenciação Th2 é dependente da co-estimulação via a ligação entre CD40L (expresso por células T) e CD40 (expresso por APCs). Estas moléculas estimulam a proliferação de células T por induzirem a expressão de CD80/86 em APCs (WATANABE et al., 2005).

As células Th2, por sua vez, passam a sintetizar citocinas as quais promovem a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos. Esses, na presença de citocinas tais como IL-4 e IL-13 favorecem a troca de isotipo de imunoglobulinas, pelo plasmócito, para IgE e IgG1 (Imunoglobulina E e G1) específica ao alérgeno sensibilizante (WILLS-KARP, 1998). Posteriormente as IgE e IgG1 irão ligar-se aos receptores de alta afinidade do tipo Fc $\epsilon$ RI, presentes na membrana celular de mastócitos e de basófilos pulmonares, ricos em mediadores da inflamação (HOLGATE et al., 2008).

Contato subsequente do mesmo alérgeno com a submucosa, promovem uma ligação cruzada entre o alérgeno e as IgE/IgG1 presentes na superfície dos mastócitos e basófilos, por uma reação antígeno-anticorpo, provocando a desgranulação destas células e a liberação de mediadores pré-formados (histamina) e derivados dos fosfolípidicos de membrana (serotonina, leucotrienos, prostaglandinas, fator de ativação plaquetária (PAF), capazes de causar contração do músculo liso brônquico e inflamação da mucosa respiratória ou seja, provocar broncoespasmo e edema (BARNES, 2008; EDWARDS et al, 2012).

Existe simultaneamente a ativação rápida dos macrófagos presentes nas vias aéreas e produção de espécies reativas intermediários do oxigênio (eROS) (YANG et al, 2011). Os linfócitos Th2, presentes na mucosa brônquica na asma, induzem a síntese de IgE pelos plasmócitos, pela ação de citocinas como a IL-4 e a IL-13 e favorecem a diferenciação e ativação dos eosinófilos pela ação da IL-5 (PALMQVIST et al., 2007). A intervenção do fator de crescimento GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) tem capacidade amplificadora sobre esse processo (TODO-BOM e PINTO, 2006).

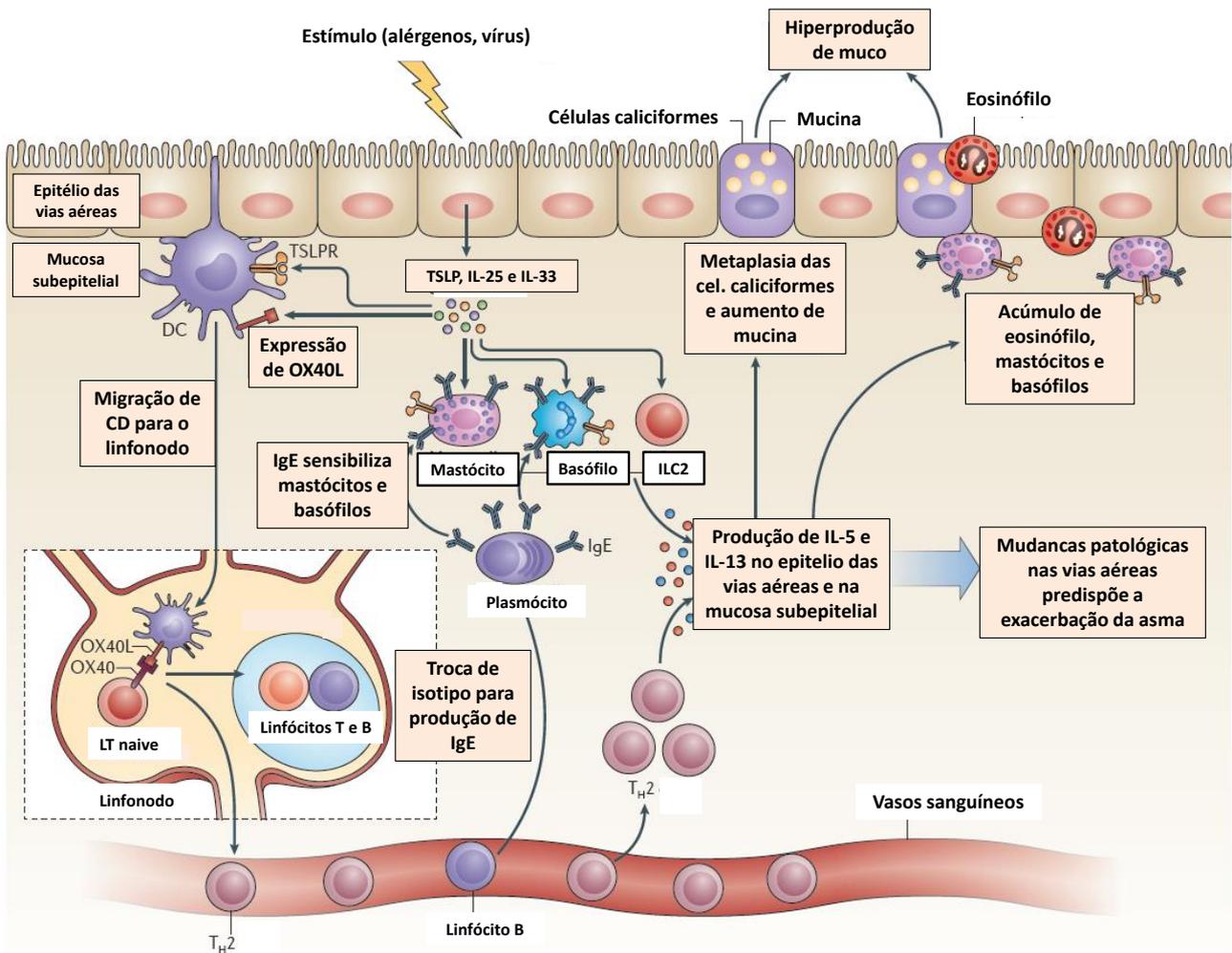
A resposta tardia ocorre como consequência da regulação positiva de citocinas, quimiocinas e de moléculas de adesão que motivam a ativação e o

recrutamento de células inflamatórias, em particular dos linfócitos, basófilos e eosinófilos e ainda neutrófilos e macrófagos para o local onde ocorreu o contato. Os eosinófilos que infiltram a mucosa brônquica fixam também IgE na sua membrana e respondem ao contato com o alérgeno libertando mediadores (SHAKOORY et al., 2004). O acúmulo de eosinófilos gera quimiocinas pró-inflamatórias e enzimas citolíticas incluindo a proteína catiônica eosinofílica e a proteína básica principal que provocam ruptura da integridade do epitélio das vias aéreas (WENZEL et al., 2006).

De fato três tipos celulares principais estão envolvidos no processo alérgico: eosinófilos, mastócito/basófilos e linfócitos Th2 (WENZEL et al., 2006) aparecendo conseqüentemente como fundamentais a expressão dos receptores CCR3, CCR4 e CCR8 para quimotaxinas, eotaxinas e RANTES (*Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*).

Atualmente se sabe que a asma alérgica, uma doença com aspecto clínico tão variável, não é resultado apenas do desenvolvimento da resposta Th2 exacerbada, mas também de outros perfis de respostas imunológicas, desencadeados por linfócitos tais como: Th9 e Th17, importantes, sobretudo, no desencadeamento da asma severa (WENZEL et al., 2016). Além disso, a presença de células como as células linfoides inatas (ILCs) auxiliam na severidade da doença (LAMBRECHT et al., 2015). Por outro lado, células T reguladoras (Treg) desempenham um papel primordial na supressão dessas respostas, promovendo uma modulação do perfil Th2 em detrimento do perfil Th1 (LAMBRECHT et al., 2015). Tendo em vista a diversificada participação celular na asma, seus diferentes fenótipos e endotipos, a observação do paradigma Th2 não foi suficiente para explicar todo o espectro da síndrome da asma. A doença grave não está associada a uma exclusiva produção de citocinas Th2, portanto fatores adicionais além dessas citocinas desempenham um papel importante na patogênese desta síndrome (LAJOIE et al, 2010) (Figura 3).

**Figura 3. Respostas imunes de tipo 2 na asma.**



A liberação de citocinas por células epiteliais, particularmente IL-33 e TSLP, induzem a expressão do ligante OX40 (OX40L) em células dendríticas (CDs) e migração para o linfonodo onde ativam células T  $CD4^+$  naive produtoras de IL-4, que migram para zonas de células B e diferenciam-se em Th2 (linfócito T helper 2). Citocina IL-4 e IL-13 ativam LB em plasmócito produtor de imunoglobulina e medeiam a troca de isotipo para IgE, Citocinas como IL-5 e IL-13 promovem alterações inflamatórias e remodelação na mucosa das vias aéreas que predispõe um indivíduo à asma exacerbada. ILC2 - célula linfóide inata do grupo 2; TSLPR - receptor TSLP; TSLP – linfoproteína do estroma tímico. Fonte: adaptado de Fahy, 2017.

## b) Asma não tipo 2

Em comparação com a asma tipo 2, pouco se sabe sobre a asma não tipo 2, os fenótipos que lhe estão subjacentes, ou os elementos moleculares que controlam. Asma não tipo 2 pode afetar 50% ou mais dos indivíduos em tratamento com corticosteroides que, apesar de cumprir os critérios para a asma, mostram menos obstrução das vias aéreas e hiperreatividade do que os indivíduos que apresentam asma severa tipo 2 (WOODRUFF et al., 2009).

Algumas pessoas que apresentam asma leve na fase adulta e sem histórico de características alérgicas moderadas na infância são prováveis

indivíduos que se enquadram nesta categoria (BISGAARD et al., 2010; MARTIN et al., 2011).

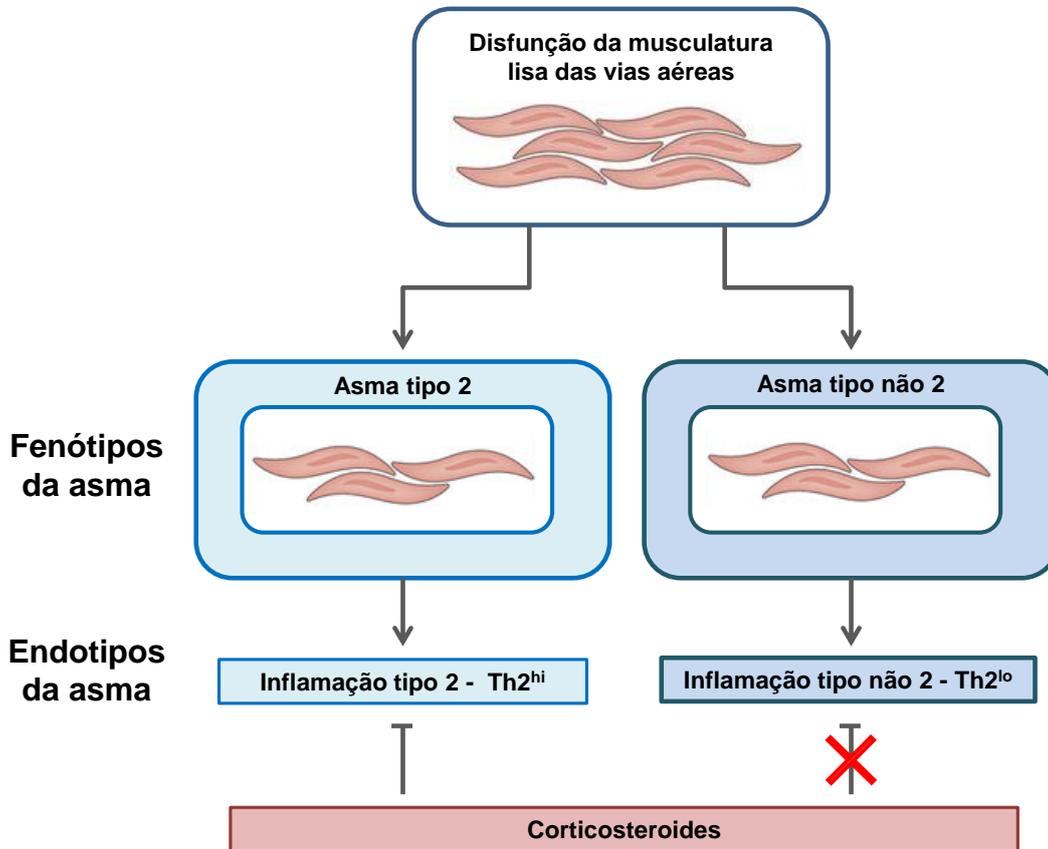
A obesidade, por sua vez, desempenha um papel importante no desenvolvimento, controle e gravidade de um desses fenótipos da asma. No entanto, se a obesidade é um componente motriz do desenvolvimento da asma ou não, ainda permanece controverso (WENZEL, 2012; WENZEL, 2016). Em adição, a obesidade está associada a um maior gasto energético durante a respiração, falta de ar, maior probabilidade de refluxo gastroesofágico, tosse e aperto no peito, sintomas estes que podem confundir o diagnóstico de asma nestes indivíduos (LOCKE et al., 1999; SIN et al., 2002; NILSSON et al., 2003; PAKHALE et al., 2010).

Estudos demonstram a associação da obesidade com um estado pró-inflamatório generalizado, envolvendo elevada expressão de determinados mediadores inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6 e leptinas. Por outro lado, a obesidade está associada a menores quantidades de Fração Exalada de Óxido Nítrico (FeNO), presença de poucos eosinófilos e, mais importante, resposta diminuída à terapia com corticosteroide (PETERS-GOLDEN et al., 2006; KOMAKULA et al., 2007). Além disso, estudos recentes demonstraram que a perda de peso esta relacionada com aumento da produção de citocinas do padrão Th2 em relação as citocinas dos perfis Th1 e Th17 (DIXON et al., 2011).

Já a asma neutrofílica apresenta-se associada à asma grave (JATAKANON et al., 1999; WENZEL, 2012). É um fenótipo geralmente observado em pacientes tratados com corticoides, pelo fato destes indivíduos não responderem bem a essa terapia. Os corticosteroides atuam inibindo a apoptose de neutrófilos, contribuindo assim para a ativação destas células (KATO et al., 1995). Nestes indivíduos, a neutrofilia pulmonar está associada à baixa função do pulmão, estreitamento da passagem do ar, espessamento das vias aéreas (medido por tomografia computadorizada) e uma maior expressão das metaloproteinases, mas não está associada com hiperreatividade das vias aéreas (SIMPSON et al., 2005) (Figura 4). Em adição, estudos relataram que a inflamação neutrofílica está associada com regulação das vias da IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , além de co-existir com eosinofilia, caracterizando um quadro de asma

severa, com presença de múltiplas vias de imunidade inata e adaptativa (HASTIE et al., 2010; BOURGEOIS et al., 2011) (Figura 4).

**Figura 4. Asma como doença da musculatura lisa que é modificada pelo processo inflamatório presente em cada endotipo.**



A asma apresenta broncoconstrição do músculo liso, o qual modifica-se pelo processo inflamatório de cada fenótipo. Nos endotipos da asma compreendem-se o inflamatório tipo 2, que apresenta perfil Th2<sup>hi</sup>, enquanto que o inflamatório tipo não 2 apresenta perfil Th2<sup>lo</sup>. Estas vias inflamatórias não tipo 2 não são bem compreendidas, mas podem incluir as associadas à obesidade ou neutrofílica. Th- T helper. Fonte: Adaptado de Fahy, 2017.

### 1.3.3.2 Asma: Participações de Diversas Células

A asma é uma doença heterogênea, que apresenta um número distinto de fenótipos de acordo com a clínica de cada indivíduo. A forma mais comum da asma é a asma alérgica (cerca de 70% dos casos), a qual resulta de uma resposta imune inapropriada à inalação de alérgenos por indivíduos geneticamente suscetíveis. Estes indivíduos apresentam a asma clássica, de perfil Th2 (ver tópico Asma perfil Th2 e Figura 3) e IgE reativa à antígenos específicos. Em contraste, na asma não Th2, os asmáticos apresentam a

doença sem ligação com antígenos específicos, presença substancial de neutrófilos em infiltrados pulmonares e resistência à terapia com esteroides (LLOYD e HESSEL, 2010; WENZEL, 2012; WENZEL, 2016) (Figura 4). Uma melhor compreensão destes fenótipos clínicos, bem como seus biomarcadores proporcionará a oportunidade de desenvolver terapias personalizadas voltadas especificamente para cada fenótipo. Assim a participação de diversas células na fisiopatologia da doença é marcante para cada tipo de fenótipo.

### **a.) Células Linfoides Inatas (ILC)**

As células linfoides inatas (ILC) foram inicialmente classificadas como células efetoras não-T e não-B em muitos modelos de doenças do perfil Th2 (KANG et al., 2012). Publicações seguintes passaram a denominar essas células como células linfoides inatas, ou ILCs. As ILCs foram então classificadas em três grupos: **1.** ILC1 – ILC do grupo 1, que incluem células NK e secretam IFN- $\gamma$ ; **2.** ILC2 – ILC do grupo 2, produtoras de citocinas do perfil TH2; **3.** ILC3 – ILC do grupo 3, produtoras de IL-17 e IL-22 (WALKER et al., 2013).

De muitas maneiras, as ILC2 se assemelham a células Th2, porém as ILC2 não apresentam receptores específicos a antígenos, mas como células Th2, reagem às citocinas derivadas do epitélio IL-25, IL-33 e TSLP (KANG et al., 2012). As ILC2 que produzem citocinas do perfil Th2 (IL-13, IL-5 e IL-9) foram inicialmente descritas no intestino de camundongos infectados com helmintos, onde estas contribuem para a eosinofilia tecidual e para a produção de muco, parâmetros cruciais para a expulsão de vermes (MORO et al., 2010).

As células ILC2 desenvolvem-se a partir de progenitores linfoides comuns em resposta a citocinas como IL-7 e IL-33 e dependem dos fatores de transcrição GATA-3 e ROR $\alpha$ . A ativação de ILC2 é ainda induzida por IL-25 e IL-33, produzidos principalmente por células epiteliais em resposta a lesão e estimulação através de receptores de reconhecimento de padrões (PRR) (WENZEL et al., 2016).

Estudos subsequentes ligaram as ILC2 à patogênese da inflamação alérgica das vias aéreas, onde alérgenos contendo proteases podem ativar indiretamente ILC2 através das células epiteliais pulmonares (HALIM et al., 2012). A lesão proteolítica induz a liberação de IL-33 que, por sua vez, ativa as

células ILC2 para induzir eosinofilia pulmonar e hiperreatividade brônquica. Outra maneira pela qual as ILC2 podem ser ativadas nos pulmões após a exposição ao alérgeno é através da expressão do receptor de cisteinil leucotrieno, CysLT1R (DOHERTY et al., 2013). O leucotrieno D4 (LTD4), o principal ligante para CysLT1R, pode ser induzido após uma única exposição a alérgenos proteolíticos e estudos demonstraram seu papel regulatório na ativação e proliferação de ILC2 (DOHERTY et al., 2013). Tais dados indicam que as células ILC2 podem ser ativadas muito cedo após a exposição ao alérgeno e que sua produção de IL-5 e IL-13 podem causar algumas características da asma alérgica de forma independente das células T (LAMBRECHT et al., 2015).

### **b) Th17**

Células Th17 apresentam-se como uma distinta linhagem de células T efetoras CD4<sup>+</sup>, que secretam IL-17 e expressam fator de transcrição receptor do ácido retinóico relacionado ao receptor nuclear órfão  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t) e ROR $\alpha$  (HARRINGTON et al., 2005). Embora o fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e citocinas inflamatórias IL-6, IL-21 e IL-23 serem consideradas cruciais para desenvolvimento de resposta envolvendo linfócitos Th17 em animais, ainda não está claro quais citocinas são necessárias para o desenvolvimento de Th17 em humanos (ALCORN et al., 2010). IL-17A apresenta-se aumentada nos pulmões de pacientes com asma e os níveis de IL-17 estão correlacionados com a gravidade da doença, particularmente em pacientes com neutrofilia e resistente a esteroides (AL-RAMLÍ et al., 2009).

Células Th17 podem também exacerbar eosinofilia mediada por células Th2 na inflamação das vias aéreas (WAKASHIN et al., 2008). Interessantemente, a transferência de antígenos específicos para células Th17 promove inflamação das vias aéreas resistente à esteroides e hiperreatividade em camundongos, fortalecendo ainda mais a associação entre as células Th17 e asma severa (MCKINLEY et al., 2008).

As formas graves de asma são caracterizadas pelo aumento da remodelação das vias aéreas. Em alguns modelos experimentais de asma conduzidos por ácaros caseiros ou ozônio, observou-se que a IL-17A contribuiu para a remodelação, promovendo a proliferação de fibroblastos (BELLINI et al.,

2011). Em humanos e camundongos, a IL-17 também pode causar a contração direta das células do músculo liso brônquico e assim causar hiperreatividade brônquica na ausência de inflamação neutrofílica (KUDO et al., 2012). Além das células T convencionais  $TCR\alpha\beta^+CD4^+$ , células  $TCR\gamma\delta^+$  e células ILC3 podem ser fonte de IL-17 e a contribuição relativa de todas pode ser diferente em vários endotipos de asma. A produção de citocinas pelas células Th17 é notoriamente resistente à inibição por esteroides, o que explica por que a inflamação rica em neutrófilos conduzida pelas células Th17 é o correlato patológico da asma resistente a esteroides (LAMBRECHT et al., 2015).

### **c.) Th9**

A IL-9 foi originalmente descrita como um fator de crescimento de células T e mastócitos, produzida por vários tipos celulares incluindo linfócitos T, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos. Por muito tempo a IL-9 foi considerada uma citocina do perfil Th2, devido a sua elevada produção durante infecções por nematodas e em respostas alérgicas.

Vários estudos indicam a existência de outro tipo de células T auxiliares, distintas das células Th2, que produzem IL-9 em grandes quantidades e podem regular inflamações alérgicas crônicas (SOROOSH & DOHERTY, 2009).

Os mecanismos envolvidos na diferenciação das células Th9 não estão completamente elucidados, porém atualmente é definido que estas células são diferenciadas a partir de Th0 ativadas na presença de  $TGF-\beta$  e IL-4, enquanto o  $IFN-\gamma$  inibe a ativação destas células (SCHMITT et al., 1994).

As células Th9 foram identificadas como um subconjunto de células T auxiliares distintas e foi demonstrado que estímulos adicionais, tais como TSLP, vias de sinalização através de receptores da família Notch ou a ligação ao receptor OX40 também contribuem para a diferenciação de células Th9 (YAO et al., 2013). Estudos demonstraram que as vias moleculares envolvidas na produção de IL-9 estão ligadas a fatores de transcrição Smad2, Smad3, STAT5, IRF4 e PU.1 que são essenciais para a diferenciação Th9 (LIAO et al., 2014). Evidências sugerem que IL-9 está envolvida no desenvolvimento de inflamação alérgica no pulmão, por ser detectada em biópsias de pacientes com asma e estar relacionada às células  $TCD4^+$ , embora existam várias outras

fontes celulares de IL-9, incluindo os mastócitos e eosinófilos (PEJMAN, S.; TAYLOR, 2009).

#### **d.) T regulatório (Treg)**

As células Treg exercem um papel chave no controle das respostas inflamatórias. Elas podem ser de ocorrência natural (nTreg) ou induzidas (iTreg) por estimulação antigênica. Os linfócitos Treg apresentam o fator de transcrição FOXP3 (do inglês: *forkhead Box P3*) (LLOYD e HAWRYLOWICZ, 2009) e atuam na regulação das respostas inflamatórias. Foi demonstrado que a transferência de células  $CD4^+CD25^+FOXP3$  promove modulação no desenvolvimento de inflamação nas vias aéreas, hiperreatividade e previne a ativação induzida por alérgenos de células dendríticas (KEARLEY et al., 2005)

As células Treg exercem sua ação inibitória por mecanismos diretos e indiretos: produzem citocinas anti-inflamatórias como IL -10 e TGF- $\beta$ , as quais suprimem a ativação de células dendríticas nos pulmões; expressão de moléculas inibidoras, tais como antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA4) e modulam tanto o MHC-II quanto as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 na apresentação do antígeno (KEARLEY et al., 2005; WHITEHEAD et al., 2012).

A supressão das CDs por linfócitos Treg é dependente do contato direto a célula. Células Treg expressam LFA1 (linfócitos associado ao antígeno 1) dependente da ligação com CDs, que promove uma regulação negativa de moléculas co-estimuladoras nas CDs em resposta a expressão de CTLA4 pelas Tregs (ONISHI et al., 2008). Além disso, a depleção de Tregs, em camundongos, promove maior frequência de CDs nas vias respiratórias e níveis elevados de moléculas co-estimulatórias (LEWKOWICH et al., 2005). Adicionalmente nas vias aéreas de crianças com asma, a porcentagem de células Treg é menor do que em crianças saudáveis (KHOA et al., 2009).

Recentemente vem sendo demonstrado que algumas terapias medicamentosas podem aumentar respostas via Treg. A combinação de corticoide e vitamina D induz a produção de IL- 10, via Treg e a vitamina D restaura o defeito na produção de IL- 10, *in vitro* (RYANNA et al., 2009).

### 1.3.4 Farmacoterapias na asma

Para a maioria das desordens alérgicas o tratamento é feito à base de substâncias que visam uma combinação de alívio dos sintomas e controle terapêutico. Entre essas substâncias se encontram os corticosteroides, os antagonistas de mediadores, os agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos e os inibidores de fosfodiesterases. Outras classes de fármacos também têm sido desenvolvidas, como os inibidores de mastócitos e os anticorpos monoclonais, porém com menor uso clínico (HOLGATE & POLOSA, 2008).

Os corticoides, a exemplo da dexametasona, suprimem respostas alérgicas por meio da inibição de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. O mecanismo de ação destas drogas envolve a sua difusão através da membrana plasmática e a interação com receptores de glicocorticoides no citoplasma, induzindo ativação destes receptores e migração para o núcleo, onde eles modulam a atividade de genes alvos, incluindo aqueles codificantes dos fatores de transcrição NFkB e AP-1 (BARNES & ADCOCK, 2003).

Os principais antagonistas de mediadores são os anti-histamínicos de primeira e segunda geração, como a clorferamina e a loratadina, respectivamente. Estes compostos antagonizam as ações da histamina, principalmente no receptor H1. Os anti-histamínicos de segunda geração são mais eficazes e mais seletivos e por isso possuem menor toxicidade (DEL et al., 2006).

Antagonistas do receptor de cisLT como montelukaste® e zafirlukaste® também têm sido desenvolvidos, contudo seu principal uso é como terapia suplementar aos corticoides inalatórios (POLOSA, 2007).

Os agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos, como o salbutamol são broncodilatadores e proporcionam alívio rápido dos sintomas da asma. A ligação destes agonistas aos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos resulta na ativação da proteína Gs, que por sua vez estimula a atividade da enzima adenilato ciclase para aumentar a produção do 3'5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). O AMPc ativa a enzima PKA, que medeia o relaxamento do músculo liso por meio da fosforilação da cinase da cadeia leve de miosina (MLCK) e da abertura de canais de  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$  (KCa) (HOLGATE & POLOSA, 2008).

Os inibidores de fosfodiesterases, a exemplo da teofilina, também são broncodilatadores. Estas drogas atuam evitando a degradação do AMPc e com isso permitem que ele aja por mais tempo ativando a PKA e promovendo relaxamento da musculatura lisa (BOSWELL-SMITH et al., 2006).

A evolução no tratamento da asma mantém a promessa de desenvolvimento de medicamentos de precisão, terapias biológicas especificamente dirigidas aos fenótipos de cada paciente a fim de melhorar a eficácia e diminuir o risco. Neste sentido, os biomarcadores podem ser a base fundamental para a precisão clínica do futuro. Os biomarcadores servem de base para que seja proporcionado ao paciente um tratamento mais específico ao seu fenótipo da asma. Um biomarcador ideal deve ser sensível e específico, fácil e reproduzível. Além disso, deve fornecer informações biologicamente relevantes que auxiliem nas tomadas de decisão (FRICKER et al., 2017).

As terapias biológicas para asma tipo 2, aprovadas ou ainda em ensaios clínicos, são destinadas a agir contra a IgE, IL-5, IL-13, receptor IL-4 (IL-4Ra) e ao TSLP. As citocinas IL-4 e IL-13 são centrais para a inflamação do tipo Th2, com GATA3 sendo seu principal fator de transcrição (FAJT et al., 2015). Múltiplos marcadores para inflamação tipo 2 foram desenvolvidos, incluindo eosinófilos em escarro e sangue, óxido nítrico (FeNO) exalado, IgE sérica e a periostina (FRICKER et al., 2017).

Tabela 1. Tratamento direcionado ao endotipo inflamatório perfil Th2 da asma.

Biomarcador	Droga	Alvo	Efeito	Aprovação
Eosinófilos no sangue FENO Periostina	Omalizumab	IgE	Redução da exacerbação. Melhora nos sintomas e na qualidade de vida.	Aprovado pela FDA.
Eosinófilos no sangue/escarro FENO	Mepolizumab	IL-5	Redução do número de eosinófilos, exacerbação.	Aprovado pela FDA.
Eosinófilos no sangue	Reslizumab	IL-5	Redução do número de eosinófilos, exacerbação.	Em avaliação
Eosinófilos no sangue	Benralizumab	IL-5R $\alpha$	Redução do número de eosinófilos e basófilos, exacerbação.	Fase III
Eosinófilos no sangue	Dupilumab	IL-4R $\alpha$	Redução de exacerbação, melhora nos sintomas e na qualidade de vida	Fase III
Periostina	Tralokinumab	IL-13	Redução do número de eosinófilos, exacerbação.	Fase III
Periostina	Lebrikizumab	IL-13	Redução da exacerbação	Fase III

As vias da IgE, IL-5 e IL-4/IL-13 podem ser alvos com anticorpos monoclonais (mAbs). Existe uma sobreposição notável entre os chamados biomarcadores preditivos e uma significativa heterogeneidade na resposta clínica. FDA, US Food and Drug Administration; IL-4R $\alpha$ , receptor da IL-4 $\alpha$  ; IL-5R $\alpha$ , receptor IL-5. Fonte: MURARO et al., 2016.

Embora exista uma considerável variedade de drogas utilizadas na terapia antialérgica, elas apenas aliviam os sintomas e, portanto precisam ser usadas de forma crônica. Este fato tem uma importante implicação terapêutica, pois a maioria destas drogas apresenta efeitos colaterais graves, que podem causar muitos danos aos usuários de medicamentos, principalmente quando utilizados por um longo período de tempo. Os corticoides podem causar alterações endócrinas graves (ALEN, 2006); os anti-histamínicos apresentam efeitos sedativos e anticolinérgicos (DEL et al., 2006); os agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos e os inibidores de fosfodiesterases apresentam efeitos cardíacos e no sistema nervoso central (BOSWELL-SMITH et al., 2006).

Neste sentido, é de extrema importância a realização de pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos que possam ser utilizados com segurança e eficácia terapêutica, trazendo benefícios à saúde da população.

### 1.3.5 Psiconeuroimunologia

O sistema imunológico (SI) e o sistema nervoso (SN) evoluíram para a manutenção da homeostase fisiológica e proteção contra possíveis agressões ao organismo, sendo o processo inflamatório uma ferramenta de defesa do SI (CHAVAN et al., 2017). No entanto, quando o processo inflamatório não for resolvido, este pode ser prejudicial, causando o surgimento de doenças inflamatórias crônicas ou distúrbios autoimunes.

O SN integra as funções biológicas e fornece um controle homeostático instantâneo pela liberação de neurotransmissores e moléculas regulatórias. Esses dois sistemas, SI e SN, possuem características evolutivas aperfeiçoadas que permitem o reconhecimento de alterações e ameaças em um microambiente em constante mudança e ao reconhecê-las, montam respostas e desenvolvem memória para facilitar respostas a alterações semelhantes no futuro (CHAVAN et al., 2017). Assim, a interação entre neurônios e células imunes, sua comunicação e cooperação funcional, é parte integrante da homeostase e sobrevivência das espécies.

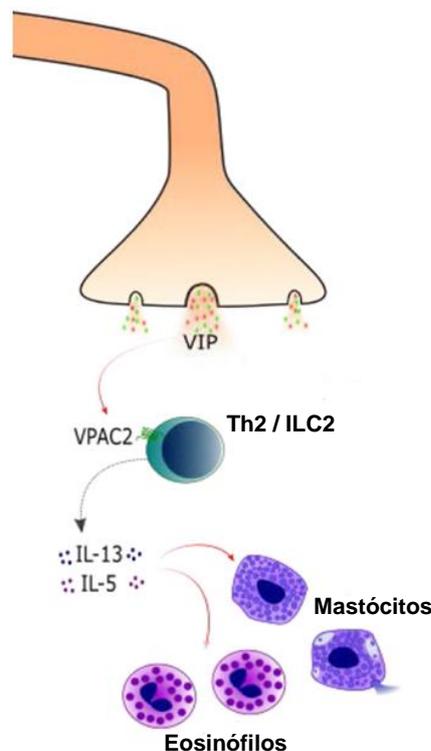
Estudos identificaram componentes da interação neuro-imune compartilhados entre os dois sistemas. Além das células imunes, a presença de receptores de reconhecimento de padrões (PRR), incluindo os receptores tipo *Toll* (TLRs) e dos receptores de citocinas, nas células do SI e nos neurônios fornecem substratos moleculares para modulação simultânea da função imune e neuronal por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), citocinas e outras moléculas imunológicas (HOSOI et al., 2005; LARTIGUE et al., 2011; PARK et al., 2014; XU et al., 2015; STEINBERG et al., 2016).

Essa interação resulta na ativação de vias de sinalização intracelulares mediadas por fatores como NFκB e AP1, assim como a ativação de inflamassomas e aumento da síntese de citocinas (DAVIS et al., 2011; MEDZHITOV, 2008). A ativação das células imunes periféricas e liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios (serotonina, histamina, prostaglandinas) tem um impacto nos nervos sensoriais no local inflamado. A maior classe de neurônios sensoriais é de nociceptores e a ativação destes

promove a liberação de substância P (SP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e outros neurotransmissores, que se ligam a seus receptores nas células imunes promovendo ou suprimindo as respostas inflamatórias (PINHO-RIBEIRO et al., 2017).

Os nociceptores desempenham um papel crítico na condução de hiperreatividade pulmonar e inflamação na asma (TALBOT et al., 2015). O trato respiratório é inervado por neurônios nociceptores que podem induzir tosse, produção de muco e broncoconstrição. Estes neurônios detectam estímulos nocivos, incluindo irritantes químicos e alérgenos (PINHO-RIBEIRO et al., 2017). Os neurônios nociceptores podem gerar inflamação pulmonar através da liberação do neuropeptídeo VIP, que atua sobre o receptor VPAC2 expresso pelas células linfoides inatas Tipo 2 (ILC2) para induzir a produção de IL-5 (TALBOT et al., 2015) (Figura 5). Os neuropeptídeos também potencializam a desgranulação de mastócitos, principais mediadores da inflamação alérgica (KIM et al., 2014).

**Figura 5. Neurônios nociceptores liberam neuropeptídeos que regulam as funções das células imunes adaptativas e inatas.**



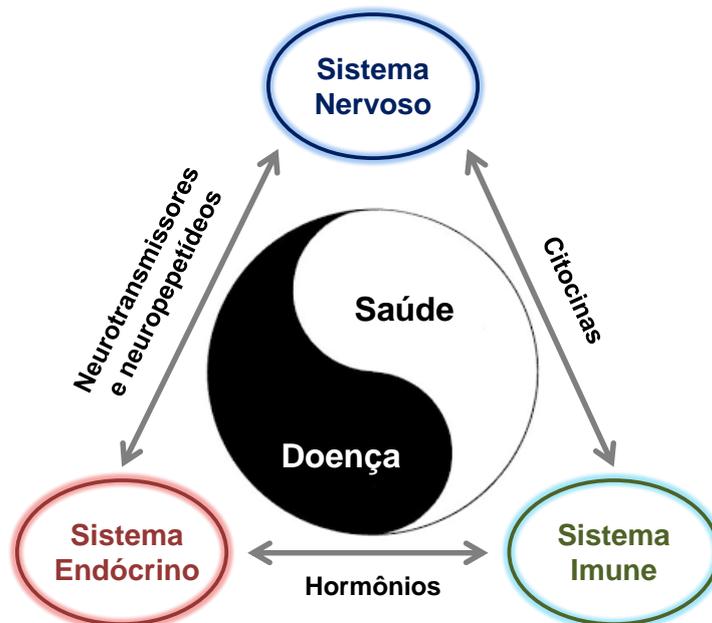
O peptídeo intestinal vasoativo (VIP) ativa seu receptor VPAC2 expresso por células linfoides inatas e células Th2 e estimula essas células a produzir IL-5 e IL-13, mediadores importantes de reações alérgicas que causam desgranulação de eosinófilos e mastócitos.

A expressão de receptores para neurotransmissores, incluindo receptores de acetilcolina e receptores adrenérgicos foram identificados em macrófagos, células dendríticas, células T, e outras células imunes, facilitando a regulação neural nas respostas imunológicas (KAWASHIMA et al., 2015). As células imunes também sintetizam e liberam substâncias classicamente designadas como neurotransmissores e neuromoduladores, incluindo acetilcolina, dopamina e outros catecolaminas com papel na regulação imune local e em circuito neuroimunomodulador mais complexo (MARINO e COSENTINO, 2013) (Figura 6).

Nos últimos 50 anos tem-se abandonado a ideia de que os organismos sejam constituídos por órgãos e sistemas funcionalmente separados uns dos outros. Neste sentido a Neuroimunologia ou Psiconeuroimunologia é um ramo de estudos que vem crescendo cada vez em pesquisas a fim de analisar o relacionamento recíproco entre o Sistema Nervoso (SN) e os componentes do Sistema Imune (SI).

O estudo da neuroimunomodulação não é unidirecional. A bidirecionalidade dos SI e SN são apresentadas pela existência de elementos comuns entre esses sistemas. Muito se tem avançado em relação à interação entre os sistemas nervoso, endócrino e imune e os efeitos que o estresse tem sobre a imunidade (ALVES et al., 2007), porém àqueles relacionados aos efeitos da ativação do sistema imune sobre o sistema nervoso necessitam ser aprofundados. Sabe-se da presença de citocinas e de receptores para as mesmas, nos SN e SI, fato que, provavelmente, justifica as alterações neuroquímicas e comportamentais que acompanham processos infecciosos (OLIVEIRA et al., 2000; CHITTIPROL et al., 2008). Esta interação sugere um papel imunoregulatório para as citocinas no cérebro, e um papel do sistema imune nas aferências sensoriais, sendo algumas doenças psiquiátricas como ansiedade, depressão, esquizofrenia e autismo atreladas com disfunções imunológicas, ou seja, alterações imunes são capazes de modular a atividade neuronal e, conseqüentemente as emoções e o comportamento (PALERMO-NETO et al., 2010) (Figura 6).

**Figura 6. Esquema ilustrativo das interações entre os sistemas nervoso, endócrino e imune.**



Interações entre os sistemas nervoso, endócrino e imune, que através dos seus mediadores alteram o processo de saúde-doença Fonte: Adaptado de ALVES e PALLERMO-NETO, 2010.

A asma afeta diretamente a qualidade de vida dos indivíduos, não apenas pela alteração respiratória, mas também por prejuízos comportamentais, funcionais e físicos que ocasiona, podendo estar relacionada com sintomas de depressão e ansiedade (MATOS et al. 2007; CAMPANHA et al., 2008).

Alterações da função pulmonar influenciam diretamente os aspectos psicossociais, como depressão, ansiedade e qualidade de vida em pacientes asmáticos. Muitos pacientes se apresentam ansiosos e depressivos, justamente pelas mudanças que vem com a doença. A alta prevalência desses sintomas pode estar associada às manifestações da doença, como intensa dispneia e respostas psicológicas do paciente à medida que este se confronta com as significativas limitações para realizar as atividades de vida diária e com o esforço exigido para ajustar-se à incapacidade (FURTADO et al. 2012).

Nos seres humanos alguns problemas respiratórios estão associados à ansiedade sendo a respiração um parâmetro a mais no diagnóstico de várias desordens relacionadas à ansiedade (FREIRE et al., 2012). Apesar de esta relação ser bem descrita em humanos, a pesquisa pré-clínica visa investigar a

função respiratória em modelos animais de ansiedade (CARNEVALI et al., 2013).

Observações clínicas de insuficiência respiratória grave em pacientes que apresentam transtornos de ansiedade têm estimulado muitas pesquisas a fim de identificar anormalidades respiratórias associadas a esta síndrome. Sintomas como a hiperventilação (PAPP et al., 1997), instabilidade respiratória e suspiros frequentes (SCHWARTZ et al., 1996; ABELSON et al., 2001) têm sido comumente relatadas em pacientes com transtorno de pânico, mesmo durante períodos sem crise (WILHELM et al., 2001; WILHELM et al., 2001).

Evidências de ligação entre a respiração e a ansiedade em ratos vêm sendo documentadas, mostrando que parâmetros respiratórios são fortemente afetados pelo condicionamento e pela novidade (FRYSZTAK et al., 1991; HEGOBURU et al., 2011). Há também estudos mostrando que diminuições na frequência respiratória são indicativas de dano pulmonar em modelos de asma murino (VAICKUS et al., 2010). Assim a respiração é o ponto comum da asma e da ansiedade (Figura 7).

Utilizando modelo de asma experimental murino estudos demonstraram mudanças na atividade em núcleos cerebrais específicos no hipotálamo e amígdala, juntamente com mudanças comportamentais associadas à exposição à alérgeno específicos em camundongos (BASSO et al., 2003; COSTA-PINTO et al., 2005). Estes estudos ainda demonstraram um aumento na atividade cerebral no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e núcleo central da amígdala (CeA), desencadeada por desafio com OVA em camundongos alérgicos (BASSO et al., 2003; COSTA-PINTO et al., 2005). Podemos então afirmar que estas são importantes áreas na modulação de fatores afetivos comportamentos que participam de respostas ao estresse, incluindo a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), contendo as maiores quantidades de fator liberador de corticotropina (CRF) no SNC. Estudo demonstrou por imunohistoquímica que a expressão de c-fos nestas regiões cerebrais esta aumentada em animais sensibilizados e desafiados com OVA (COSTA-PINTO et al., 2006).

**Figura 7. Esquema representativo mostrando a relação entre asma, respiração e ansiedade**



A asma provoca alterações respiratórias, as quais favorecem quadros de ansiedade. A respiração apresenta-se como o ponto comum da asma e da ansiedade.

Os adolescentes são uma parte da população com uma elevada prevalência e morbidade de asma os quais não cuidam de forma efetiva da sua doença (BRUZZESE et al., 2012). Uma explicação potencialmente importante para a falta de cuidado é a ansiedade como comorbidade. Os jovens com asma possuem maior risco de apresentar sintomas de ansiedade, sendo este fato associado ao aumento dos sintomas de asma (FELDMAN et al., 2013).

A literatura relata uma prevalência significativamente maior de transtornos mentais em pessoas com asma, com ênfase particular nas desordens como depressão e/ou ansiedade (KATON et al., 2004). Esta associação tem importantes implicações para estes pacientes, decorrentes da presença de comorbidade psiquiátricas, levando a gravidade dos sintomas e redução do controle da asma (ZHANG et al., 2016). Estudo mostrou que cerca de 80% dos pacientes asmáticos têm ansiedade descontrolada (VIEIRA et al., 2011). Outro dado muito importante é a confirmação desta associação em vários estudos em animais, os quais apresentam biomarcadores da asma e altos níveis de ansiedade (ORAKA et al., 2007; MARCO et al., 2010). Embora a compreensão mecanicista desta associação esteja sob investigação, está se tornando evidente que o manejo da ansiedade é importante para o tratamento do paciente com asma (MOZZINI-MONTEIRO et al., 2016).

Medicações ansiolíticas atualmente usadas são da classe dos benzodiazepinas e antagonistas seletivos de recaptção de serotonina (SSRI) e ambos não são ideais, pois o primeiro provoca sonolência e pode causar dependência, enquanto o segundo requer 2-3 semanas para o início do efeito. Portanto, para o manejo complexo da asma com ansiedade associada, uma medicação que combine efeitos anti-inflamatórios e ansiolíticos representaria

um benefício significativo. Estudo em nosso laboratório, utilizando o extrato de *Herissantia tiubae* demonstrou que o mesmo apresenta tal combinação das duas propriedades em modelo experimental de asma e em protocolos de ansiedade (MOZZINI-MONTEIRO et al., 2016).

Com base nos dados apresentados acima, estudamos o óleo essencial gama-terpineno (GT) no sentido de observar uma combinação de efeitos tanto no SI quanto no SN de forma a se apresentar benéfica no controle das afecções do trato respiratório. Assim, nosso objetivo foi determinar se o GT previne ou reduz os índices relacionados à asma, incluindo ansiedade.

### 1.3.6 Óleos essenciais e monoterpenos

Os óleos essenciais são substâncias voláteis e complexas, caracterizados por um forte odor, sintetizados por plantas aromáticas durante o seu metabolismo secundário. Muitas dessas plantas já demonstraram possuir um grande potencial terapêutico, que pode ser atribuído a presença dos óleos essenciais (SOWNDHARARAJAN et al.; DE SOUSA, 2011; ALI et al., 2015; CALO et al., 2015; CARVALHO et al., 2015; SARMENTO-NETO et al., 2015).

Os principais constituintes dos óleos essenciais são compostos de baixo peso molecular, constituídos por unidades básicas semelhantes ao isopreno contendo cinco carbonos, denominados de terpenos. Os terpenos são biossintetizados pela via do mevalonato, a qual utiliza o ácido mevalônico como precursor para a formação do isopentenil pirofosfato (PP), composto chave para a formação de todos os terpenóides (WATERMAN, 1991; SIMÕES; SPITZER, 2004). Os terpenos são produzidos a partir da conversão de prenil difosfatos acíclicos e esqualeno em formas cíclicas ou acíclicas, por ação do terpeno sintase. Diferentes isoformas dessa enzima são responsáveis pela formação de diversas classes de terpenos, classificadas como: monoterpenos (classe de terpenos com 10 unidades de carbono - C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (classe de terpenos com 15 unidades de carbono - C<sub>15</sub>), diterpenos (classe de terpenos com 20 unidades de carbono - C<sub>20</sub>), entre outras (DEGENHARDT et al., 2009). Apesar da existência dessas inúmeras classes, cerca de 90% dos

terpenos extraídos dos óleos essenciais encontrados em plantas, pertencem a classe dos monoterpenos (BAKKALI et al., 2008).

Os monoterpenos podem apresentar algumas variações estruturais, podendo ser acíclicos, monocíclicos ou bicíclicos (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Diversos estudos utilizando óleos essenciais e monoterpenos demonstraram uma grande variedade de propriedades farmacológicas dessas substâncias. As propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais e aos monoterpenos são variadas e algumas delas podem apresentar vantagens, quando comparadas a outras drogas com ação terapêutica já evidenciada, como, por exemplo, a sua volatilidade e o baixo peso molecular de seus componentes, que os torna ideal para uso em nebulizações, banhos de imersão ou uso intranasal, além de serem rapidamente metabolizados pelo o organismo (BANDONI; CZEPAK, 2008). Dessas ações farmacológicas, destacam-se: ação sobre o processo inflamatório e sobre o sistema nervoso central.

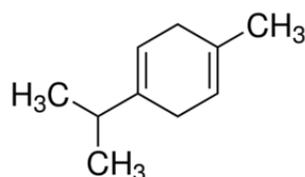
Mendes e colaboradores (2010b) demonstraram que o óleo essencial obtido das folhas *Lippia gracilis* possui ações antinociceptiva e anti-inflamatória. O principal componente desse óleo é o monoterpeno timol, que já demonstrou apresentar diversas atividades biológicas: antimicrobianos, antioxidantes, anti-nociceptiva e anti-inflamatória (BRAGA, DAL SASSO, CULICI, BIANCHI, et al., 2006; BRAGA, DAL SASSO, CULICI, GALASTRI, et al., 2006; KARPANEN et al., 2008; RIELLA et al., 2012).

Óleos essenciais de plantas aromáticas como *Helichrysum odoratissimum* (L.) Less, *Heteropyxis natalensis* Harv. e *Lippia javanica* (Bir. f.) Spreng, utilizadas popularmente no tratamento de doenças dermatológicas, demonstraram possuir a atividade inibidora sobre a 5-lipoxigenase (LOX-5), os monoterpenos 1,8-cineol e limoneno são os principais constituintes dos óleos essenciais dessas plantas e são considerados como os principais responsáveis pela atividade anti-inflamatória destas espécies (DE CASSIA DA SILVEIRA E SA et al., 2013). Além disso, diversos estudos demonstram a atividade ansiolítica dos monoterpenos como: mirtenol (MOREIRA et al., 2014); limoneno (LIMA et al., 2013; ALVES, et al., 2016); 1,4-cineol (GOMES, et al., 2010) e 1,8-cineol (KIM et al., 2014), sendo os três últimos compostos com semelhança estrutural com o gama-terpineno.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o monoterpene gama-terpineno (Figura 8) possui atividade anti-inflamatória, em diferentes modelos de inflamação agudos. O tratamento com gama-terpineno reduziu parâmetros inflamatórios, tais como edema, produção de citocinas pró-inflamatórias, além de reduzir a migração de células para o sítio inflamatório (RAMALHO et al., 2015).

Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória aguda e crônica do gama-terpineno (GT) em protocolos murinos de lesão pulmonar aguda (LPA), rinite e asma respectivamente. Estendemos o nosso estudo sobre o GT no sentido de observar seu efeito, de forma concomitante, na asma e ansiedade tendo em vista forte ligação dos sintomas clínicos observados na asma e a geração de níveis de ansiedade.

**Figura 8. Estrutura química dos monoterpene gama-terpineno**



Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/223190?lang=pt&region=BR>

# *OBJETIVOS*

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Estudar os efeitos do gama-terpineno (GT) nas inflamações aguda e crônica em modelos murino de lesão pulmonar aguda (LPA - inflamação aguda), rinite e asma alérgicas (inflamações crônicas), bem como avaliar a inter-relação asma-ansiedade.

### **2.2 Específicos**

Avaliar o efeito do tratamento com GT no protocolo de inflamação aguda como a LPA, analisando:

- Migração células totais e diferenciais
- Níveis de proteínas totais no tecido pulmonar
- Peso pulmonar
- Análise histológica do tecido pulmonar
- Produção de citocinas inflamatórias
- Análise expressão do receptor TRL4 e de moléculas sinalizadoras tais como: MAPK p38 e o fator de transcrição NFkB;

Avaliar o efeito do tratamento com GT nos protocolos de inflamação crônica, como a rinite e a asma, analisando:

- Rinite:

- Migração células totais e diferenciais na cavidade nasal
- Avaliação dos sinais clínicos
- Análise histologia do tecido nasal

- Asma:

- Avaliar os sinais comportamentais de ansiedade
- Analisar a expressão de c-fos em regiões determinadas no cérebro
- Quantificar a migração de células totais e diferenciais na cavidade pulmonar
- Produção de IgE-alérgeno específica
- Análise histológica do tecido pulmonar
- Produção de citocinas
- Análise das vias de sinalização MAPK (p38; JNK; ERK1/2) e os fatores de transcrição AKT e NF- $\kappa$ B.

# *METODOLOGIA*

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Substâncias, sais, aparelhos e equipamentos**

As listas de substâncias e sais, de aparelhos e equipamentos encontram-se nos apêndices A e B, respectivamente.

#### **3.2 Animais**

Camundongos isogênicos fêmeas da linhagem BALB/c de 7 a 8 semanas ( $n = 6$ ), com peso corporal entre 20 e 30 g e ratas Wistar fêmeas ( $n = 6$ ), pesando em média 200 g, foram utilizadas nos experimentos. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno a uma temperatura de  $25 \pm 2$  °C e submetidos a um ciclo de claro e escuro de 12 horas (6:00 às 18:00 claro e de 18:00 as 6:00 escuro) com livre acesso à água (autoclavada) e a uma dieta controlada a base de ração do tipo *pellets* (PURINA) durante todo o período de experimentação. Os camundongos e as ratas foram fornecidos pelo biotério Professor Thomas George do Instituto de pesquisa de fármacos e medicamentos (IPeFarM)/UFPB. A manipulação dos animais foi realizada de acordo com o Guia de Cuidado Animal (SHERWIN et al., 2003). Os animais foram eutanasiados por overdose de anestésicos (xilazina 20 a 30 mg/kg + quetamina 200 a 300 mg/kg). Os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) do Centro de Biotecnologia CBiotec/UFPB, sob a certidão nº35/16 (em anexo).

#### **3.3 Condições Experimentais**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunofarmacologia - CCS em parceria com os laboratórios: Psicofarmacologia - UFPB e o Laboratório de Neuroanatomia - UFRN. Para os procedimentos comportamentais, cerca de 120 minutos antes dos testes, os camundongos ( $n=6$ /grupo) foram previamente alojados em gaiolas de polietileno, visando

minimizar as possíveis alterações comportamentais dos animais decorrentes da mudança de ambiente, bem como permitir uma adaptação à sala de experimentação. Os camundongos foram mantidos a temperatura de  $21 \pm 1^\circ \text{C}$  e privados de água e ração 60 minutos antes dos testes. Antes de cada procedimento, a bancada foi limpa com etanol 70%, e durante os procedimentos foi utilizado etanol de baixa graduação (10%). Todos os experimentos foram executados no período compreendido entre as 9h às 15h horas e os animais foram utilizados uma única vez.

### **3.4 Preparo do Gama-Terpineno**

O gama-terpineno (GT) foi adquirido comercialmente pela Sigma-Aldrich, com pureza de 98%. Para a utilização do óleo essencial nos experimentos *in vivo*, o GT foi solubilizado em veículo composto de 2% de Tween 20 em solução salina a 0,9% em três doses: 12,5 mg/kg; 25 mg/kg e 50 mg/kg. Em todos os protocolos o GT foi administrado por via oral (v.o). O grupo de animais controle não-tratado recebeu igual volume do veículo empregado na dissolução do GT e administrado por via oral (v.o).

### **3.5 Protocolos Experimentais**

#### **3.5.1 Lesão Pulmonar Aguda (LPA)**

O protocolo de lesão pulmonar aguda experimental induzida por LPS foi adaptado de Pacheco de Oliveira e colaboradores (2015) e Franco e colaboradores (2009). Este protocolo consiste na indução da LPA por lipopolissacarídeo (LPS). Assim, os camundongos foram previamente anestesiados e receberam, por instilação nasal, LPS (2,5mg/Kg) diluído em 40 $\mu\text{L}$  de solução salina estéril. O grupo controle recebeu apenas 40 $\mu\text{L}$  do veículo estéril via intranasal. Os animais foram mantidos em condições normais de alimentação e água por 72h. Após o desafio com LPS ou veículo os animais

foram tratados três vezes: 1, 24 e 48 horas após o desafio e 72 horas após o desafio os animais foram eutanasiados por overdose anestésica, pela administração intramuscular (i.m.) de solução anestésica contendo 29 mg/mL de quetamina e 1,91 mg/mL de xilazina em solução salina (NaCl 0,9%) e, posteriormente, foi coletado o fluido do lavado broncoalveolar (BALF) para contagem de células (totais e diferenciais) e dosagens de proteínas totais e citocinas.

### 3.5.1.1 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais (n=6/grupo)  
**1.** Grupo Basal: animais saudáveis (não desafiados com LPS e tratados com veículo; **2.** Grupo LPS: animais desafiados com LPS e tratados com veículo; **3.** Grupo GT50: animais desafiados com LPS e tratados com o gama-terpineno (GT) na dose de 50 mg/kg; **4.** Grupo GT25: animais desafiados com LPS e tratados com o gama-terpineno (GT) na dose de 25 mg/kg; **5.** Grupo GT12,5: animais desafiados com LPS e tratados com o gama-terpineno (GT) na dose de 12,5 mg/kg. Foram realizados três tratamentos nos tempos 1, 24 e 48 horas após o desafio com o LPS (Tabela 2).

**Tabela 2. Grupos de camundongos BALB/c no protocolo de Lesão Pulmonar Aguda.**

<b>Grupo</b>	<b>Desafio/LPS</b>	<b>Tratamento</b>
Basal	Não	Veículo
LPS	Sim	Veículo
GT50	Sim	GT dose 50 mg/kg
GT25	Sim	GT dose 25 mg/kg
GT12,5	Sim	GT dose 12,5 mg/kg

LPS: lipopolissacarídeo

### **3.5.1.2 Contagem de células Totais e Diferenciais no BALF no protocolo de Lesão Pulmonar Aguda**

Para quantificação do número total de células e do número de células diferenciais, no fluido do lavado bronco alveolar (BALF) dos animais submetidos à lesão pulmonar aguda, no dia 4º do protocolo experimental (72 h após o desafio), os animais foram anestesiados, as traqueias foram expostas com auxílio de pinça e tesoura cirúrgica, os lobos da glândula tireoide foram retirados e então inserido um cateter periférico IV-18G de poliuretano (Descarpack) para a coleta do BALF. No cateter foi conectada uma seringa contendo 1 mL de HBSS-/- 8°C, que foi administrado na traqueia no sentido pulmão, sendo realizado a lavagem e coleta do BALF. O fluido coletado foi transferido para um tubo tipo eppendorf e armazenado no banho de gelo, para preservar a viabilidade celular. Uma alíquota do BALF (10 µL) foi retirada e adicionada, na proporção 1:10 a de solução de Turk (90 µL) (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), levada a câmara hemocitométrica (Neubauer), sendo realizada a contagem das células totais no microscópio óptico (40 X - BX40, OLYMPUS). Após a contagem das células totais, o BALF foi centrifugado (centrífuga CR422, JONAM) em 1000 RPM a 4°C por 5 minutos. Os sobrenadantes foram retirados, alíquotados e armazenados em freezer para posterior quantificação das citocinas e dosagem de proteínas totais (BEZERRA-SANTOS et al., 2006). O pellet do BALF foi ressuspenso em 500µL de HBSS-/- e homogeneizado, em seguida foi retirado 200 µL do BALF, adicionados em lâminas e centrifugadas na citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). As lâminas contendo as células foram fixadas, coradas pelo método panótico (Kit Panótico, Renylab) e contadas de forma diferencial em microscopia óptica.

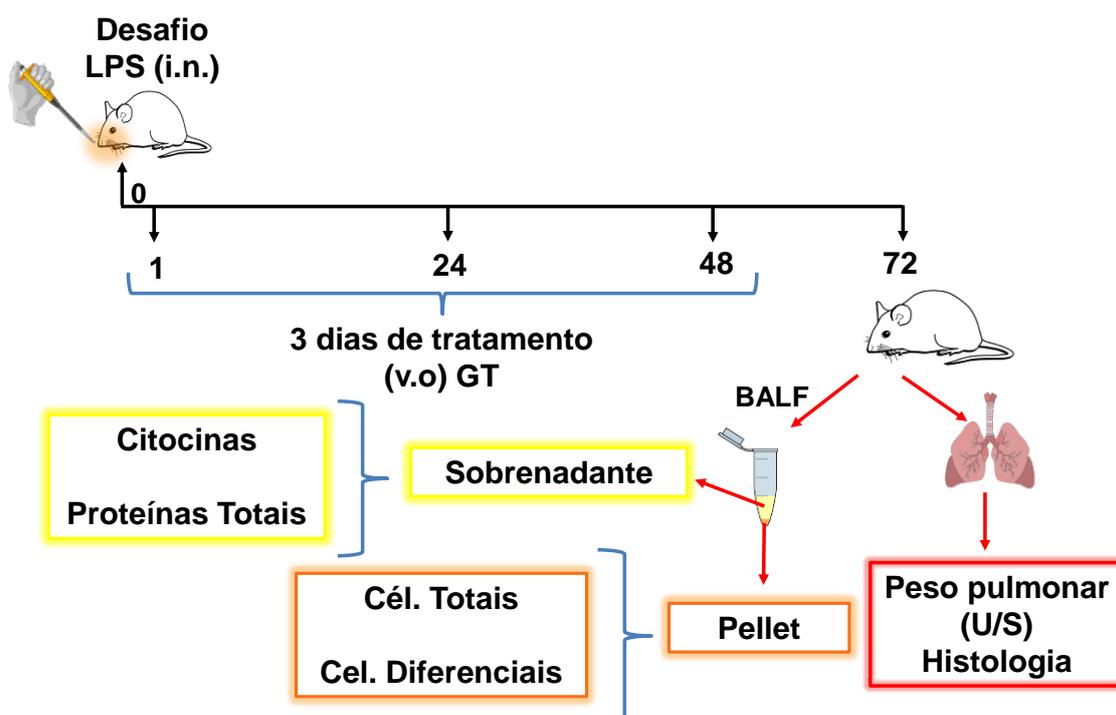
### **3.5.1.3 Quantificação de Proteínas Totais e Taxa de Pulmão Úmido/Seco (U/S)**

Para quantificar proteínas totais do BALF foi utilizado o método do reativo do biureto. Os íons cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) em meio alcalino presentes no Reagente de Biureto reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, proporcional à concentração das proteínas na amostra.

A absorbância das amostras foi mensurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Após 72h do protocolo experimental, os pulmões direitos foram retirados de todos os grupos experimentais e pesados para obter o peso "úmido" do órgão. Para obter o peso "seco" dos pulmões, os órgãos foram colocados em placas de Petri e incubados a 60 °C por 48 h e após esse período os pulmões foram pesados. O índice de edema pulmonar foi calculado pela proporção do peso molhado pelo peso seco dos tecidos pulmonares (relação U/S).

Figura 9. Resumo do protocolo de lesão pulmonar aguda (LPA).



Camundongos foram desafiados, por instilação nasal, com LPS (2,5mg/kg). Após o desafio com LPS ou veículo os animais foram tratados três vezes: 1, 24 e 48 horas após o desafio e 72 horas após o último tratamento os animais foram eutanasiados por overdose anestésica, para obtenção do BALF e retirada dos pulmões.

### 3.5.2 Rinite alérgica experimental

O modelo de rinite alérgica experimental foi desenvolvido tendo como base o protocolo experimental descrito por Yingkun e colaboradores (2013) com algumas modificações. Nos dias 0 e 12, os camundongos foram sensibilizados com a injeção de 10 µg/mL de uma suspensão contendo 50

$\mu\text{g/mL}$  de ovalbumina (OVA) grade V (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) e 10  $\text{mg/mL}$  de  $\text{Al(OH)}_3$  (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) em solução salina por via intraperitoneal (i.p.). Entre os dias 19 e 23, os animais foram desafiados com aerossol de OVA grade II (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) a 5% em solução salina. Os desafios foram realizados diariamente, durante 30 minutos, em uma câmara fechada, sob um fluxo contínuo de aerossol, com o auxílio de um nebulizador ultra-sônico em duas etapas. A primeira etapa foi dos dias 19 a 23 e após um intervalo de 7 dias ocorreu a segunda etapa, compreendida dos dias 30 a 34. Uma hora antes cada desafio das duas etapas os animais foram tratados com o GT (12,5; 25 e 50  $\text{mg/kg}$ ), droga padrão ou veículo.

### **3.5.2.1 Grupos Experimentais**

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais ( $n=6/\text{grupo}$ ) **1.** Grupo Basal: animais saudáveis (não sensibilizados, porém desafiados com OVA e tratados com veículo; **2.** Grupo OVA: animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com veículo; **3.** Grupo GT50: animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com o gama-terpineno na dose de 50  $\text{mg/kg}$ ; **4.** Grupo GT25: animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com o gama-terpineno na dose de 25  $\text{mg/kg}$ ; **5.** Grupo GT12,5: animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com o gama-terpineno na dose de 12,5  $\text{mg/kg}$ . **6.** Grupo Dexa: animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com dexametasona (2  $\text{mg/kg}$ ). Foram feitos 4 tratamentos na primeira etapa de desafios e 4 tratamentos na segunda etapa de desafios, sendo estes sempre efetuados uma hora antes cada desafio (Tabela 3).

Tabela 3. Disposição dos grupos animais na rinite.

Grupos	Sensibilização-OVA	Desafio-OVA	Tratamento
Basal	Não	Sim	Veículo
OVA	Sim	Sim	Veículo
GT50	Sim	Sim	GT dose 50 mg/kg
GT25	Sim	Sim	GT dose 25 mg/kg
GT12,5	Sim	Sim	GT dose 12,5 mg/kg
Dexa	Sim	Sim	Dexametadona 2 mg/kg

OVA: ovalbumina

### 3.5.2.2 Sinais clínicos

Os sinais clínicos, tais como espirros e fricções nasais, dos animais no protocolo de rinite foram avaliados tendo como base o protocolo experimental de Saito e colaboradores (2002). Os animais foram analisados individualmente em cada grupo imediatamente após o último desafio com OVA (34º dia do protocolo). Os parâmetros avaliados foram: a.) contagem do número de espirros e b.) movimentos de prurido nasal (fricções nasais). Estes foram avaliados por 10 minutos com o auxílio de uma câmera de filmagem e posterior contagem.

### 3.5.2.3 Coleta do Fluido do Lavado Nasal (NALF)

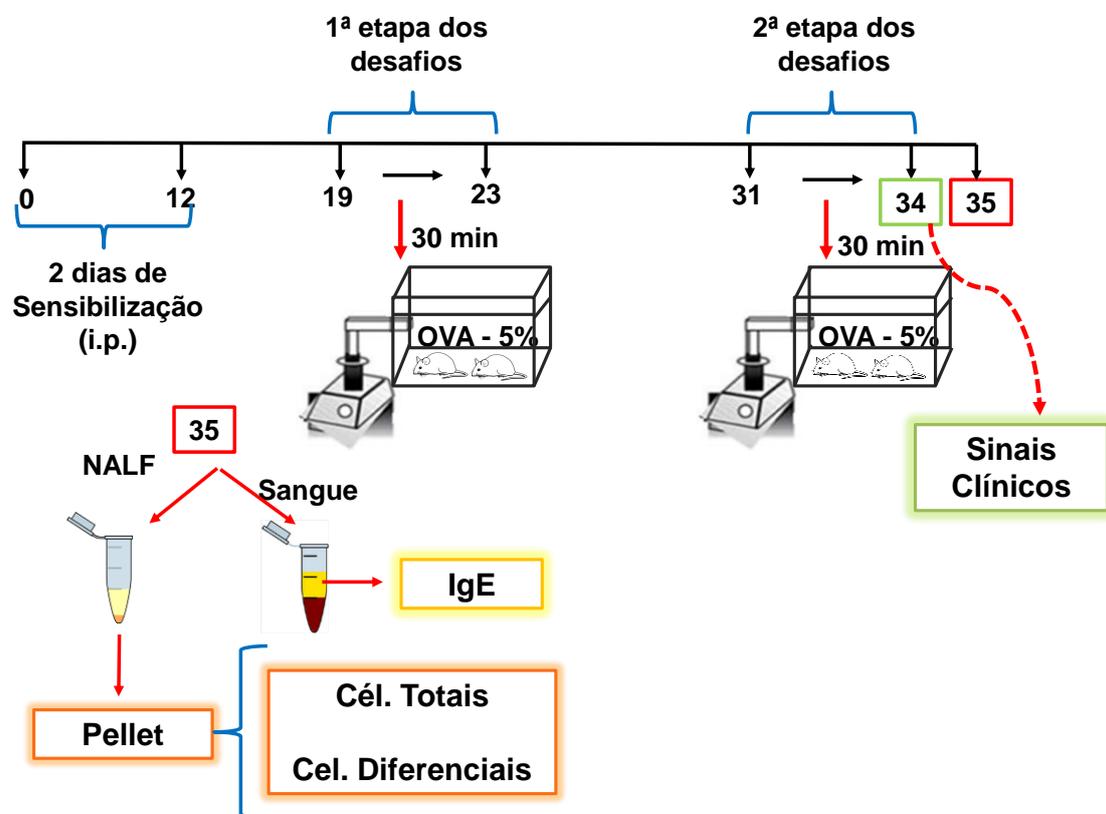
O NALF foi coletado no 35º dia do protocolo experimental, 24 horas após o último desafio. O NALF foi realizado com 1mL de HBSS+/- a 8°C, injetado na nasofaringe do animal pela traqueia, sentido traqueia-nariz. O fluido foi coletado e armazenado para posterior contagem de células (Figura 10).

### 3.5.2.4 Contagem Total e Diferencial de Células do NALF

A contagem do número total de células no NALF foi realizada em câmara hemocitométrica. O NALF foi diluído (1:2) em solução de Turk (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) e a contagem das células totais foi realizada no

microscópio óptico (40x - BX40, OLYMPUS). Os tubos do tipo *ependorf* contendo o NALF, foram centrifugados (centrífuga CR422, JONAM) a 1000 rpm, em uma temperatura de 4°C, por 5 minutos. Os sobrenadantes foram separados e o *pellet* foi ressuspenso em 300µL de HBSS-/- . Este foi então homogeneizado, retirados 200 µL de cada NALF e uma gota da suspensão celular colocada em lâminas e estas centrifugados no citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método panótico (Kit Panótico, Renylab). A contagem diferencial de células foi realizada por microscopia óptica (40x). Cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células, utilizando para isso a objetiva de imersão (100x), os leucócitos contados foram divididos em quatro classes: macrófagos; linfócitos; neutrófilos e eosinófilos.

Figura 10. Resumo do protocolo de Rinite Alérgica



Camundongos foram sensibilizados (i.p.) nos dias 0 e 12 com OVA e desafiados em duas etapas: de 19 a 23 e de 31 a 34. Uma hora antes cada desafio os animais foram tratados com GT (12,5; 25 e 50 mg/kg), dexametasona ou salina.

### **3.5.3 Inflamação pulmonar alérgica experimental – protocolo de asma experimental**

O protocolo experimental de asma consistiu na sensibilização de camundongos BALB/c fêmeas via a injeção intraperitoneal (i.p.) de 0,2 mL de uma suspensão contendo 10 µg de OVA (grade V e 0,2 g de hidróxido de alumínio, no primeiro e décimo dias. No período entre os dias 19 a 24 após a sensibilização, os animais foram desafiados com aerossol de OVA 1% dissolvido em salina 0,9 % durante 20 minutos em uma câmara fechada (LLOYD et al., 2001), procedendo sempre com o pré-tratamento dos animais uma hora antes de cada desafio, sendo estes grupos: salina, GT 12,5; 25 ou 50 mg/kg ou droga padrão dexametasona. Imediatamente após o último dia de desafio, os animais foram submetidos à testes respiratórios e comportamentais. No 25º dia, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésicos (xilazina 20 a 30 mg/kg + quetamina 200 a 300 mg/kg) para procedimento com técnicas imunológicas.

#### **3.5.3.1 Grupos Experimentais**

Os animais foram divididos em sete grupos experimentais (n=6/grupo) **1.** Grupo Basal: animais saudáveis (não sensibilizados, mas desafiados com OVA e tratados com veículo); **2.** Grupo OVA: animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com veículo; **3.** Grupo GT50: animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com o gama-terpineno na dose de 50 mg/kg; **4.** Grupo GT25: animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com o gama-terpineno na dose de 25 mg/kg; **5.** Grupo GT12,5: animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com o gama-terpineno na dose de 12,5 mg/kg. **6.** Grupo Dexa: animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com dexametasona (2 mg/kg). **7.** Grupo DZP: animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com diazepam (1 mg/kg). Foram feitos quatro tratamentos sempre uma hora antes cada desafio com OVA (Tabela 4).

Tabela 4. Disposição dos grupos animais na asma.

Grupos	Sensibilização-OVA	Desafio-OVA	Tratamento
Salina	Não	Sim	Veículo
OVA	Sim	Sim	Veículo
GT50	Sim	Sim	GT dose 50 mg/kg
GT25	Sim	Sim	GT dose 25 mg/kg
GT12,5	Sim	Sim	GT12,5 dose 12,5 mg/kg
Dexa	Sim	Sim	Dexametasona 2 mg/kg
DZP	Sim	Sim	Diazepam 1 mg/kg

OVA: ovalbumina

### 3.5.3.2 Análise Comportamental

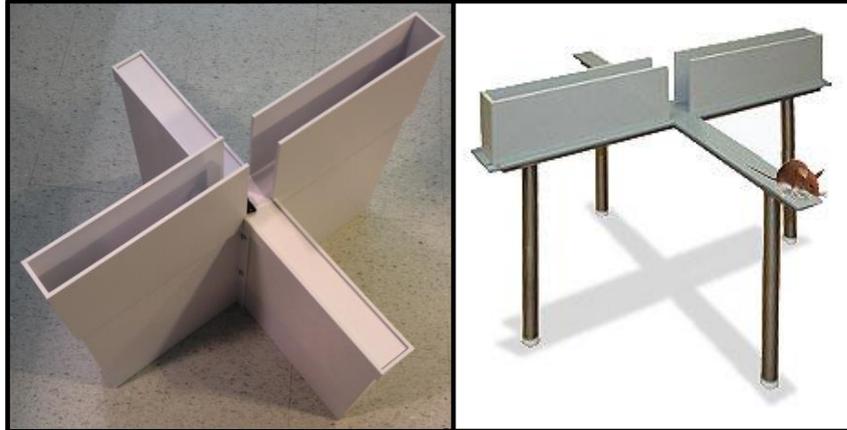
Imediatamente após o último desafio alérgico (22°), os animais foram avaliados com relação à presença de sinais comportamentais de ansiedade, utilizando os testes do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e da Placa Perfurada (PP). Para análise comparativa, foi utilizado como droga padrão o diazepam (DZP) na dose de 1 mg/kg.

#### a) Teste do Labirinto em cruz elevado

O aparelho utilizado neste experimento é constituído de material acrílico cinza (introspecção®, São Paulo, Brasil) e apresenta dois braços abertos (30 cm x 5 cm x 15 cm) e dois braços fechados (30 cm x 5 cm x 15 cm) irradiando do centro da plataforma (5 x 5 cm) para formar um sinal de mais (+). O aparelho é elevado a uma altura de 38,5 cm, e colocado dentro de uma sala de som atenuado (Figura 11). A análise se inicia ao colocar um animal na plataforma central do labirinto, de frente para um dos braços abertos, sendo que estes foram pré-tratados de acordo com o protocolo experimental. O número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos foram contados durante um período de teste de 5 minutos. O critério de entrada em um dos braços só era considerado quando o animal posicionava as quatro patas no seu interior (BIALA e KRUK, 2008). Os testes de LCE foram

realizados no laboratório de Psicofarmacologia do CCS/UFPB, João Pessoa, PB.

**Figura 11. Labirinto em Cruz Elevado (LCE).**

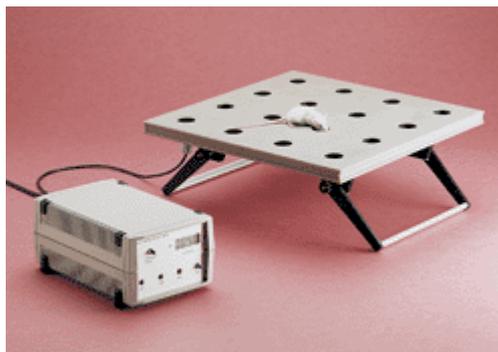


Fonte: [https://www.google.com.br/search?q=elevated+plus+maze&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwie2NTckLDZAhXMf5AKHdHqAK0Q\\_AUICigB&biw=1366&bih=613](https://www.google.com.br/search?q=elevated+plus+maze&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwie2NTckLDZAhXMf5AKHdHqAK0Q_AUICigB&biw=1366&bih=613). Acessado: 07.03.18 as 9h

#### **b) Teste da Placa Perfurada (PP)**

O aparelho de Placa Perfurada (Ugo Basile-Itália, modelo 6650), utilizado para o teste consiste em uma plataforma de formato quadrado, medindo 40 x 40 cm, contendo 16 orifícios de 3 cm de diâmetro, acoplados a fotocélulas sensíveis ao mergulho da cabeça do animal, as quais são conectadas à central que registra, de forma cumulativa, o número de mergulhos e contém dispositivos para ligar e zerar o aparato. Essa estrutura é posicionada a 18 cm do balcão, através de dois suportes localizados nas duas laterais do mesmo (Figura 12). O teste baseia-se no fato de animais ansiosos explorarem menos o aparelho e animais tratados com drogas ansiolíticas fazerem o oposto (LIMA et al., 2013). Os testes PP foram realizados no laboratório de Psicofarmacologia da UFPB.

**Figura 12. Placa Perfurada (PP).**



Fonte: <<https://www.ottoenvironmental.com/shopexd.asp?id=7929&bid=True>> Acessado: 07.03.18 as 9h

### **3.5.3.3 Análise da expressão do Fos no tecido cerebral**

Entre 90 a 120 minutos após o desafio com OVA, cada animal foi anestesiado com quetamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg i.p. (intraperitoneal) e foi realizado a perfusão transcardíaca com solução salina 9% (50 mL) e posteriormente com formaldeído 4% (paraformaldeído 350 mL) para fixar o tecido cerebral. Em seguida os encéfalos foram removidos, pós-fixados no mesmo fixador por 2 horas e acondicionados em solução sacarose 30%. Os encéfalos foram microtomizados por congelamento (30  $\mu$ m) em criostato e os cortes do tecido cerebral foram divididos em 4 séries de cortes alternados para contemplar as várias regiões do encéfalo.

- **Coração do tecido cerebral por imunohistoquímica**

Os cortes do tecido encefálico foram marcados com anticorpos específicos para a proteína c-fos pela técnica de imunohistoquímica. A técnica consiste inicialmente em lavagens com tampão fosfato 0,1M (PBS). Os cortes dos tecidos cerebrais, *free floating*, foram submetidos a um pré-tratamento com uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,3 % em PB 0,1M com Triton X-100 (TXPB) durante 30 minutos em agitador orbital para inativação da peroxidases endógenas. Após esse período os cortes de tecido foram incubados em TXPB com o anticorpo primário anti-cFos de coelho (Calbiochem; 1:10.000), acrescido de soro de fetal bovino (1:1000; Jackson Laboratories) e incubados por 12 horas (*overnight*). Após esse período, os cortes de tecidos foram

lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário (Jackson Laboratories; 1:1000) diluído em TXPB, por 2 horas. Os cortes de tecido foram, novamente lavados em PBS e incubados por 2 horas em solução de avidina-biotina-peroxidase (kit ABC, Vector, 1:333) diluídos em PBS. Os cortes foram novamente lavados em PBS e incubados com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) 0,05 % e sulfato de amônio e níquel (NAS) 0,05 %, acrescidos de peróxido de hidrogênio 0,01 % por aproximadamente 6 minutos. A reação foi bloqueada com lavagens em PBS e em agitador orbital.

O tecido cerebral foi analisado em microscópio óptico de campo claro. Os núcleos paraventricular do hipotálamo (PVN) e central da amígdala (CeA) foram identificados com o auxílio do Atlas Estereotático de Encéfalo de Camundongo (Paxinos e Franklin, 2008). Essas estruturas foram analisadas e tiveram suas áreas medidas bilateralmente em 2 níveis utilizando o programa NIS (Nikkon). As áreas de cada núcleo de interesse foram então somadas resultando em uma área total que foi usada como uma forma de correção proporcional da contagem. A Tabela 5 descreve as áreas de interesse e suas correspondências aproximadas com o Atlas Estereotático de Encéfalo de Camundongo (Paxinos e Franklin, 2008). Na sequência, os neurônios imunorreativos ao c-Fos foram contados bilateralmente dentro destas áreas utilizando o programa NIS (Nikkon). Apenas os neurônios cuja marcação estivesse bem acima da coloração de fundo foram contados. O resultado está expresso em neurônios c-Fos por  $\text{mm}^2$ , usando como base as áreas previamente medidas.

**Tabela 5. Núcleos cujos neurônios c-Fos foram contados e suas respectivas correspondências de áreas de contagem com Paxinos e Franklin (2008)**

<b>Núcleos</b>	<b>Nível 1</b>	<b>Nível 2</b>
Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN)	Pranchas 37/38	Pranchas 39/40
Núcleo Central da Amígdala (CeA)	Pranchas 41/42	Pranchas 43/44

### 3.5.3.4 Coleta de sangue e obtenção do soro

No 23º dia, os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de quetamina e xilazina, eutanasiados e coletado o sangue pelo plexo braquial para a obtenção do soro. Para tal, foi realizada uma incisão no plexo braquial e o sangue foi coletado com auxílio de uma pipeta *pasteur*, pela qual foi aspirado cerca de 0,6 à 1 mL de sangue. O sangue foi armazenado em tubos tipo *ependorfs* inclinados a 45º e estocados em geladeira por 24 h, facilitando a formação dos coágulos e coleta dos soros. Após a separação do soro, esses foram centrifugados a 1.500 rpm, a 4ºC por 10 minutos e novamente foi realizada uma segunda centrifugação para separar o soro das hemácias que por ventura ficaram no soro. Em seguida, as amostras foram estocadas, etiquetadas e congeladas à -20 °C para posterior utilização no teste de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA). A partir do PCA foi determinado o título sérico de IgE OVA-específica dos seis grupos de animais em experimentação (grupos basal, OVA, GT 12,5, 25 e 50 mg/kg, bem como a padrão dexametasona). Para o teste do PCA, os soros dos camundongos BALB/c foram descongelados e diluídos (razão 2) em salina e administrados 50 µl de cada soro via subcutânea (s.c.), em diferentes sítios do dorso de ratas Wistar (n=5). As diluições testadas foram 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 e 1:2048. Cada soro foi testado em diferentes ratas, as quais foram previamente depiladas e anestesiadas com solução de xilazina e quetamina. Após 48 h as ratas foram novamente anestesiadas e suas caudas lavadas com água para administração na veia de 0,5 mL de uma solução contendo o corante Azul de Evans a 1% (VETEC) e 2,0 mg de OVA (grade II – SIGMA). Decorridos 30 minutos da injeção na veia da cauda, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os diâmetros das manchas formadas no dorso foram mensurados a partir da soma das duas maiores medidas e sua divisão por dois, realizadas com o auxílio de uma régua milimétrica. O título do soro fornece, portanto, uma medida indireta da concentração de IgE OVA-específica nos grupos de animais testados e este foi determinado pela maior diluição capaz de promover mancha mensurável  $\geq 5$  milímetros (COSTA et al., 2008).

### 3.5.3.5 Coleta do Fluido do Lavado Pulmonar (BALF)

O BALF foi coletado no 23º dia do protocolo experimental, 24 horas após o último desafio. O BALF foi coletado com 1 mL de HBSS+/- a 8 °C, injetado na traqueia do animal. O fluido foi coletado para posterior contagem total de células no BALF em câmara hemocitométrica (Neubauer). O BALF foi diluído (1:4) em solução de Turk (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) e a contagem das células totais foi realizada no microscópio óptico (40x - BX40, OLYMPUS). Os tubos foram centrifugados (centrífuga CR422, JONAM) a 1000 rpm, em uma temperatura de 4 °C, por 5 minutos. Os sobrenadantes foram coletados, aliquotados e armazenados para posterior quantificação de citocinas e o *pellet* foi ressuspenso em 300 µL de HBSS-/. Este foi então homogeneizado, retirados 200 µL de cada BALF colocados em lâminas e centrifugados no citospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). As lâminas obtidas foram fixadas e coradas pelo método panótico (Kit Panótico, Renylab). A contagem diferencial de células foi realizada por microscopia óptica. Cada lâmina foi percorrida até a contagem de 100 células, utilizando para isso a objetiva de imersão (100x). Os leucócitos contados foram divididos em quatro classes: macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos. A partir da ressuspensão do *pellet* também foram feitas técnicas de citometria de fluxo.

### 3.5.3.6 Quantificação das citocinas no BALF

As citocinas presentes nos sobrenadantes do BALF de camundongos sensibilizados e desafiados foram quantificadas pelo método de ELISA, de acordo com o protocolo especificado no *Kit* do fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA). Placas de ELISA (NUNC-Immuno™) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluídos em tampão fosfato pH 6.5 (1:1000, 1:250, 1:250, 1:1000, e 1:1000, respectivamente) e incubadas por 18 h a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05 % de *tween* 20 (PBST) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO-USA) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10 % de SFB), por uma hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e adicionadas tanto as

amostras a serem analisadas, quanto diferentes concentrações das citocinas recombinantes, para a realização da curva. As placas foram novamente incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram, então, lavadas e o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotilado foi adicionado às placas e incubadas por uma hora. Posteriormente, foram novamente lavadas e o complexo enzimático avidina-peroxidase (*avidin-HRP*) foi adicionada. As placas foram incubadas por mais meia hora à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1 N e a leitura realizada em leitor de placa (MICROPLATE READER versa Max, tunable, BN 2529 Molecular Devices) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão. Foram quantificadas citocinas do protocolo de LPA e de asma.

### 3.5.3.7 Citometria de Fluxo

A análise do perfil celular presente no BALF, por citometria de fluxo, permite a distinção de populações celulares heterogêneas a partir de parâmetros como “*forward-scattered light*” (FSC) e “*side-scattered light*” (SSC), os quais distinguem as células pelo tamanho (difração da luz) e granularidade (difusão da luz), respectivamente. A análise da granularidade dos linfócitos é identificada por FSC<sup>lo</sup>/SSC<sup>lo</sup> e a de granularidade por SSC<sup>hi</sup> (VAN RIJT et al., 2004). Todos os grupos de animais foram analisados nos parâmetros FSC e SSC, bem como na expressão de p65NFkB (PE) e as MAPKs: p38MAPK (PE-Cy7), ERK1/2 (PE), JNK (PE) e AKT (Alexa) para o protocolo de asma. No protocolo experimental de LPA foram analisadas: a expressão do TLR4 (PE), ativação de p38MAPK (PE-Cy7) e p65NFkB (PE). Para desenvolvimento da técnica foi seguido o protocolo segundo o Kit. A análise dos resultados foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCalibur II, Becton Dickinson) equipado com laser de íons de argônio de 15mW em 488nm, resfriado a ar. A fluorescência verde emitida pelo isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi detectada após passagem em filtro de 530nm (FL1). A fluorescência laranja da

ficoeritrina (PE) foi detectada após passagem em filtro de 585nm (FL2) e a fluorescência vermelha alofococianina (APC) em filtro de 660 nm (FL3). Foram adquiridos 10.000 eventos em todas as análises.

#### **3.5.4 Coleta dos pulmões (asma experimental) e cabeças (rinite experimental) para as análises histológicas**

Para as coletas dos pulmões e das cabeças oriundos dos protocolos experimentais de asma, LPA e rinite, os camundongos foram eutanasiados e, em seguida, no limite das costelas com o diafragma, a cavidade torácica do animal foi aberta e realizada a perfusão cardíaca. A perfusão consistiu na administração de 20 mL de solução salina no coração para retirada do sangue da circulação sanguínea e a lavagem do pulmão possibilitando sua coleta. As cabeças dos animais foram coletadas após a coleta do pulmão e submetidas a uma rápida lavagem com solução salina possibilitando sua fixação. Imediatamente após a coleta do material biológico, esses foram submetidas à fixação em formalina tamponada por no mínimo 24 h e em seguida lavadas em água corrente. A fixação garante a manutenção da integridade do tecido, evitando a sua degradação por enzimas presentes no interior das células (autólise) ou por bactérias, além de preservar a estrutura e a composição celular. Após a coleta, o material foi registrado no livro de protocolo. Por meio desse registro, o material foi identificado por um número, tipo de experimento, datas, órgãos que o acompanhou durante todos os procedimentos da técnica histológica. Cada órgão foi inserido em um cassete devidamente identificado para facilitar o manuseio durante o processo evitando possíveis trocas.

Posteriormente à fixação, o excesso de pele das cabeças foi retirado, a mandíbula inferior e os olhos foram removidos e o crânio seccionado na região posterior, entre o terceiro dente superior e a abertura posterior do ducto faríngeo (nasofaringe) (GUIBAS et al., 2014). Em seguida, as narinas foram submetidos à descalcificação química pelo auxílio de um agente quelante, o EDTA, durante uma média de 15 dias. As narinas foram suspensas no líquido descalcificador, com o volume igual ou superior a vinte vezes o volume da peça. A solução descalcificadora foi trocada diariamente e, quando possível, o

frasco foi submetido à agitação. Após 10 dias foi realizado o teste físico da agulha para assegurar que ocorreu a descalcificação. Uma vez obtida a completa descalcificação das amostras, estas foram lavadas para retirada do fixador e foi dado prosseguimento ao processamento histológico.

O material histológico foi então desidratado por imersões de 1 hora numa série crescente de álcool etílico a 70, 80, 90 e 100%. Em seguida, foi feita a diafanização, na qual o material foi imerso duas vezes em xilol com duração de 1 h cada imersão, seguido do processamento em parafina. Na impregnação, as amostras foram submetidas a dois banhos sucessivos em parafina, cada banho com duração de 1 h. Após impregnação, o material histológico foi emblocado em formas de parafina. Quando o material foi totalmente imerso, cada fôrma foi deixada ao ar livre para solidificação da parafina. Os blocos formados foram retirados das fôrmas e, em seguida, foram realizados os cortes histológicos no micrótomo.

Os cortes histológicos foram realizados com espessura de 5  $\mu\text{m}$ . Após a microtomia, as fitas de parafina obtidas foram colocadas em banho-maria (38 – 40 °C). Com auxílio das lâminas, os cortes foram “pescados” do banho-maria. Em seguida, as lâminas foram reservadas para secagem e coradas com hematoxilina-eosina (H&E), ácido periódico de Shiff (PAS), azul de toluidina (AT) e tricômico de gomori (TG). As fotografias digitais foram capturadas pela câmera Moticam 5.0 MP acoplada a um microscópio óptico. As imagens foram calibradas no programa MOTIC PLUS em definições específicas conforme a objetiva utilizada: 10x ou 40x. As imagens foram analisadas pelo software Image J que analisa a quantidade de pixels e em seguida, gera os histogramas das áreas mensuradas previamente, comparando os grupos em questão.

Os dados das análises histológicas foram analisados em score histológico, onde foram avaliados: infiltração celular, produção de muco, quantidade de fibras colágenas e número de mastócitos, conforme as colorações utilizadas (Tabela 6).

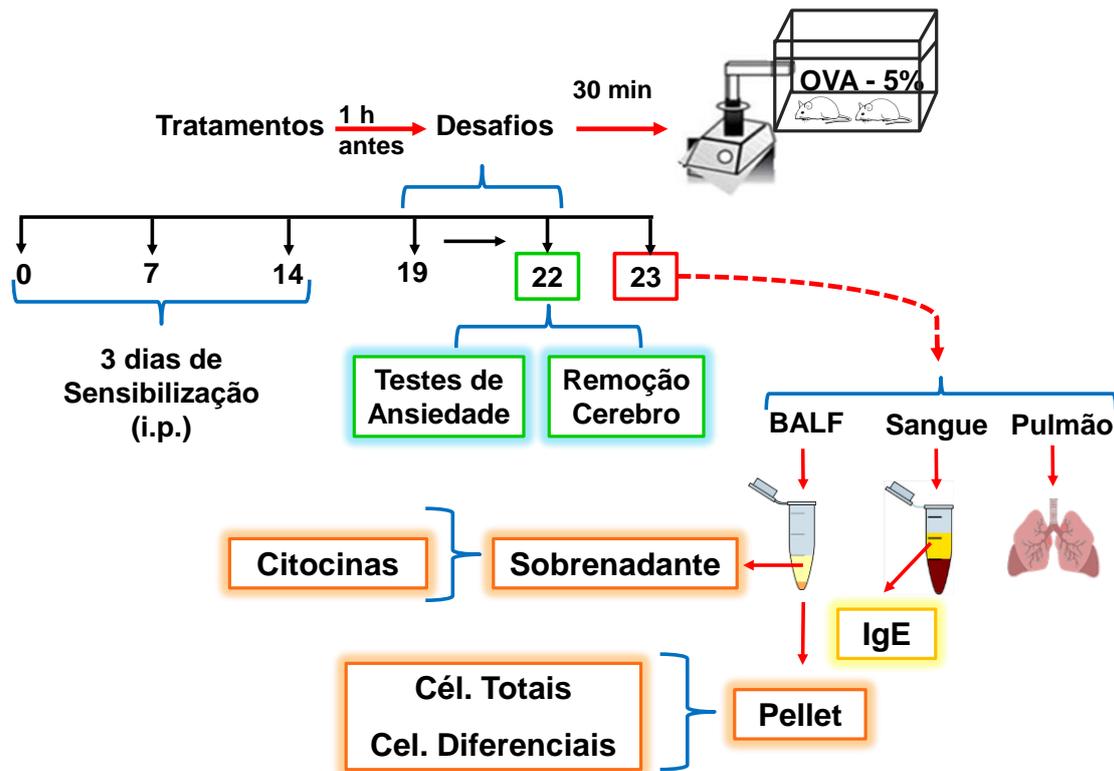
**Tabela 6. Parâmetros e scores do material biológico (pulmões e foças nasais) nas análises histológicas**

<b>Score</b>	<b>Infiltrado, muco e fibras colágenas</b>
0	Ausência de alterações histológicas
1	Grau leve: menos de 25% do campo microscópico
2	Grau moderado: de 25 a 49% do campo microscópico
3	Grau acentuado: de 50 a 75% do campo microscópico
4	Grau muito acentuado: mais de 75% do campo microscópico

<b>Score</b>	<b>Mastócitos</b>
0	Menos de 5 células por campo
1	De 5 a 15 células por campo microscópico
2	De 16 a 25 células por campo microscópico
3	De 26 a 35 células por campo microscópico
4	Mais de 35 células por campo microscópico

Fonte: adaptado Ponikau et al., 2003

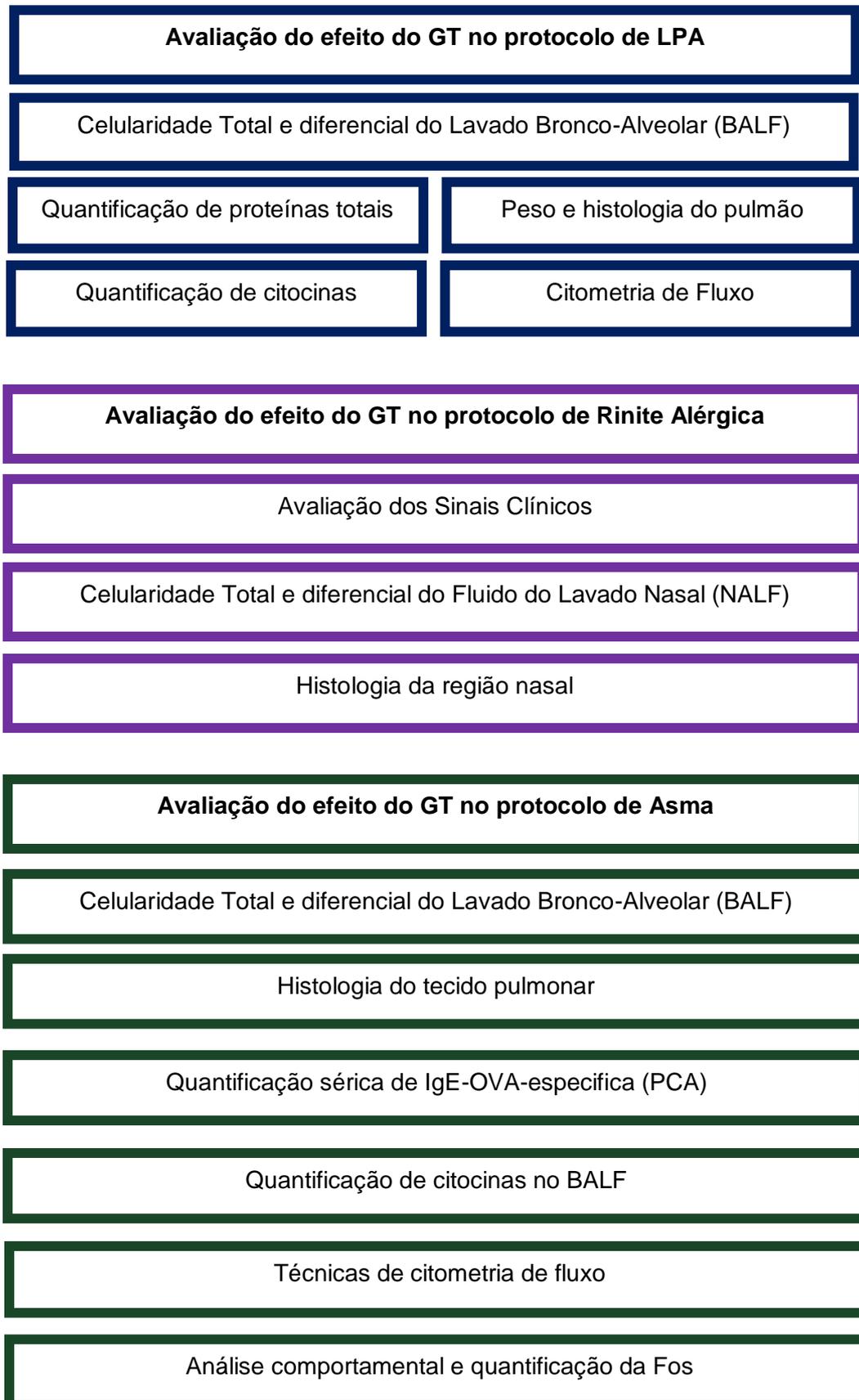
Figura 13. Resumo do protocolo de Inflamação Pulmonar Alérgica Experimental



Animais foram sensibilizados nos dias 0, 7 e 14<sup>o</sup> e desafiados dos dias 19 a 22, sendo estes tratados 1h antes de cada desafio, com GT ou droga padrão. No último desafio, os animais foram levados a testes comportamentais ou o cérebro foi retirado. Após 24h do último desafio, os animais foram eutanaziados para coleta do BALF, sangue e pulmão.

### 3.6 RESUMO DA METODOLOGIA

Figura 14. Resumo esquemático da metodologia utilizado no estudo do GT.



### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados usando o programa Graph Pad Prism<sup>®</sup> versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.). Para analisar os dados do Citômetro de Fluxo foi utilizado inicialmente o programa FlowJo e posteriormente as análises estatísticas foram feitas no Graph Pad Prism. Os resultados obtidos foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), usando o teste ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey. Os valores de foram considerados significantes quando o  $p < 0,05$ . Valores de #  $<0,05$ ; ##  $p < 0,001$  ###  $p < 0,0001$  foram considerados significativos quando comparados com o grupo basal e \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*  $p < 0,0001$  foram considerados significativos quando comparados com o grupo LPS ou OVA.

# *RESULTADOS*

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeito do tratamento com Gama Terpineno (GT) na migração de células inflamatórias para a cavidade broncoalveolar de animais com Lesão Pulmonar Aguda (LPA)

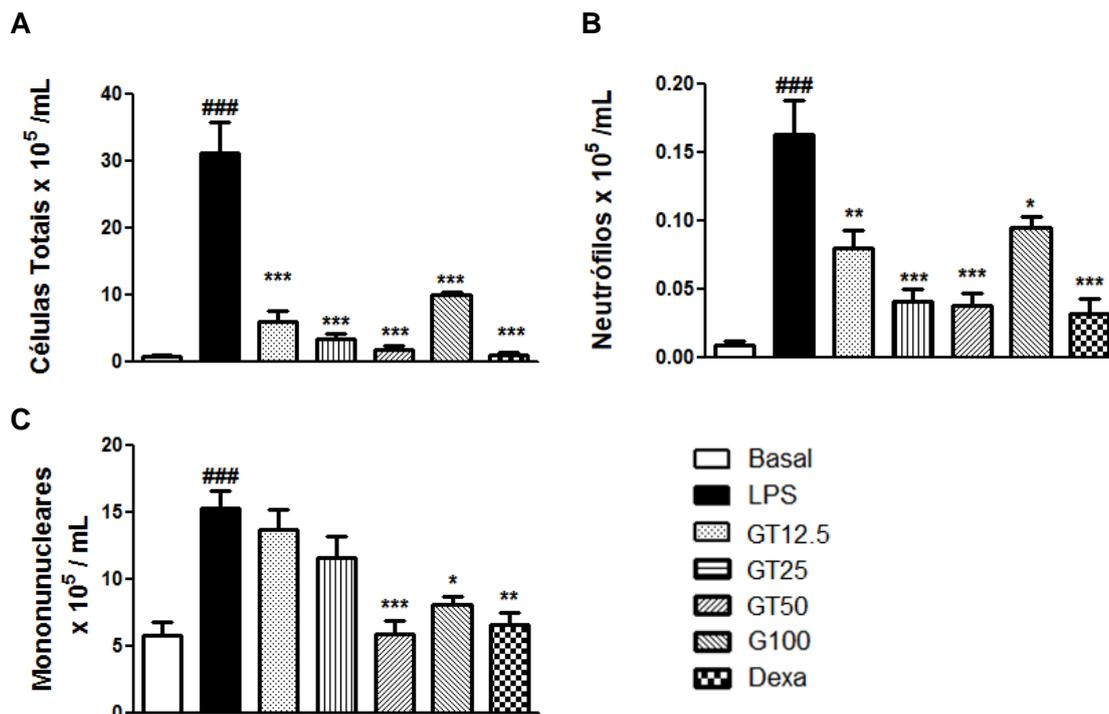
Os camundongos BALB/c desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) e tratados por três dias (1, 24, 48 horas após o desafio) com o GT a 12,5; 25; 50 ou 100 mg/kg apresentaram, no fluido do lavado broncoalveolar (BALF), diminuição significativa na migração de células totais ( $6,033\pm 4,983$ ;  $3,263\pm 2,692$ ;  $1,828\pm 2,002$ ;  $9,906\pm 1,253$ ; respectivamente,  $p<0,0001$ ) e de neutrófilos ( $0,0800\pm 0,03184$ ,  $p<0,001$ ;  $0,0404\pm 0,0246$ ,  $p<0,0001$ ;  $0,0377\pm 0,0246$ ,  $p<0,0001$ ;  $0,0947\pm 0,0188$ ,  $p<0,05$ ; respectivamente), quando comparado ao grupo LPS (células totais -  $31,16\pm 13,49$ ; neutrófilos -  $0,1628\pm 0,0750$ ).

Em relação às células mononucleares, apenas as doses de 50 e 100 mg/kg do GT foram capazes de diminuir, significativamente, o número dessas células ( $5,818\pm 2,604$ ,  $p<0,0001$ ;  $8,073\pm 1,210$ ,  $p<0,001$ ; respectivamente) quando comparados com o grupo LPS ( $15,24\pm 2,976$ ) (Gráfico 1A, B e C).

O grupo de animais tratados com a droga padrão dexametasona e desafiado com o LPS apresentou diminuição significativa nos quatro parâmetros analisados: número de células totais ( $1,021\pm 1,198$ ,  $p<0,0001$ ), neutrófilos ( $0,03197\pm 0,02518$ ,  $p<0,0001$ ) e células mononucleares ( $6,532\pm 2,158$ ,  $p<0,0001$ ), quando comparado com o grupo de animais do grupo LPS (Gráfico 1).

Esses resultados mostram que entre as doses do GT que promoveram efeito inibitório na migração de células para o espaço broncoalveolar dos animais com LPA, a dose de 50 mg/kg apresentou efeito semelhante à dose de 100mg/kg, portanto escolhemos, para dar continuidade ao trabalho, a menor dose com efeito inibidor do processo inflamatório na lesão pulmonar aguda.

**Gráfico 1. Efeito do tratamento com gama terpineno (GT) na migração de células totais e diferenciais para a cavidade pulmonar na lesão pulmonar aguda experimental**



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6/grupo) desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) foram tratados três vezes com GT nas doses de 12,5; 25; 50 ou 100 mg/kg uma hora, 24 e 48 horas após o desafio. Os animais foram eutanasiados com 72h e foi coletado o BALF para: **A.** células totais; **B.** neutrófilos; **C.** mononucleares. Os dados numéricos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; # p<0,05; ## p<0,001; ### p<0,0001; \* significativo em relação ao grupo LPS; \* p<0,05; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001.

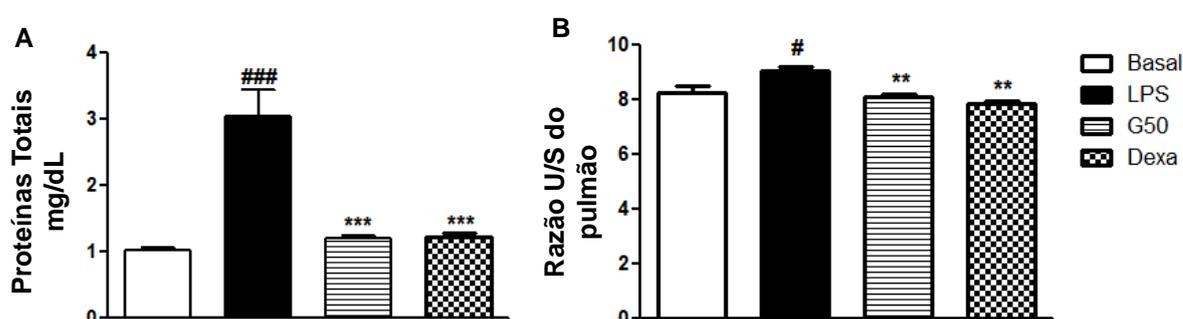
#### 4.1.1 Quantificação de proteínas e medida do peso pulmonar dos animais com lesão pulmonar aguda

O BALF foi retirado e realizado a quantificação de proteínas. O grupo LPS, quando comparado com o grupo basal apresentou aumento significativo ( $3,053 \pm 0,9677$  vs  $1,025 \pm 0,1051$ ,  $p < 0,0001$ ) na quantificação de proteínas totais, enquanto que o tratamento com GT na dose de 50 mg/kg (GT50) diminuiu significativamente a sua concentração ( $1,208 \pm 0,09290$ ,  $p < 0,001$ ) (Gráfico 2A) quando comparados com os animais do grupo LPS, de forma semelhante a droga padrão dexametasona ( $1,220 \pm 0,1259$ ,  $p < 0,001$ ).

A avaliação do edema pulmonar foi analisada pela razão do peso úmido pelo peso seco do pulmão (U/S), onde os animais do grupo LPS apresentaram

aumento significativo desta razão ( $9,077 \pm 0,2169$  vs  $8,241 \pm 0,6063$ ; respectivamente,  $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo basal. O tratamento com GT50 foi capaz de diminuir a razão do peso U/S do pulmão ( $8,097 \pm 0,2285$ ,  $p < 0,001$ ) quando comparado com a do grupo LPS (Gráfico 2B). O grupo de animais tratados com a droga padrão dexametasona e desafiado com o LPS apresentou diminuição significativa do edema pulmonar ( $7,854 \pm 0,2756$ ,  $p < 0,001$ ) (Gráfico 2B) quando comparado com o grupo de animais do grupo LPS.

**Gráfico 2. Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) no edema pulmonar na lesão pulmonar aguda experimental**



Camundongos BALB/c fêmeas ( $n=6$ /grupo) desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) foram tratados três vezes com GT na dose de 50 mg/kg uma hora, 24 e 48 horas após o desafio. Os animais foram eutanasiados com 72h e foi coletado o BALF e o pulmão para: **A.** Quantificação de proteínas totais; **B.** Avaliação do edema pulmonar; respectivamente. Os dados numéricos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,001$ ; ###  $p < 0,0001$ ; \* significativo em relação ao grupo OVA; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

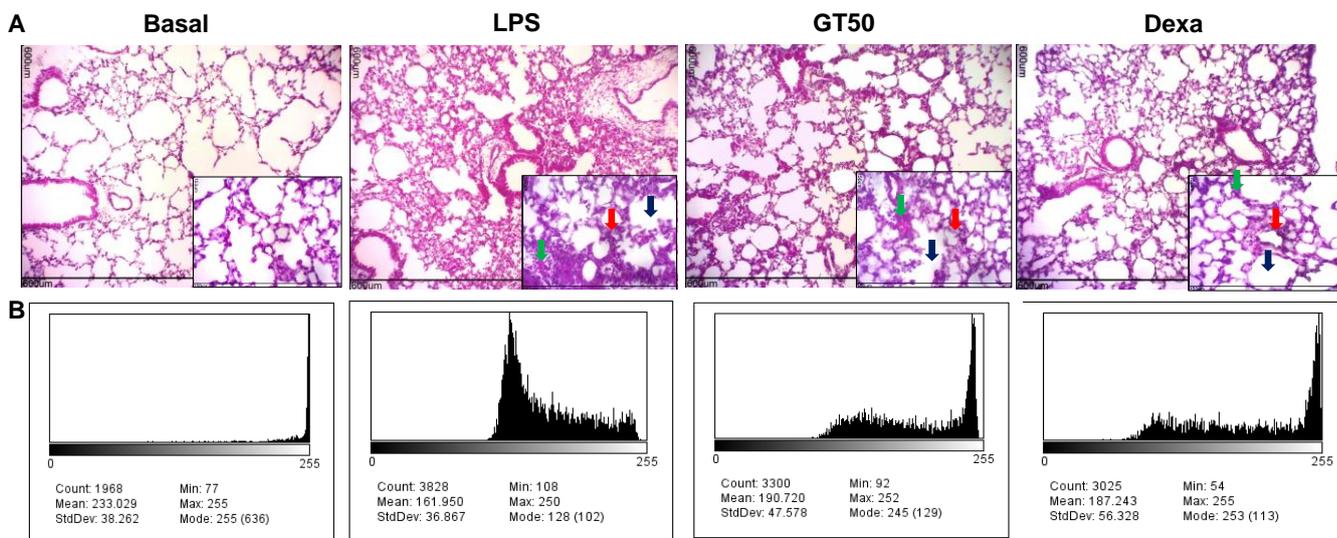
#### 4.1.2 Efeito do GT no tecido pulmonar de animais com Lesão Pulmonar Aguda (LPA)

O tecido pulmonar dos animais do grupo LPS, analisado pela coloração H&E, apresentaram aumento (score) significativo no infiltrado ( $3,67 \pm 0,52$  vs  $0,0 \pm 0,0$ ; respectivamente,  $p < 0,0001$ ), edema ( $3,33 \pm 0,82$  vs  $0,0 \pm 0,0$ ; respectivamente,  $p < 0,0001$ ) e hemorragia ( $33,50 \pm 0,55$  vs  $0,0 \pm 0,0$ ; respectivamente,  $p < 0,0001$ ) no tecido pulmonar, quando comparados ao grupo basal (Figura 15 e Gráfico 3).

O tratamento com GT (50 mg/kg) em animais desafiados com LPS foi capaz de diminuir todos os parâmetros analisados: infiltrado ( $2,167 \pm 0,7528$ ,  $p < 0,0001$ ), edema ( $2,333 \pm 0,5164$ ,  $p < 0,05$ ) e hemorragia ( $2,667 \pm 0,5164$ ,  $p < 0,05$ ), assim como a droga padrão dexametasona (2 mg/kg) (infiltrado  $1,500 \pm 0,5477$ ,  $p < 0,0001$ ; edema  $2,167 \pm 0,7528$ ,  $p < 0,05$  e hemorragia  $1,500 \pm 0,5477$ ,  $p < 0,0001$ ) quando comparados com os animais do grupo LPS (Figura 15 e Gráfico 3).

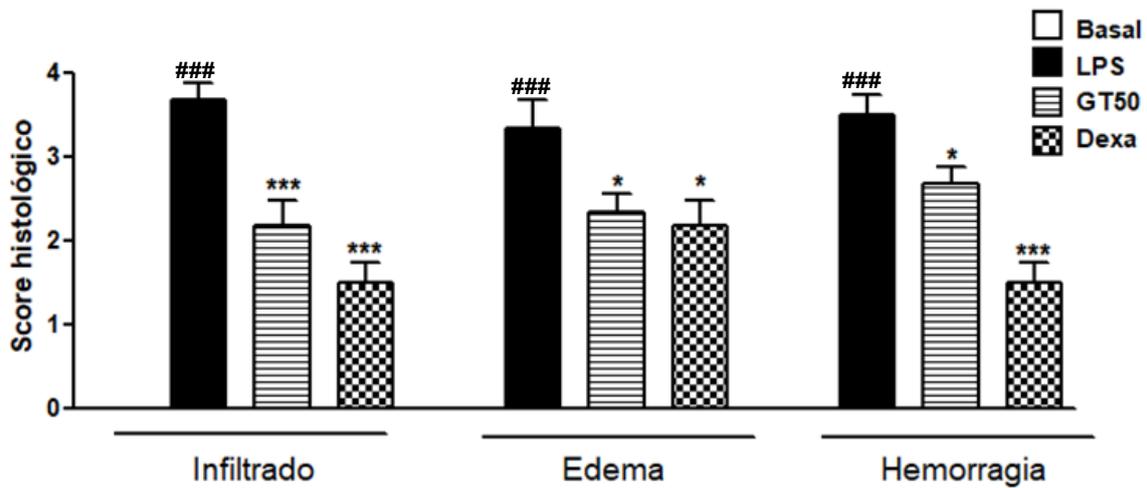
A avaliação histológica dos pulmões dos animais do grupo LPS, realizada pela coloração do TG, indicou deposição (score) significativa de fibras colagenosas nas regiões bronquioloalveolar e perivascular quando comparados ao grupo basal ( $3,00 \pm 0,71$  vs  $0,0 \pm 0,0$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente). Entretanto, o tratamento com GT50 em animais desafiados com LPS foi capaz de diminuir significativamente a deposição das fibras colágenas, de forma semelhante a droga padrão dexametasona ( $2,17 \pm 0,41$ ,  $p < 0,05$ ;  $1,80 \pm 0,45$ ,  $p < 0,05$ ; respectivamente) quando comparados com o grupo LPS (Figura 16 e Gráfico 4).

**Figura 15. Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) no tecido pulmonar de animais com lesão pulmonar aguda**



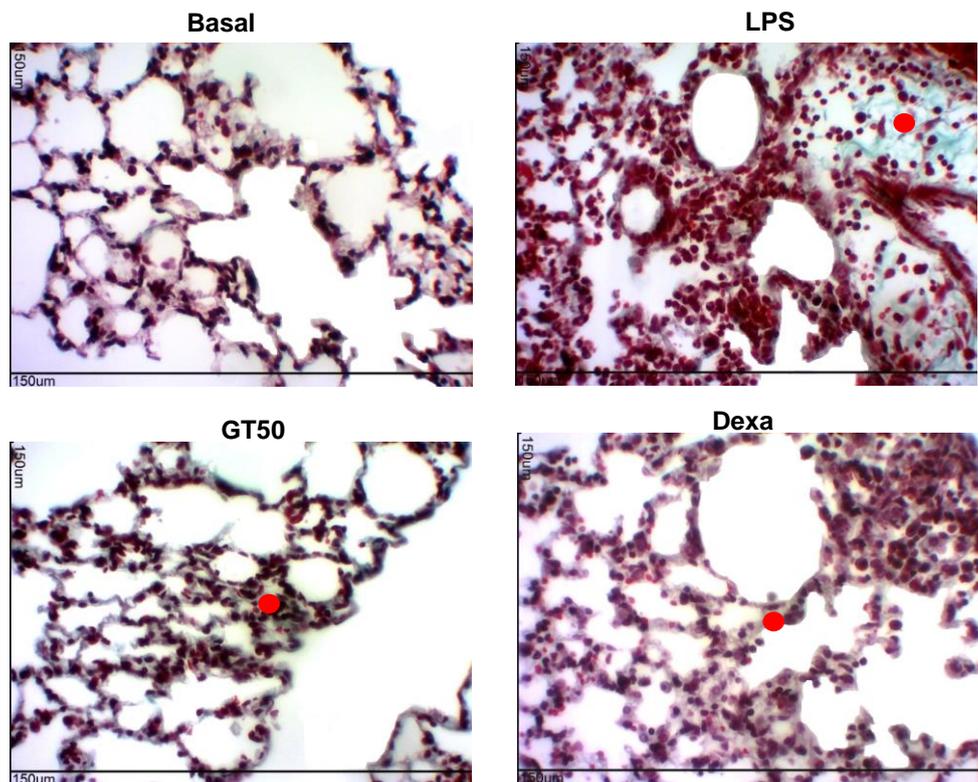
Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos com LPA (n=6/grupo). **A.** Tecido pulmonar corado por Hematoxilina Eosina (H&E). A.T 100x (600  $\mu$ m) e 400x (150  $\mu$ m).  $\downarrow$  = infiltração perialveolar,  $\downarrow$  = edema,  $\downarrow$  = hemorragia; **B.** Histogramas da quantidade de pixels mensurados nas fotomicrografias da cavidade pulmonar de camundongos BALB/c com LPA, conforme os grupos: basal, LPS, GT50 e Dexa. Coradas em H&E, A.T 400x (150  $\mu$ m). Área mensurada 300x240 pixels; RGB (Red, Green, Blue); 21k.

Gráfico 3. Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) no tecido pulmonar de animas com lesão pulmonar aguda



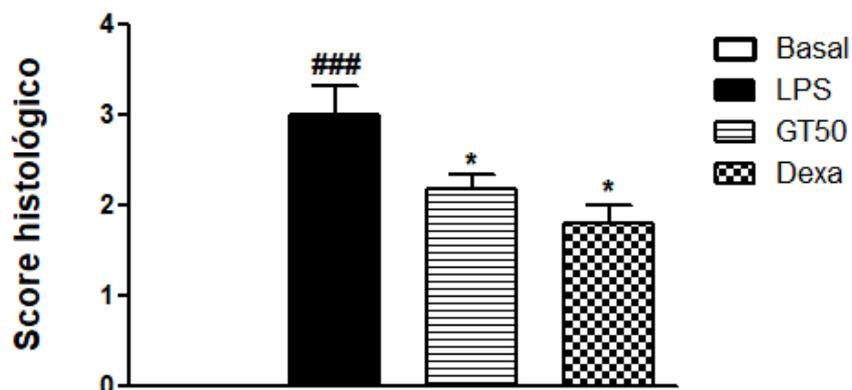
Os dados numéricos foram expressos em media  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,001$ ; ###  $p < 0,0001$ ; \* significativo em relação ao grupo OVA; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Figura 16. Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) na histologia pulmonar sobre a deposição de fibras colágenas



Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos. com LPA dos grupos basal, LPS, GT50 e Dexa, coradas em Tricrômio de Gomori (TG). A.T 100x (600  $\mu$ m) e 400x (150  $\mu$ m). • = fibras colágenas.

**Gráfico 4. Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) na histologia pulmonar usando Tricômico de Gomori (TG)**

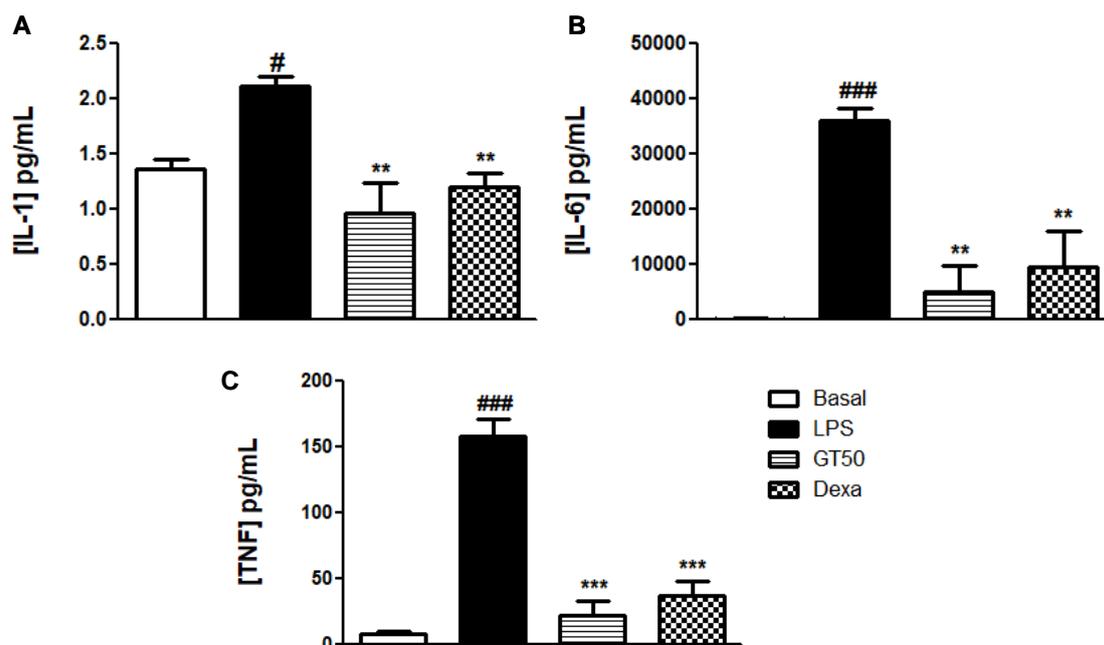


Análise do score histológico. Os dados numéricos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,001$ ; ###  $p < 0,0001$ ; \* significativo em relação ao grupo OVA; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### **4.1.3 Quantificação de citocinas no lavado broncolaveolar de animais com Lesão Pulmonar Aguda (LPA)**

Animais do grupo LPS apresentaram, no BALF, aumento significativo nas concentrações (pg/mL) das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$ ), quando comparadas com as dos animais do grupo basal (IL-1 $\beta$  - 36,123 $\pm$ 4301 vs 120,20 $\pm$ 99,34,  $p < 0,05$ ; IL-6 - 2,109 $\pm$ 0,1768 vs 1,366 $\pm$ 0,1499,  $p < 0,0001$ ; TNF- $\alpha$  - 158,0 $\pm$ 22,94 vs 8,192 $\pm$ 3,479,  $p < 0,0001$ ; respectivamente). O tratamento com GT50 em animais desafiados com LPS promoveu uma diminuição significativa das três citocinas analisadas (IL-1 $\beta$  - 0,9696 $\pm$ 0,4617,  $p < 0,001$ ; IL-6 - 5098 $\pm$ 10276,  $p < 0,001$ ; TNF- $\alpha$  - 22,29 $\pm$ 21,15,  $p < 0,0001$ ) de forma semelhante a droga padrão dexametasona (IL-1 $\beta$  1,206 $\pm$ 0,2450,  $p < 0,001$ ; IL-6 9572 $\pm$ 14599,  $p < 0,001$ ; TNF- $\alpha$  36,96 $\pm$ 23,22,  $p < 0,0001$ ) quando comparados com o grupo LPS (Gráfico 5A, B e C).

**Gráfico 5. Efeito do tratamento com GT nas concentrações de citocinas pro-inflamatórias no BALF de animais com Lesão Pulmonar Aguda (LPA)**



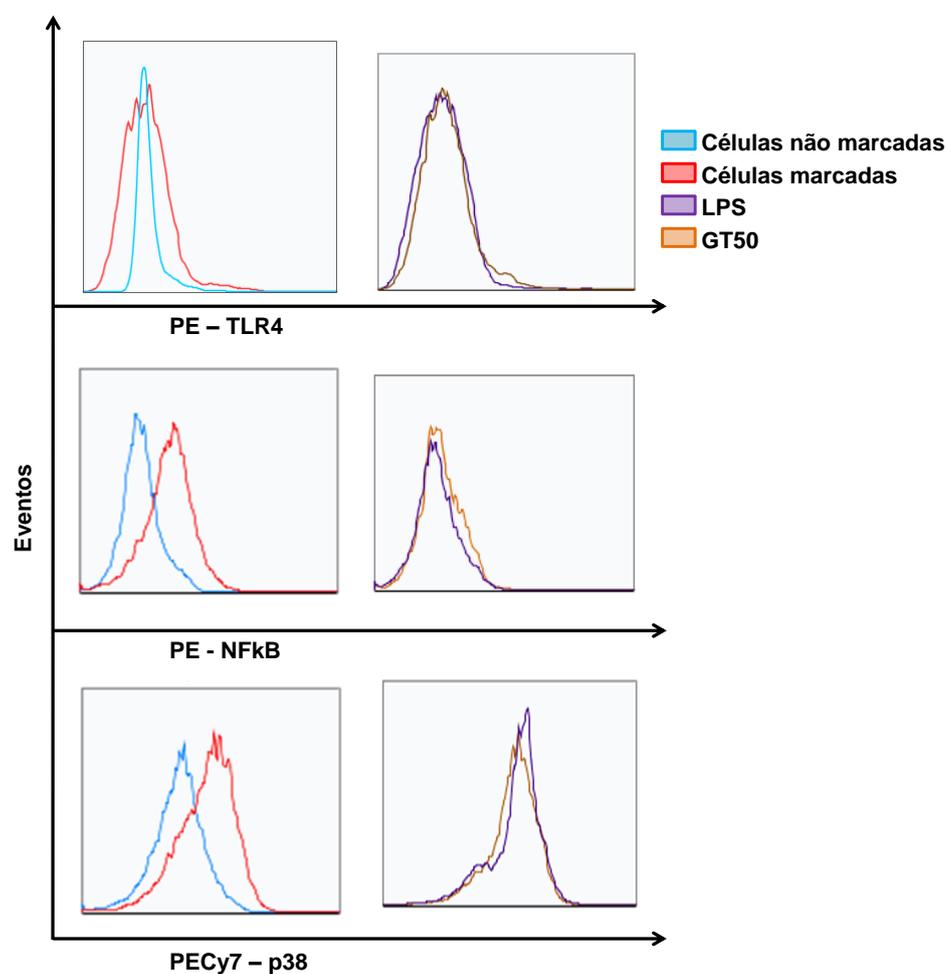
Camundongos BALB/c fêmeas (n=6/grupo) desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) foram tratados três vezes com GT na dose de 50 mg/kg uma hora, 24 e 48 horas após o desafio. Os animais foram eutanasiados com 72h e foi coletado o BALF. O sobrenadante do BALF foi utilizado para quantificar as citocinas. **A.** IL-1 $\beta$ ; **B.** IL-6 e **C.** TNF- $\alpha$ . Os dados numéricos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; # p<0,05; ## p<0,001; ### p<0,0001; \* significativo em relação ao grupo OVA; \* p<0,05; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001.

#### 4.1.4. Análise da expressão de moléculas sinalizadoras nas células do BALF, de animais com Lesão Pulmonar Aguda (LPA)

Para definir mecanismos de ação do GT em células do BALF nos animais com LPA, avaliamos a expressão de TLR4, MAPKinase p38 e p65NFkB nessas células. A figura 17 apresenta os histogramas representativos gerados na citometria de fluxo, das células do BALF dos grupos de animais LPS, GT50 e Dexa. As células foram marcadas com anticorpos anti: -TLR4, -p38 e -p65NFkB. As células dos animais do grupo GT50 apresentaram redução, em porcentagem, na expressão TLR4, de forma semelhante a droga padrão DEXA, quando comparadas com as do grupo LPS (49,30% $\pm$ 7,14 e 52,30% $\pm$ 0,46 vs 63,0% $\pm$ 8,24, respectivamente) (Figura 17 e Gráfico 6A). Em relação a via de sinalização p38 observou-se também diminuição (em porcentagem) tanto no grupo GT50 como do grupo Dexa em comparação com o grupo LPS (6,22% $\pm$ 1,51; 7,24% $\pm$ 1,28 vs 10,30% $\pm$ 0,66, respectivamente)

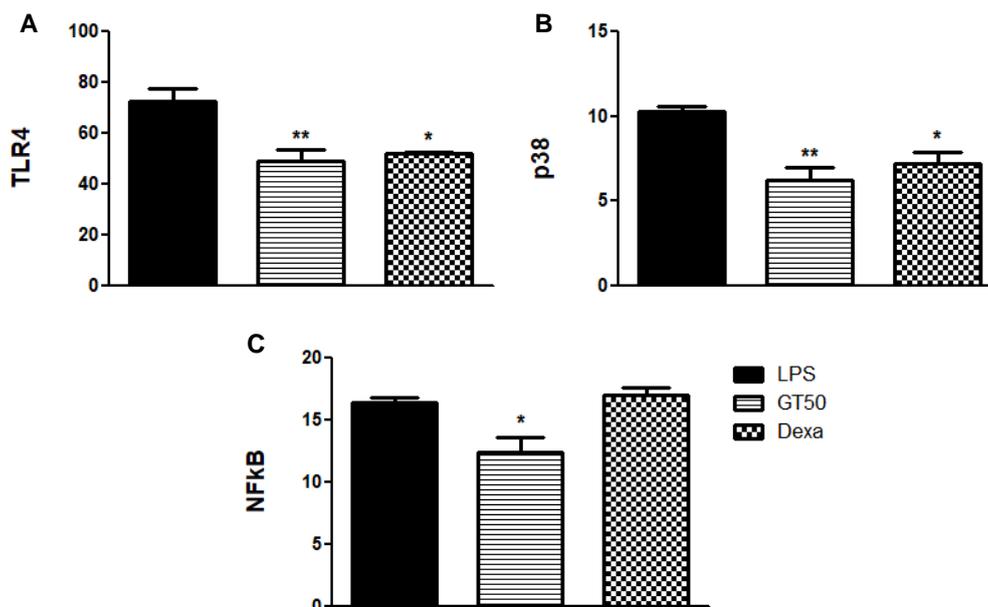
(Figura 17 e Gráfico 6B). No entanto, para p65NFkB, apenas GT50 foi capaz de reduzir (em porcentagem) a expressão de p65NFkB quando comparado com o grupo LPS ( $12,47\% \pm 2,07$  vs  $16,37 \pm 0,76$ , respectivamente) (Figura 17 e Gráfico 6C).

**Figura 17. Efeito do tratamento com GT na expressão de moléculas sinalizadoras nas células do BALF de animais com Lesão Pulmonar Aguda (LPA)**



Camundongos BALB/c fêmeas ( $n=6/\text{grupo}$ ) desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) foram tratados três vezes com GT na dose de 50 mg/kg uma hora, 24 e 48 horas após o desafio. Os animais foram eutanasiados com 72h e foi coletado o BALF. O sobrenadante do BALF foi utilizado para marcações usando o citômetro de fluxo. Figura mostra os histogramas das marcações efetuadas.

**Gráfico 6. Efeito do tratamento com GT na expressão de moléculas sinalizadoras nas células do BALF de animais com Lesão Pulmonar Aguda (LPA)**



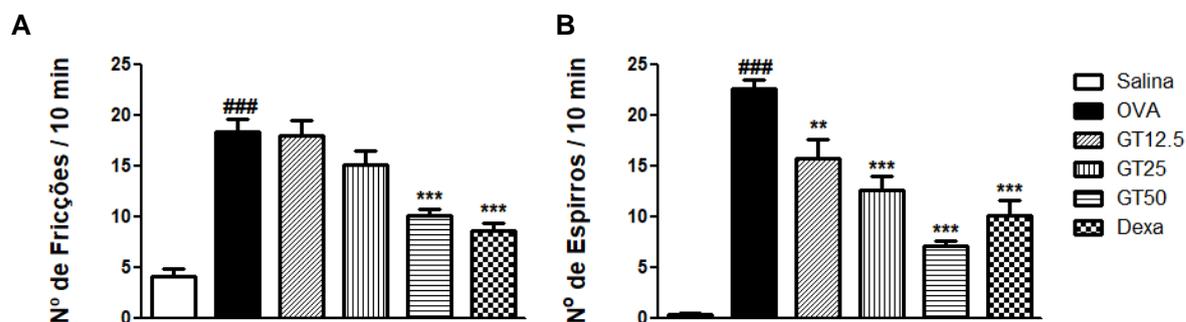
Camundongos BALB/c fêmeas (n=6/grupo) desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) foram tratados três vezes com GT na dose de 50 mg/kg uma hora, 24 e 48 horas após o desafio. Os animais foram eutanasiados com 72h e foi coletado o BALF. O sobrenadante do BALF foi utilizado para marcações usando o citômetro de fluxo. **A.** TLR4; **B.** p38; **C.** NFkB. Os dados numéricos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; # p<0,05; ## p<0,001; ### p<0,0001; \* significativo em relação ao grupo OVA; \* p<0,05; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001.

#### 4.2 Efeito do tratamento com Gama Terpineno (GT) nos sinais clínico na Rinite alérgica experimental

Imediatamente após o último dia de desafio com ovalbumina (OVA) os animais foram avaliados de acordo com parâmetros de sinais clínicos como: número de fricções na região nasal e de espirros, por um tempo de 10 minutos. Os animais do grupo OVA apresentam aumento significativo dos dois parâmetros analisados (fricção  $18,33 \pm 3,077$  vs  $4,167 \pm 1,722$ , p<0,001); espirro ( $22,67 \pm 1,966$  vs  $0,3333 \pm 0,5164$ , p<0,001; respectivamente), quando comparados ao grupo basal (Gráfico 7A e B). O tratamento com GT (12,5 ou 25 mg/kg) promoveu diminuição significativa em no número de espirros ( $15,80 \pm 4,207$ , p<0,001;  $12,60 \pm 3,286$ , p<0,0001; respectivamente) quando comparado com os do grupo OVA (Gráfico 7B). Entretanto, o tratamento com GT na dose de 50 mg/kg foi capaz de reduzir tanto o número de fricções como o número de espirros de forma significativa ( $10,17 \pm 1,472$ , p<0,0001;

7,167±1,169,  $p<0,0001$ ; respectivamente) de maneira semelhante ao tratamento com a droga padrão dexametasona (8,625±2,264,  $p<0,0001$ ; 10,14±4,059,  $p<0,0001$ ; respectivamente) quando comparados com os animais do grupo OVA (Gráfico 7A e B).

**Gráfico 7. Efeito do tratamento com GT nos sinais clínicos, como espirro e fricção nasal nos animais com rinite alérgica experimental**



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6/grupo) desafiados com ovalbumina (OVA) foram tratados com GT nas doses de 12,5; 25 ou 50 mg/kg uma hora antes cada desafio. Imediatamente após o último dia de desafio foram avaliados os sinais clínicos dos animais por 10 minutos. **A.** Número de Fricções; **B.** Número de Espirros. Os dados numéricos foram expressos em média ± e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; #  $p<0,05$ ; ##  $p<0,001$ ; ###  $p<0,0001$ ; \* significativo em relação ao grupo OVA; \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,001$ ; \*\*\*  $p<0,0001$ .

#### 4.2.1 Efeito do tratamento com GT na migração de células inflamatórias para a cavidade nasal de animais com Rinite alérgica experimental

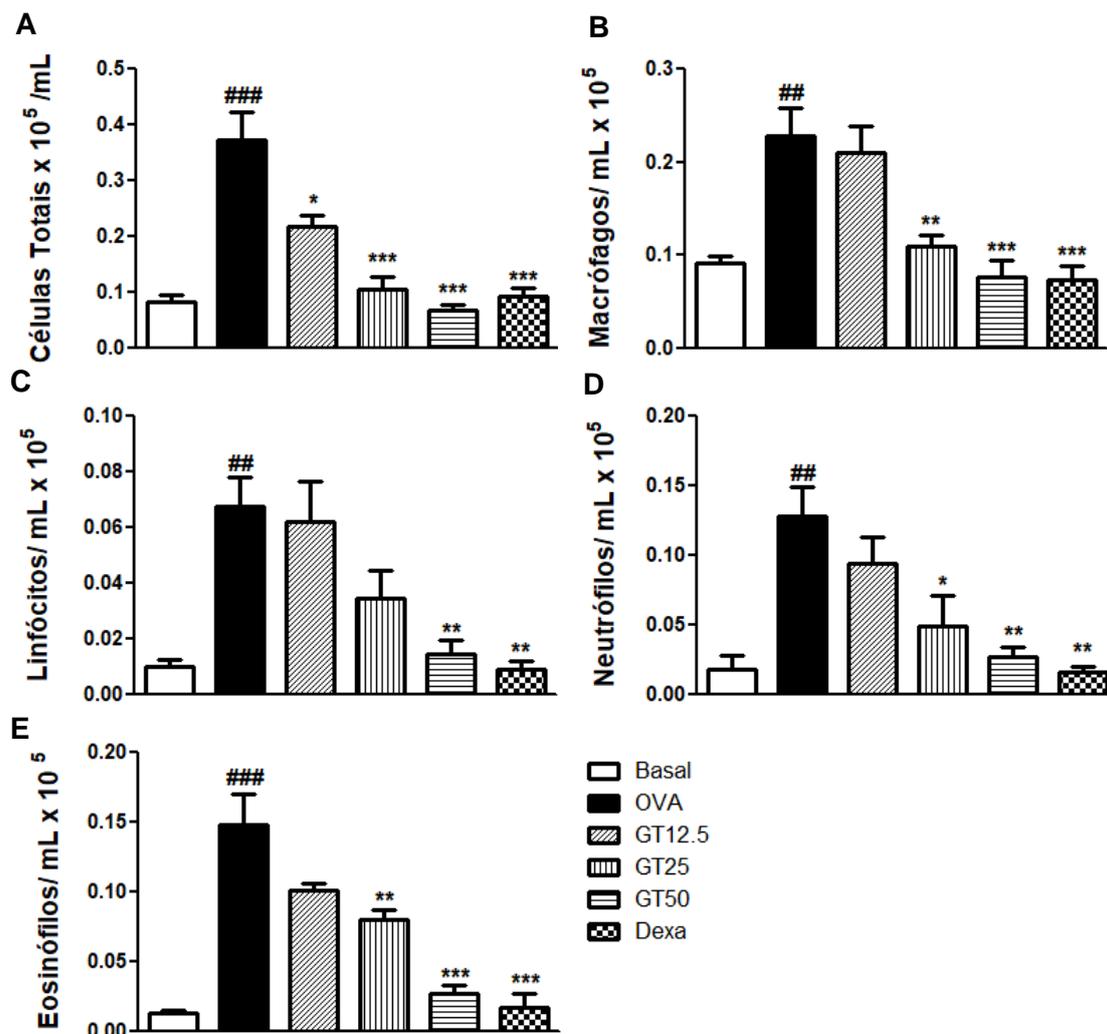
No 35<sup>o</sup> dia do protocolo experimental de rinite alérgica, os animais foram eutanasiados e obtido o NALF para quantificação das células totais e diferenciais. Os animais do grupo OVA apresentaram aumento significativo no número total de células no NALF quando comparados aos do grupo basal (0,3727±0,1649 vs 0,0818±0,04622; respectivamente,  $p<0,0001$ ). Houve reversão na migração de células no NALF após o tratamento com o GT nas doses de 12,5 (0,2167±0,0516,  $p<0,05$ ), 25 (0,1056±0,0634,  $p<0,0001$ ) ou 50 mg/kg (0,0666±0,0353,  $p<0,0001$ ), sendo as duas últimas doses tão efetivas quanto o tratamento com a droga padrão dexametasona (0,09167±0,03764,  $p<0,0001$ ) em comparação com as do grupo OVA (Gráfico 8A).

Com relação as células diferenciais, pode-se observar, no grupo OVA, um aumento significativo de linfócitos (0,0675±0,0260 vs 0,0100±0,0062,

$p < 0,001$ ; respectivamente), neutrófilos ( $0,1281 \pm 0,0516$  vs  $0,0180 \pm 0,0244$ ,  $p < 0,0001$ ; respectivamente), bem como eosinófilos ( $0,1481 \pm 0,0593$  vs  $0,0130 \pm 0,0061$ ,  $p < 0,0001$ ; respectivamente) quando comparado ao grupo basal. Não houve aumento do número de os macrófagos no NALF (Gráficos 8B, C, D e E).

O tratamento com o GT na dose de 12,5 mg/kg não apresentou efeito na diminuição das células diferenciais quando comparado ao grupo OVA. O tratamento com GT 25 mg/kg apresentou diminuição significativa nos neutrófilos ( $0,04893 \pm 0,06419$ ;  $p < 0,05$ ) e eosinófilos ( $0,0806 \pm 0,01654$ ;  $p < 0,001$ ), porém sem efeito na migração de macrófagos ou linfócitos no NALF quando comparado com o grupo OVA. Entretanto a dose de 50 mg/kg do GT apresentou redução significativa dos linfócitos ( $0,0144 \pm 0,0141$ ,  $p < 0,001$ ), neutrófilos ( $0,0270 \pm 0,0180$ ,  $p < 0,001$ ) e eosinófilos ( $0,0267 \pm 0,0161$ ,  $p < 0,0001$ ) de forma semelhante aos animais tratados com o dexametasona (linfócito-  $0,0090 \pm 0,0070$ ,  $p < 0,001$ ; neutrófilo-  $0,0158 \pm 0,0101$ ,  $p < 0,0001$ ; eosinófilo-  $0,0172 \pm 0,0247$ ,  $p < 0,0001$ ) quando comparados com o grupo OVA (Gráfico 8B, C, D e E).

Gráfico 8. Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) na migração de células totais e diferenciais para a cavidade nasal na rinite alérgica experimental



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6/grupo) desafiados com ovalbumina (OVA) foram tratados com GT nas doses de 12,5; 25 ou 50 mg/kg uma hora antes cada desafio. Após 24h do último desafio os animais foram eutanasiados e foi realizado o NALF para obtenção de células totais e diferenciais. **A.** Número total de células; **B.** Macrófagos; **C.** Linfócitos; **D.** Neutrófilos; **E.** Eosinófilos. Os dados numéricos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; # p<0,05; ## p<0,001; ### p<0,0001; \* significativo em relação ao grupo OVA; \* p<0,05; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001.

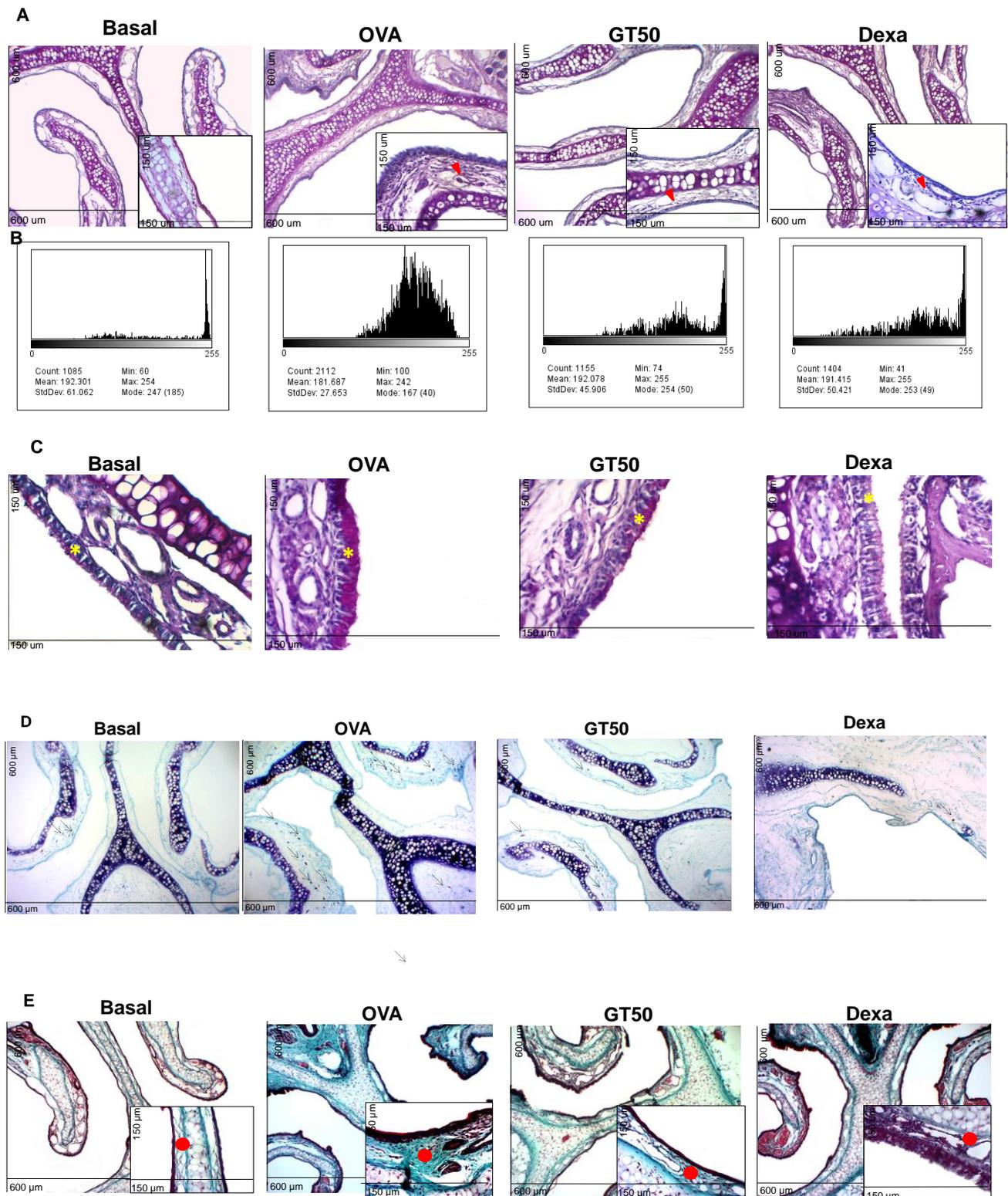
#### 4.2.2 Análise histológica do tecido da região nasal dos animais com rinite alérgica experimental e tratados com o gama terpineno

No 35<sup>o</sup> dia os animais foram eutanasiados para a obtenção das cabeças afim de realizar o processamento histológico. Os tecidos da região nasal dos animais dos grupos OVA e basal foram corados com H&E (avaliar o infiltrado celular), PAS (analisar a formação de muco), AT (analisar a presença de

mastócitos) ou TG (avaliar a formação de fibras colágenas) e comparados pelos scores, sendo possível observar que os dos animais do grupo OVA (grupo doente) apresentaram aumento significativo no infiltrado celular ( $3,167 \pm 0,7528$  vs  $0,0 \pm 0,0$ ,  $p < 0,0001$ ; respectivamente), muco ( $3,33 \pm 0,82$  vs  $0,0 \pm 0,0$ ,  $p < 0,0001$ ; respectivamente), aumento no número de mastócitos ( $2,500 \pm 0,8367$  vs  $0,0 \pm 0,0$ ,  $p < 0,0001$ ; respectivamente) e presenças de fibras colágenas ( $2,500 \pm 0,5477$  vs  $0,0 \pm 0,0$ ,  $p < 0,0001$ ; respectivamente) quando comparados ao grupo basal (Figura 18 e gráfico 9).

Nos animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com GT50 foi possível observar que houve diminuição, nos seguintes parâmetros analisados: infiltrado ( $1,333 \pm 0,5164$ ,  $p < 0,0001$ ), muco ( $1,833 \pm 0,4082$ ,  $p < 0,05$ ) e presença de mastócitos no tecido ( $1,500 \pm 0,5477$ ,  $p < 0,05$ ) semelhantemente à droga padrão dexametasona (2 mg/kg) (infiltrado -  $2,000 \pm 0,6325$ ,  $p < 0,001$ ; muco -  $1,667 \pm 0,5164$ ,  $p < 0,001$  e presença de mastócitos -  $1,333 \pm 0,5164$ ,  $p < 0,001$ ) quando comparados com os animais do grupo OVA (Figura 18 e gráfico 9). O tratamento com GT50, bem como com a droga padrão dexametasona não alteraram a deposição de fibras colágenas (Gráfico 9).

**Figura 18. Efeito do tratamento com GT no tecido da cavidade nasal de animais com rinite alérgica experimental**



Fotomicrografias representativas da cavidade nasal de camundongos. **A.** Cavidades nasais coradas por Hematoxilina Eosina (H&E), A.T 100x (600 µm) e 400x (150 µm).  $\Delta$  = infiltração perivascular; **B.** Histogramas da quantidade de pixels mensurados nas fotomicrografias da cavidade nasal de camundongos BALB/c com CARAS, coradas em H&E, A.T 400x (150 µm). Área mensurada 300x240 pixels; RGB (Red, Green, Blue); 21k; **C.** Cavidades nasais coradas

por Ácido Periódico de Schiff (PAS), A.T 400x (150  $\mu$ m). \* = células calciformes produtoras de muco; D. Cavidade nasal de camundongos coradas em azul de Toluidina (AT) A.T 100x (600  $\mu$ m). → = mastócitos epiteliais; E. Cavidade nasal de camundongos coradas em Tricromo de Gomori (TG) A.T 100x (600  $\mu$ m) e 400x (150  $\mu$ m). • = fibras colágenas.

**Gráfico 9. Efeito do tratamento com GT no tecido da cavidade nasal de animais com rinite alérgica experimental**

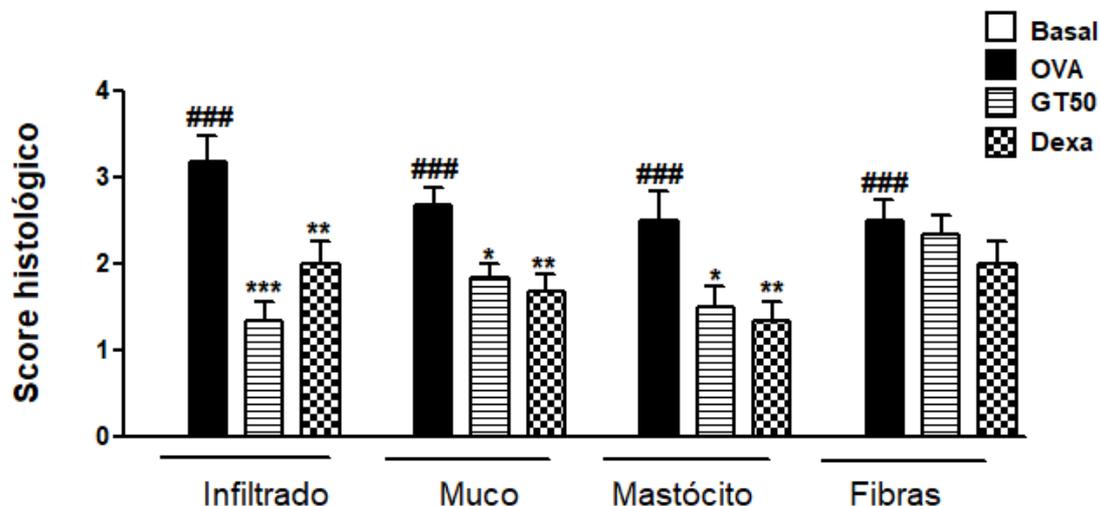


Gráfico da análise estatística do tecido histológico da cavidade nasal. Os dados numéricos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; # p<0,05; ## p<0,001; ### p<0,0001; \* significativo em relação ao grupo OVA; \* p<0,05; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001.

#### 4.3 Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) na inflamação pulmonar crônica

O protocolo experimental da asma consistiu na sensibilização de camundongos no primeiro, 7º e 14º dia. No período entre os dias 19 a 24 após a sensibilização, os animais foram desafiados com aerossol de OVA precedendo sempre com o pré-tratamento dos animais uma hora antes de cada desafio. Imediatamente após o último dia de desafio, os animais foram submetidos à testes comportamentais. No 25º dia, os animais foram eutanasiados para obtenção do BALF e assim efetuar a quantificação de células totais e diferenciais, dosagem de citocinas e aplicação de técnicas de citometria. Efetuou-se também a retirada dos pulmões para análise histológica e retiradas das cabeças para medição da expressão de c-fos.

#### **4.3.1 Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) no comportamento dos animais no protocolo experimental de asma alérgica**

No protocolo de asma alérgica experimental, imediatamente após o último desafio com OVA, os animais foram analisados segundo parâmetros comportamentais utilizando dois aparelhos de análise de ansiedade: labirinto em cruz elevado e a placa perfurada.

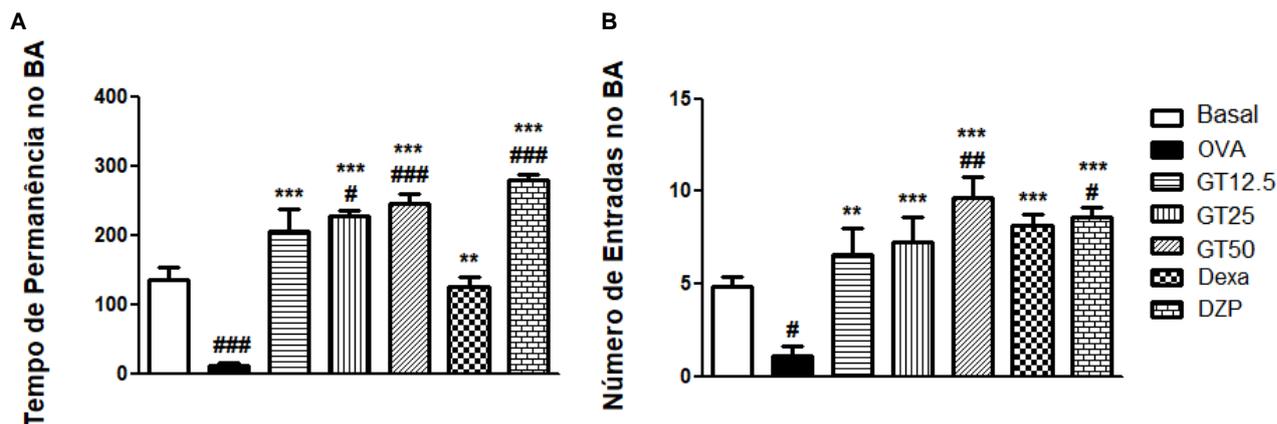
##### **• Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

No LCE os animais do grupo OVA apresentaram redução significativa no tempo de permanência nos braços abertos (BA) bem como no número de entradas dos braços abertos (BA) quando comparados aos do grupo basal ( $11,78 \pm 13,02$  vs  $135,8 \pm 18,90$ ;  $p < 0,0001$ ;  $1,125 \pm 1,356$  vs  $4,857 \pm 1,464$ ;  $p < 0,0001$ , respectivamente) (Gráfico 10).

O tratamento com GT (12,5; 25 ou 50 mg/kg) dos animais sensibilizados e desafiados com OVA foi capaz de reverter o efeito de doença descrito acima, aumentando significativamente tanto o tempo de permanência nos BA ( $206,3 \pm 31,03$ ,  $p < 0,0001$ ;  $227,2 \pm 7,713$ ;  $245,7 \pm 12,95$ ,  $p < 0,0001$ ; respectivamente), quanto no número de entradas nos BA ( $6,600 \pm 3,209$ ,  $p < 0,001$ ;  $7,286 \pm 3,546$ ,  $p < 0,0001$ ;  $9,667 \pm 2,733$ ,  $p < 0,0001$ ; respectivamente). Em adição, os tratamentos com as drogas padrões dexametasona ou diazepam induziram aumentos significativos tanto no tempo de permanência nos BA ( $125,5 \pm 14,79$ ;  $p < 0,001$  e  $280,0 \pm 7,783$ ;  $p < 0,0001$ , respectivamente), quanto no número de entradas nos BA ( $8,125 \pm 1,727$ ;  $p < 0,0001$  e  $8,625 \pm 1,506$ ;  $p < 0,0001$  respectivamente) quando comparados ao grupo OVA (Gráfico 10).

Apenas os tratamentos com GT 50mg/kg ou diazepam foram capazes de aumentar o tempo de permanência nos BA ( $245,7 \pm 12,95$ ;  $p < 0,0001$  e  $280,0 \pm 7,783$ ;  $p < 0,0001$  vs  $135,8 \pm 18,90$ , respectivamente), bem como no número de entradas nos BA ( $9,667 \pm 2,733$ ;  $p < 0,001$  e  $8,625 \pm 1,506$ ;  $p < 0,05$  vs  $4,857 \pm 1,464$ ; respectivamente) de forma significativa, quando comparados ao grupo basal, sendo observado no último parâmetro analisado, maior efeito do tratamento com GT50 em relação ao grupo diazepam (Gráfico 10).

**Gráfico 10. Efeito do tratamento com GT no teste do LCE na ansiedade nos animais com asma alérgica experimental**



Camundongos BALB/c fêmeas ( $n=6/\text{grupo}$ ) desafiados com ovalbumina (OVA) foram tratados com gama terpineno (GT) nas doses de 12,5; 25 ou 50 mg/kg uma hora antes cada desafio. Imediatamente após o último desafio, os animais foram levados a testes comportamentais. **A.** Número de entradas nos braços abertos (BA); **B.** Tempo de permanência nos braços abertos (BA). Os dados numéricos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; #  $p<0,05$ ; ##  $p<0,001$ ; ###  $p<0,0001$ ; \* significativo em relação ao grupo OVA; \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,001$ ; \*\*\*  $p<0,0001$ .

#### • Placa Perfurada (PP)

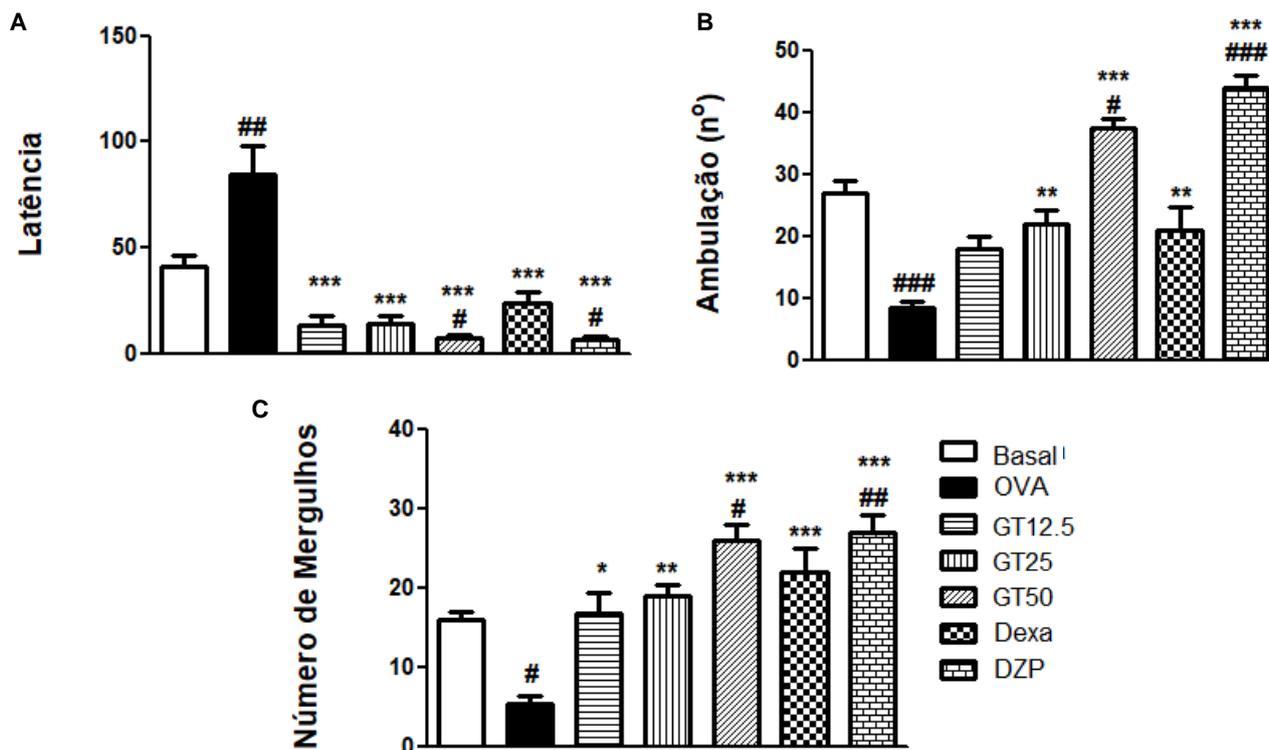
Na PP os animais do grupo OVA (doente) apresentaram aumento significativo no parâmetro latência quando comparados aos do grupo basal ( $84,33\pm 13,89$  vs  $40,70\pm 5,772$ ;  $p<0,001$ , respectivamente). O grupo OVA apresentou diminuição significativa nos parâmetros ambulação e número de mergulhos quando comparado ao grupo basal ( $8,375\pm 2,973$  vs  $26,82\pm 7,222$ ;  $p<0,0001$ ;  $5,286\pm 2,628$  vs  $16,00\pm 2,777$ ;  $p<0,05$ , respectivamente) (Gráfico 11).

O tratamento com GT, nas três doses analisadas (12,5; 25 ou 50 mg/kg) nos animais sensibilizados e desafiados com OVA, foi possível observar diminuição significativamente a latência ( $13,33\pm 11,64$ ;  $p<0,0001$ ;  $14,17\pm 9,109$ ;  $p<0,0001$ ;  $7,000\pm 5,538$ ;  $p<0,0001$ , respectivamente), quando comparado ao grupo OVA. A dose de 12,5 mg/kg foi capaz de aumentar significativamente o número de mergulhos ( $16,71\pm 6,775$ ,  $p<0,05$ ), porém não apresentou efeito significativo na ambulação, quando comparado ao grupo OVA (Gráfico 11). O tratamento com as doses de 25 ou 50 mg/kg apresentaram aumento significativo tanto na ambulação ( $21,86\pm 6,283$ ;  $p<0,001$  e  $37,43\pm 4,158$ ;  $p<0,0001$ , respectivamente) quanto no número de mergulhos ( $19,00\pm 3,606$ ;  $p<0,001$  e  $26,00\pm 4,690$ ;  $p<0,0001$ , respectivamente) quando comparados ao grupo OVA (Gráfico 11).

Os tratamentos com as drogas padrões dexametasona e diazepam apresentaram diminuição significativa na latência ( $23,71 \pm 14,29$ ;  $p < 0,0001$  e  $6,286 \pm 5,438$ ;  $p < 0,0001$ , respectivamente) quando comparados ao grupo OVA. Ambos tratamentos apresentaram efeito significativo aumentando os parâmetros de ambulação ( $20,86 \pm 10,04$ ;  $p < 0,001$  e  $43,88 \pm 5,668$ ;  $p < 0,0001$ , respectivamente) e número de mergulhos ( $21,86 \pm 7,904$ ,  $p < 0,0001$  e  $27,00 \pm 5,598$ ;  $p < 0,0001$ , respectivamente) quando comparados ao grupo OVA (Gráfico 11).

Apenas os tratamentos com GT50 e diazepam apresentaram de diminuição da latência ( $7,000 \pm 5,538$ ;  $p < 0,05$ ;  $6,286 \pm 5,438$ ;  $p < 0,05$  vs  $40,70 \pm 5,772$ ; respectivamente), aumento na ambulação ( $37,43 \pm 4,158$ ;  $p < 0,05$ ;  $43,88 \pm 5,668$ ;  $p < 0,0001$  vs  $26,82 \pm 7,222$ ; respectivamente), e aumento no número do mergulhos ( $26,00 \pm 4,690$ ;  $p < 0,05$ ;  $27,00 \pm 5,598$ ;  $p < 0,001$  vs  $16,00 \pm 2,777$ ; respectivamente) quando comparados ao grupo basal (Gráfico 11).

**Gráfico 11. Efeito do tratamento com GT no teste PP na ansiedade nos animais com asma alérgica experimental**



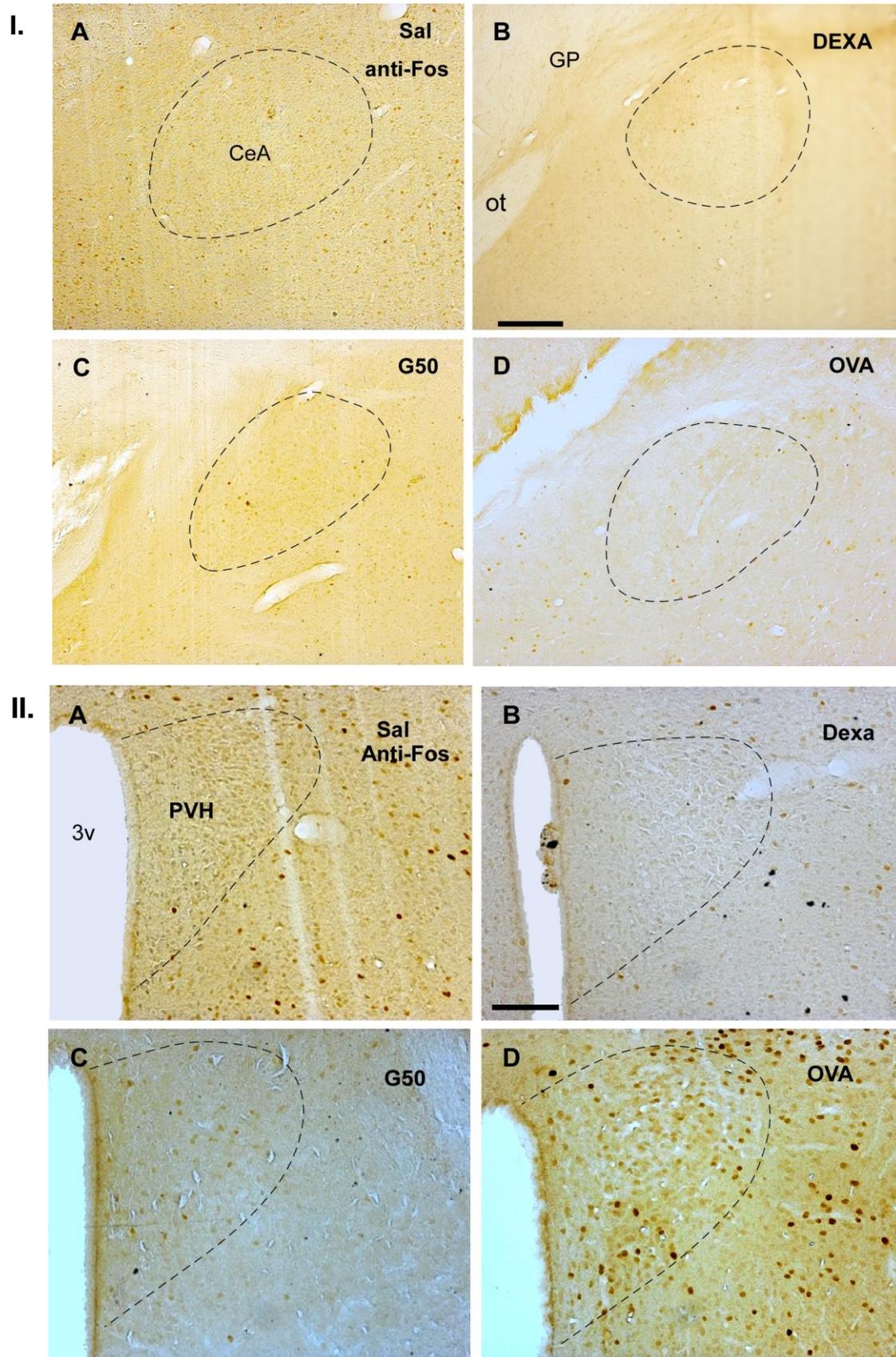
Camundongos BALB/c fêmeas (n=6/grupo) desafiados com ovalbumina (OVA) foram tratados com GT nas doses de 12,5; 25 ou 50 mg/kg uma hora antes cada desafio. Imediatamente após o último desafio, os animais foram levados a testes comportamentais e analisados parâmetros como: **A.** Latência **B.** Ambulação; **C.** Número de mergulhos. Os dados numéricos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; # p<0,05; ## p<0,001; ### p<0,0001; \* significativo em relação ao grupo OVA; \* p<0,05; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001.

#### 4.3.2 Efeito do tratamento com gama-terpineno (GT) na expressão da proteína c-fos no cérebro dos animais no protocolo experimental de asma alérgica

Após o último dia de desafio, os animais foram eutanasiados e as cabeças dos grupos basal, OVA, GT50 e Dexa foram removidas para obtenção do cérebro e avaliação da expressão de c-fos no núcleo central da amígdala (CeA) (Figura 19A) e no núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) (Figura 19B). Os animais do grupo OVA apresentaram aumento significativo da expressão de c-fos tanto no PVN (160,0 $\pm$ 5,350 vs 89,37 $\pm$ 18,21; p<0,05, respectivamente) quanto no CeA (95,05 $\pm$ 1,750 vs 19,33 $\pm$ 5,783; p<0,0001; respectivamente) quando comparados com o grupo basal (Figura 19 e Gráfico 12). O tratamento com GT50, assim como da droga padrão dexametasona

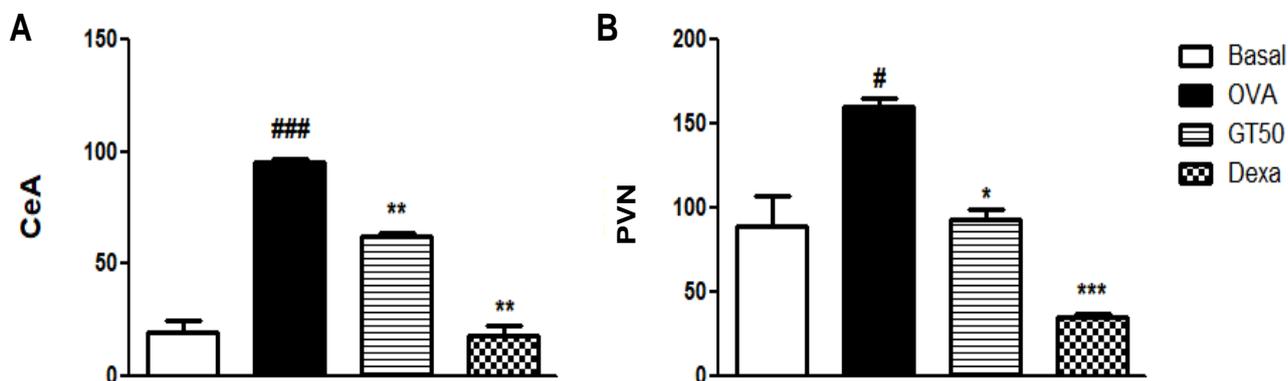
foram capazes de diminuir a expressão deste marcador cerebral de forma significativa nas duas áreas cerebrais avaliadas: PVN ( $93,17 \pm 6,380$ ;  $p < 0,05$  e  $35,47 \pm 1,674$ ;  $p < 0,0001$ , respectivamente) e CeA ( $62,27 \pm 2,967$ ;  $p < 0,001$  e  $17,97 \pm 8,00$ ;  $p < 0,0001$ , respectivamente), quando comparado ao grupo OVA (Figura 19 e Gráfico 12).

Figura 19. Efeito do tratamento com GT na expressão de c-fos no cérebro de animais com asma alérgica experimental



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6/grupo) desafiados com ovalbumina (OVA) foram tratados com GT na dose de 50 mg/kg uma hora antes cada desafio. Imediatamente após o último desafio, os animais foram eutanasiados e os cérebros foram retirados para avaliar a expressão de c-fos por imuno-histoquímica. **I.** Presença de c-fos no núcleo central da amígdala (CeA); **IA.** Basal; **IB.** Dexa; **IC.** GT50; **ID.** OVA. **II.** Presença de c-fos no núcleo paraventricular hipotalâmico; **IA.** Basal; **IB.** Dexa; **IC.** GT50; **ID.** OVA. 3v - terceiro ventrículo; GP- globo pálido; ot- trato óptico. Barra de 200  $\mu$ m na figura I e de 100  $\mu$ m na figura II.

**Gráfico 12. Efeito do tratamento com GT na expressão de c-fos no cérebro de animais com asma alérgica experimental**



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6/grupo) desafiados com ovalbumina (OVA) foram tratados com GT na dose de 50 mg/kg uma hora antes cada desafio. Imediatamente após o último desafio, os animais foram eutanasiados e os cérebros foram retirados para avaliar a expressão de c-fos por imuno-histoquímica. **A.** Análise estatística CeA; **B.** Análise estatística PVN. Os dados numéricos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,001$ ; ###  $p < 0,0001$ ; \* significativo em relação ao grupo OVA; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.3.3 Efeito do tratamento com Gama Terpineno (GT) na migração de células inflamatórias para a cavidade broncoalveolar nos animais com asma alérgica experimental

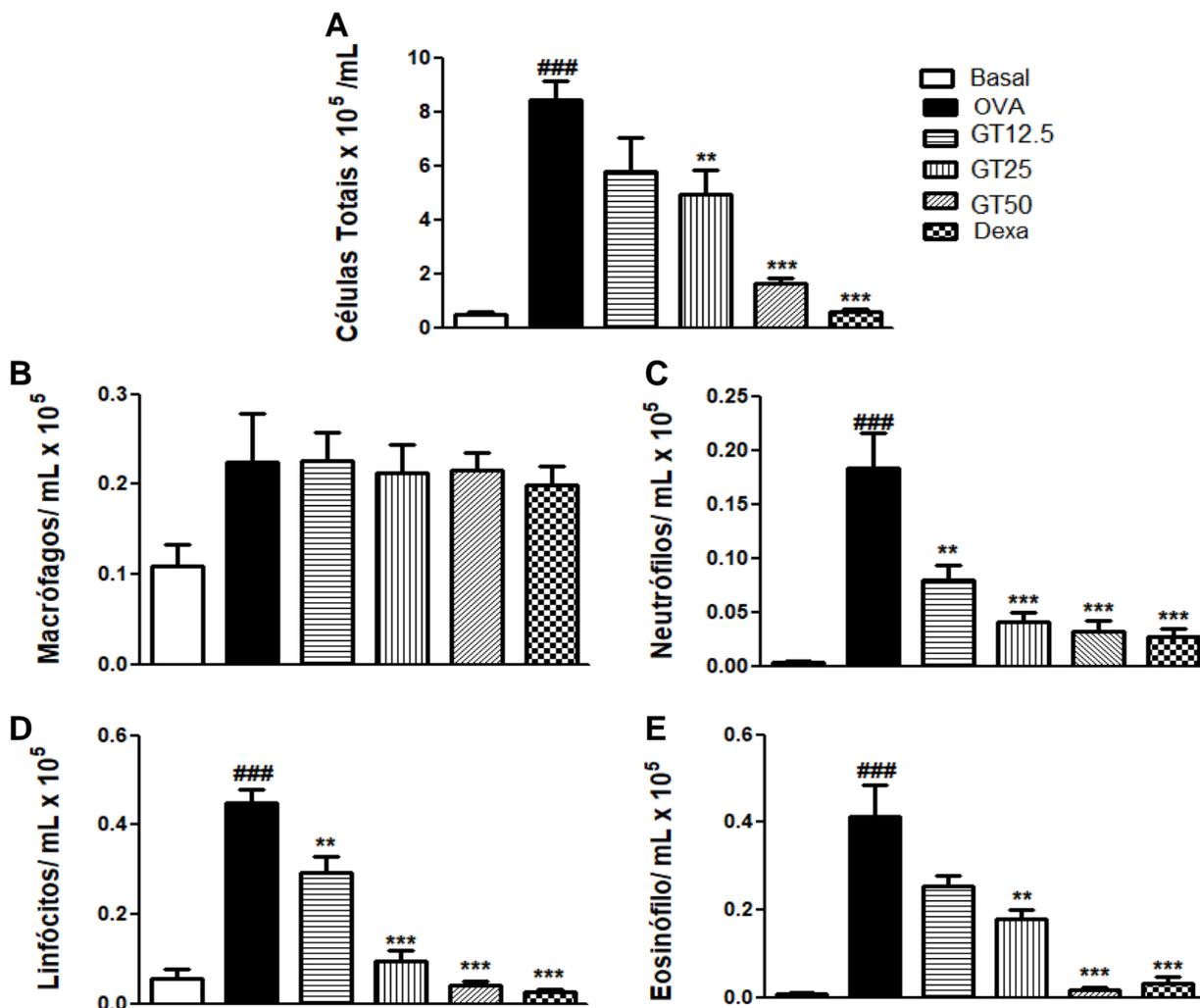
No 25<sup>o</sup> dia do protocolo os animais foram eutanasiados para a obtenção do BALF e quantificação de células totais e diferenciais, bem como dosagem de citocinas e caracterização celular pela técnica de citometria de fluxo. O BALF dos animais do grupo OVA apresentou aumento significativo na migração de células inflamatórias quando comparado com o dos animais do grupo basal ( $0,9053 \pm 0,4571$  vs  $0,0825 \pm 0,0388$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente) (Gráfico 13A) Os tratamentos com GT nas doses de 25 ou 50 mg/kg apresentaram diminuição significativa deste parâmetro quando comparados ao grupo OVA ( $0,3500 \pm 0,1683$ ;  $p < 0,001$  e  $0,3963 \pm 0,2379$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente). A

diminuição da migração celular promovida pelo tratamento com GT50 apresentou efeito semelhante ao tratamento com a dexametasona ( $0,2706 \pm 0,2420$ ;  $p < 0,0001$ ) (Gráfico 13A).

Com relação as células diferenciais, o grupo OVA apresentou aumento no número de neutrófilos ( $0,1833 \pm 0,0803$  vs  $0,0029 \pm 0,0021$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente), linfócitos ( $0,4505 \pm 0,05576$  vs  $0,05518 \pm 0,04518$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente) e eosinófilos ( $0,4122 \pm 0,2148$  vs  $0,0073 \pm 0,0052$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente), não sendo observado o mesmo efeito em macrófagos quando comparado com o grupo basal (Gráfico 13B, C, D e E). O tratamento com GT 12,5 mg/kg apresentou diminuição significativa apenas de neutrófilos e linfócitos ( $0,0800 \pm 0,03184$ ;  $p < 0,001$  e  $0,2936 \pm 0,08062$ ;  $p < 0,001$ ; respectivamente) quando comparado com grupo OVA (Gráfico 13C e D). Nos tratamentos com GT nas doses de 25 ou 50 mg/kg, observou-se diminuição de neutrófilos ( $0,0404 \pm 0,0246$ ;  $p < 0,0001$  e  $0,0319 \pm 0,0251$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente), linfócitos ( $0,0951 \pm 0,0562$ ;  $p < 0,0001$  e  $0,0422 \pm 0,0146$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente) e eosinófilos ( $0,1801 \pm 0,0503$ ;  $p < 0,001$  e  $0,0174 \pm 0,0139$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente) quando comparados ao grupo OVA (Gráfico 13B, C, D e E).

Entretanto, o grupo GT50 apresentou efeito semelhante ao grupo tratado dexametasona (neutrófilo -  $0,0267 \pm 0,0211$ ;  $p < 0,0001$ ; linfócito -  $0,0251 \pm 0,0153$ ;  $p < 0,0001$ ; eosinófilo -  $0,0329 \pm 0,0343$ ;  $p < 0,0001$ ). Não houve alteração no número de macrófagos nos grupos de animais analisados (Gráfico 13B, C, D e E).

Gráfico 13. Efeito do tratamento com GT na migração de células inflamatórias para a cavidade broncoalveolar nos animais com asma alérgica experimental



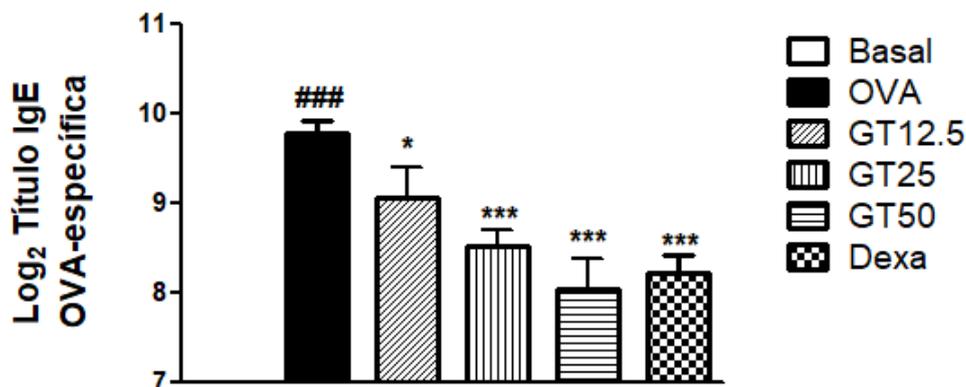
Camundongos BALB/c fêmeas (n=6/grupo) desafiados com ovalbumina (OVA) foram tratados com GT nas doses de 12,5; 25 ou 50 mg/kg uma hora antes cada desafio. Após 24 h do último desafio, os animais foram eutanasiados para obtenção do BALF para contagem de células totais e diferenciais. **A.** Células totais; **B.** Macrófagos; **C.** Neutrófilos; **D.** Linfócitos; **E.** Eosinófilos. Os dados numéricos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; # p<0,05; ## p<0,001; ### p<0,0001; \* significativo em relação ao grupo OVA; \* p<0,05; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001.

#### 4.3.4 Efeito do tratamento com GT na produção de IgE-OVA específica em animais com asma alérgica experimental

Os soros dos animais dos grupos analisados (basal, OVA e tratados com doses de GT) foram quantificados quanto a presença de IgE-OVA específica. O grupo basal não apresentou concentrações detectáveis IgE-OVA específica. Entretanto, como esperado, nos soros dos animais do grupo OVA foram

detectados títulos de IgE OVA-específica na diluição de 1:1024 e nos soros dos animais tratados com GT 12,5; 25 ou 50 mg/kg observou-se diminuição significativa nos títulos de IgE OVA-específica nas diluições 1:512; 1:256 e 1:128, respectivamente quando comparados ao grupo OVA ( $537,6 \pm 142,5$ ;  $p < 0,05$ ;  $365,7 \pm 51,72$ ;  $p < 0,001$  e  $265,1 \pm 69,03$ ;  $p < 0,001$ ; respectivamente vs  $877,7 \pm 94,43$ ). Nas doses de 25 e 50 mg/kg observou-se efeito semelhante ao tratamento com a droga padrão dexametasona ( $298,7 \pm 42,67$ ;  $p < 0,001$ ) (Gráfico 14).

**Gráfico 14. Efeito do tratamento com GT no título de IgE OVA-específica**



Camundongos BALB/c fêmeas ( $n=6$ /grupo) desafiados com ovalbumina (OVA) foram tratados com GT nas doses de 12,5; 25 ou 50 mg/kg uma hora antes cada desafio. Após 24 h do último desafio, os animais foram anestesiados para obtenção do soro para análise do título de IgE OVA-específica. Os dados numéricos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,001$ ; ###  $p < 0,0001$ ; \* significativo em relação ao grupo OVA; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

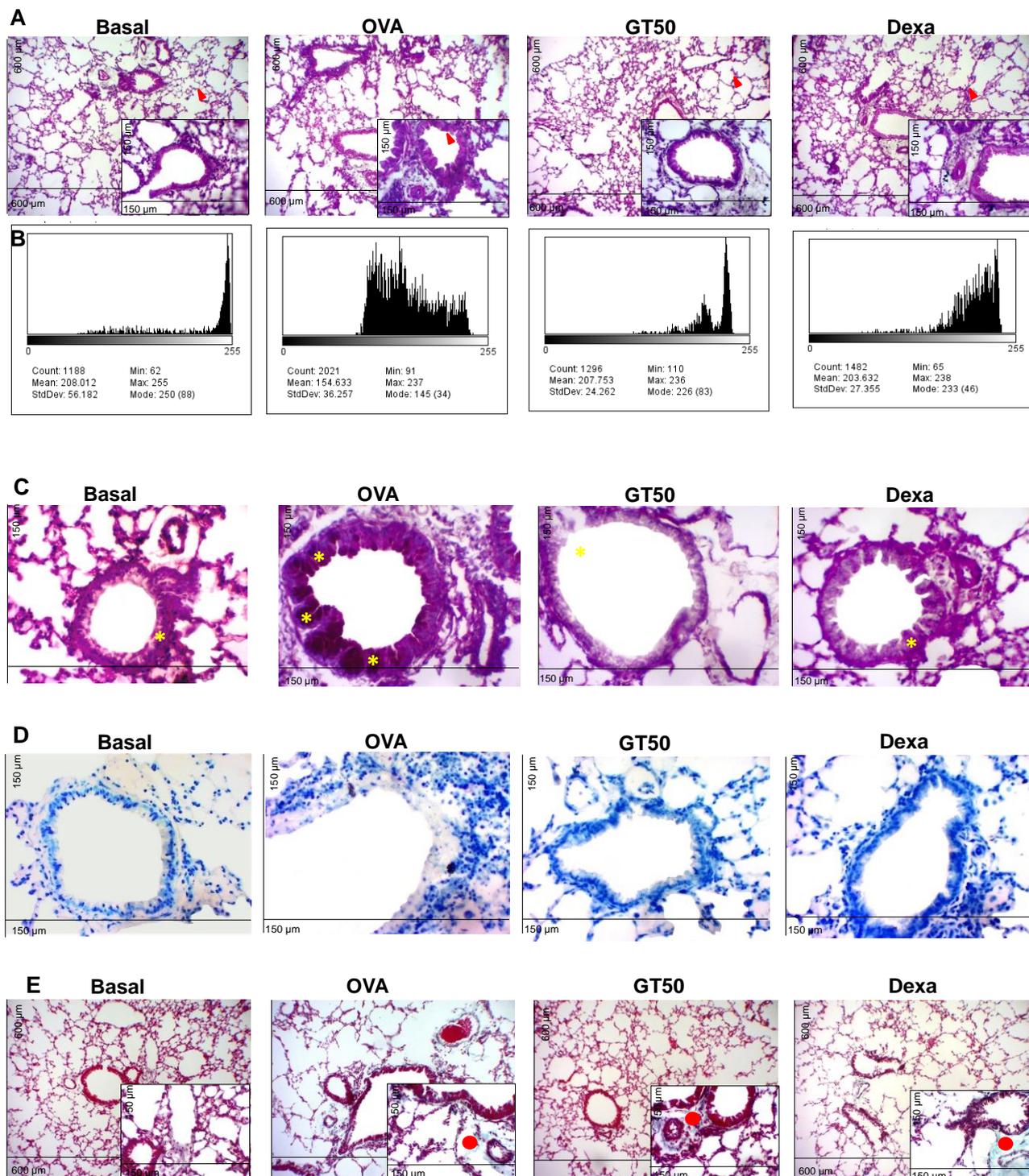
#### 4.3.5 Efeito do tratamento com GT no tecido pulmonar em animais com asma alérgica experimental

Após 24 h do último desafio com OVA, os animais foram eutanasiados e retirados os pulmões para análise histológica. Na coloração H&E observa-se as células que migraram para a cavidade nasal, na coloração PAS, o aumento de muco, na coloração AT, a presença de mastócitos e na coloração TG a deposição de fibras colágenas. Assim temos que os animais do grupo OVA apresentaram aumento significativo (score): no infiltrado celular nas regiões peribroncoalveolar e perivascular no tecido pulmonar ( $3,167 \pm 0,7528$  vs  $0,0 \pm 0,0$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente), muco na região bronquiolar ( $2,833 \pm 0,4082$  vs

0,0±0,0; p<0,0001; respectivamente), na presença de mastócitos no tecido pulmonar (0,8333±0,7528 vs 0.0±0.0; p<0,0001; respectivamente) e na deposição de fibras colágenas (1,167±0,4082 vs 0,0±0,0; p<0,0001; respectivamente) do tecido pulmonar, quando comparados ao grupo basal (Figura 20 e Gráfico 15).

O tratamento com GT50 em animais sensibilizados e desafiados com OVA foi capaz de diminuir o infiltrado celular (1,833±0,7528; p<0,001), a produção de muco (1,500±0,5477; p<0,0001) de forma semelhante a droga padrão dexametasona (2 mg/kg) (infiltrado - 2,000±0,6325; p<0,05; muco - 1,667±0,5164; p<0,0001) quando comparados aos tecidos pulmonares dos animais do grupo OVA (Figura 20 e Gráfico 15). O tratamento com GT50, bem como com a droga padrão dexametasona, não alteraram a presença de mastócitos, bem como a deposição de fibras colágenas.

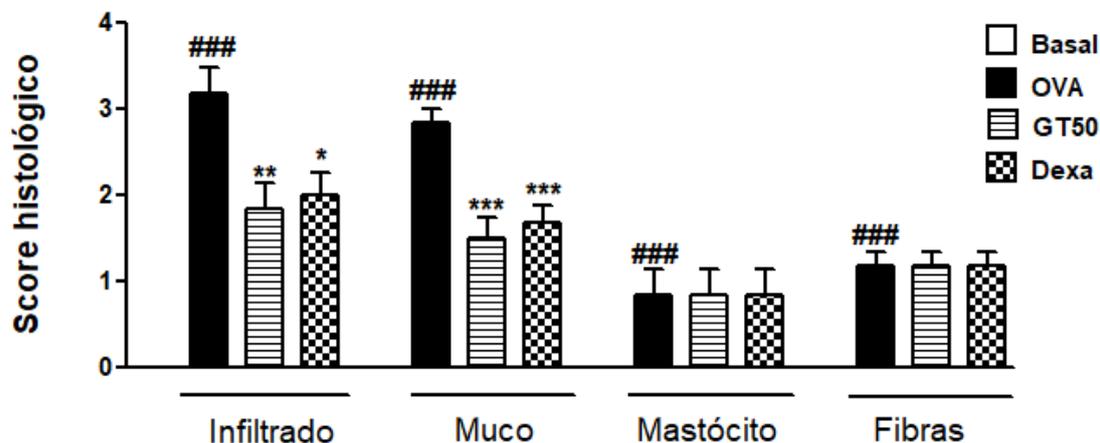
**Figura 20. Efeito do tratamento com GT no tecido pulmonar dos animais com asma alérgica experimental**



Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos. **A.** Tecido pulmonar corado por Hematoxilina Eosina (H&E), A.T 100x (600  $\mu$ m) e 400x (150  $\mu$ m).  $\Delta$  = infiltrado peribronquiolar e perivascular; **B.** Histogramas da quantidade de pixels mensurados nas fotomicrografias da cavidade pulmonar de camundongos BALB/c com asma, coradas em H&E, A.T 400x (150  $\mu$ m). Área mensurada 300x240 pixels; RGB (Red, Green, Blue); 281k; **C.** Tecidos pulmonares coradas por Ácido Periódico de Schiff (PAS), A.T 400x (150  $\mu$ m). \* = células caliciformes produtoras de muco; **D.** Tecido pulmonar de camundongos coradas em

azul de Toluidina (AT) A.T 100x (600  $\mu$ m); E. Tecido pulmonar de camundongos coradas em Tricrômico de Gomori (TG) A.T 100x (600  $\mu$ m) e 400x (150  $\mu$ m). • = fibras colágenas.

**Gráfico 15. Efeito do tratamento com GT no tecido pulmonar dos animais com asma alérgica experimental**



Análises das fotomicrografias do tecido pulmonar de camundongos. Os dados numéricos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; # p<0,05; ## p<0,001; ### p<0,0001; \* significativo em relação ao grupo OVA; \* p<0,05; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001.

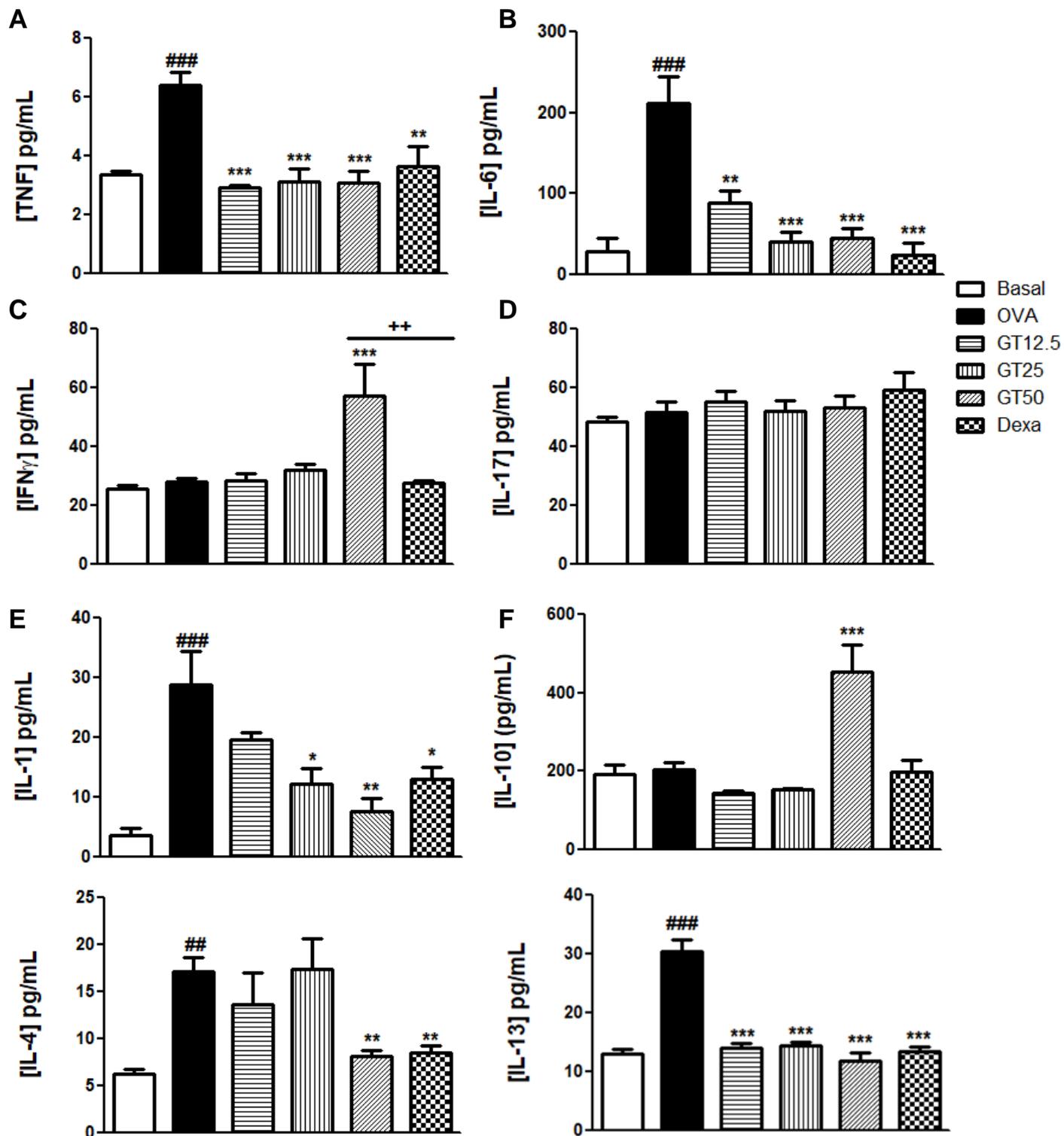
#### 4.3.6 Efeito do tratamento com GT na produção de citocinas por células presentes no lavado broncoalveolar dos animais com asma alérgica experimental

O fluido do lavado broncoalveolar (BALF) foi analisado quanto a produção de citocinas pelas células presentes na cavidade pulmonar. O BALF dos animais do grupo OVA apresentou aumento significativo das citocinas (pg/mL): TNF- $\alpha$  (6,389 $\pm$ 1,384 vs 3,375 $\pm$ 0,2560 p<0,0001), IL-6 (211,4 $\pm$ 72,88 vs 28,70 $\pm$ 37,74; p<0,0001); IL-1 $\beta$  (28,89 $\pm$ 5,25 vs 3,580 $\pm$ 2,130; p<0,0001); IL-4 (17,11 $\pm$ 5,838 vs 6,307 $\pm$ 1,235; p<0,001) e IL-13 (30,43 $\pm$ 5,729 vs 13,11 $\pm$ 2,182; p<0,0001) quando comparado ao BALF do grupo basal (Gráfico 16).

O tratamento com GT nas doses de 12,5 ou 25 mg/kg apresentaram diminuição das citocinas (pg/mL): TNF- $\alpha$  (2,943 $\pm$ 0,1810; p<0,0001 e 3,138 $\pm$ 1,315; p<0,0001; respectivamente); IL-6 (88,12 $\pm$ 16,63; p<0,001 e 41,09 $\pm$ 10,58; p<0,0001; respectivamente) e IL-13 (14,08 $\pm$ 1,793; p<0,0001 e 14,47 $\pm$ 1,425; p<0,0001; respectivamente). Apenas a dose de 25 mg/kg foi capaz de diminuir a IL-1 $\beta$  (12,21 $\pm$ 2,448; p<0,05) quando comparados com as

do grupo OVA (Gráfico 16). Em adição, o tratamento com GT50 promoveu diminuição de TNF- $\alpha$  ( $3,100 \pm 1,174$ ;  $p < 0,0001$ ), IL-6 ( $45,60 \pm 11,81$ ;  $p < 0,0001$ ); IL-1 $\beta$  ( $7,669 \pm 2,212$ ;  $p < 0,001$ ); IL-4 ( $8,112 \pm 1,974$ ;  $p < 0,001$ ) e IL-13 ( $11,89 \pm 2,680$ ;  $p < 0,0001$ ) semelhante ao grupo de animais tratado com dexametasona (TNF $\alpha$ -  $3,665 \pm 1,997$ ;  $p < 0,001$ / IL-6 -  $23,72 \pm 16,77$ ;  $p < 0,0001$ / IL-1 $\beta$  -  $13,07 \pm 1,743$ ;  $p < 0,05$ / IL-4 -  $8,472 \pm 2,087$ ;  $p < 0,001$ / IL-13 -  $13,48 \pm 1,887$ ;  $p < 0,0001$ ). Foi observado também um aumento nas concentrações das citocinas IFN $\gamma$  e IL-10 ( $56,94 \pm 11,96$ ;  $p < 0,0001$  e  $454,6 \pm 68,1$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente) quando comparado ao grupo OVA, fato este que só foi observado na dose de 50 mg/kg de GT (Gráfico 16).

Gráfico 16. Efeito do tratamento com GT na quantificação de citocinas na asma



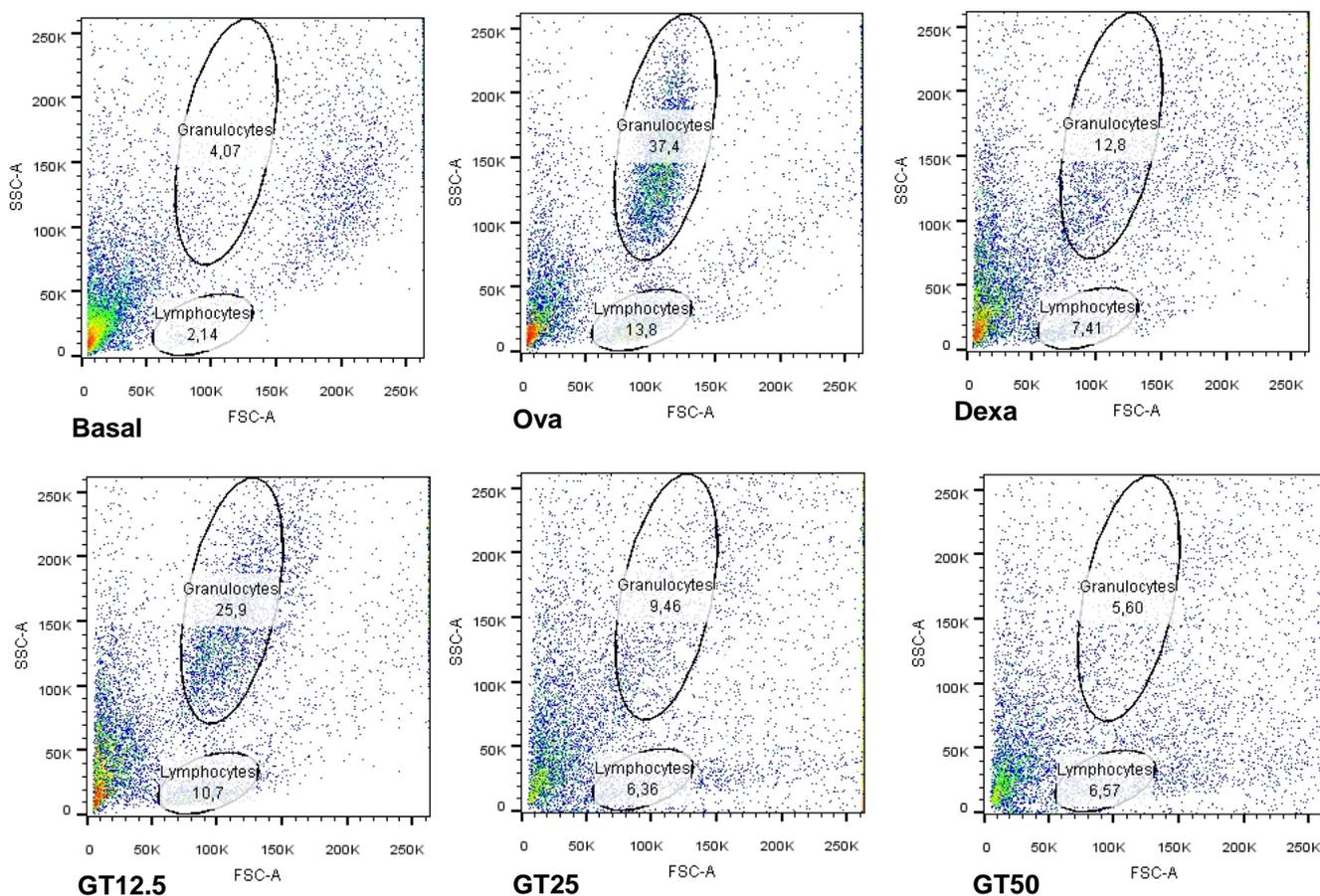
Camundongos BALB/c fêmeas (n=6/grupo) desafiados com ovalbumina (OVA) foram tratados com GT nas doses de 12,5; 25 ou 50 mg/kg uma hora antes cada desafio. Após 24 h do último desafio, os animais foram eutanasiados para obtenção do BALF e o sobrenadante foi utilizado para dosar citocinas. **A.** TNF- $\alpha$ ; **B.** IL-6; **C.** IFN $\gamma$ ; **D.** IL-17; **E.** IL-1 $\beta$ ; **F.** IL-10; **G.** IL-4; **H.** IL-13. Os dados numéricos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; # p<0,05; ## p<0,001; ### p<0,0001; \* significativo em relação ao grupo OVA; \* p<0,05; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001.

#### 4.3.7 Efeito do tratamento com GT no perfil de células presentes na cavidade pulmonar em animais com asma alérgica experimental

O grupo OVA apresentou aumento significativo tanto de granulócitos ( $3898 \pm 359,2$  vs  $246,7 \pm 37,88$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente) como de linfócitos ( $2150 \pm 144,8$  vs  $736,0 \pm 35,50$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente) no BALF quando comparado ao grupo basal (Figura 21 e Gráfico 17). Os tratamentos com GT 12,5 ou 25 mg/kg não interferiram no número dessas duas células no BALF. Entretanto, tanto o tratamento com GT na dose de 50 mg/kg quanto da droga padrão dexametasona foram capazes de reduzir o número de granulócitos ( $634,6 \pm 213,3$  e  $631,0 \pm 385,4$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente) e linfócitos ( $897,5 \pm 75,5$  e  $903,3 \pm 71,9$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente) quando comparados com o BALF do grupo OVA (Figura 21 e Gráfico 17).

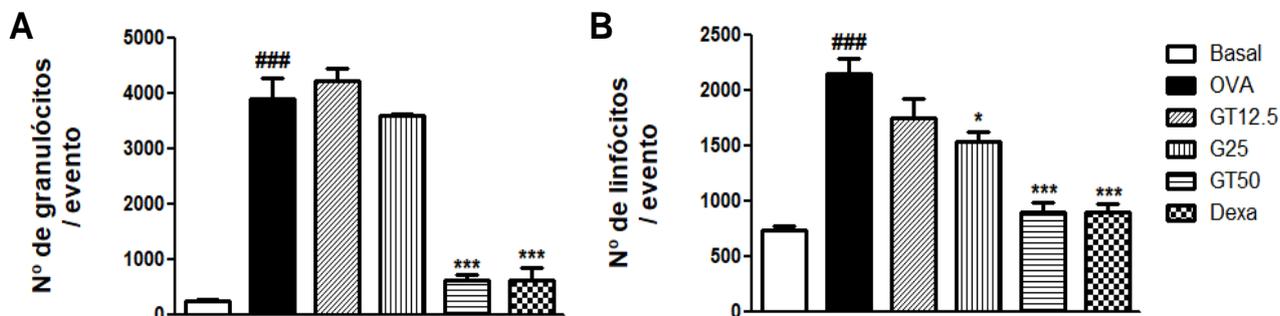
Na Figura 21 podemos observar os *dotplots* representativos dos grupos analisados em relação aos granulócitos e aos linfócitos.

**Figura 21. Análise das populações celulares em citometria de fluxo na asma**



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6/grupo) desafiados com ovalbumina (OVA) foram tratados com GT nas doses de 12,5; 25 ou 50 mg/kg uma hora antes cada desafio. Após 24 h do último desafio, os animais foram eutanasiados para obtenção do BALF e análise em citometria de fluxo, demonstrando o dotplot das populações analisadas.

**Gráfico 17. Análise das populações celulares em citometria de fluxo na asma**



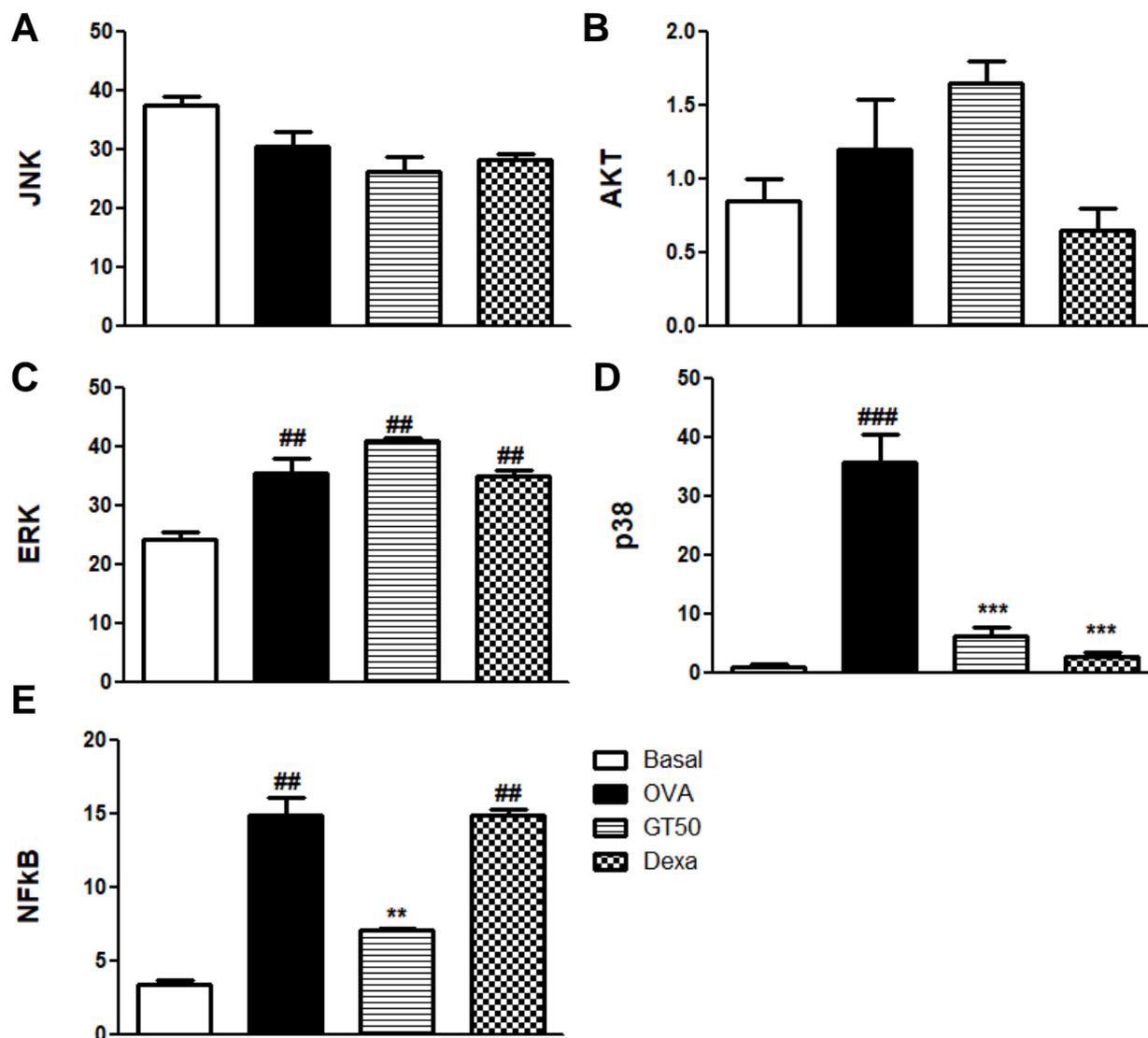
Camundongos BALB/c fêmeas (n=6/grupo) desafiados com ovalbumina (OVA) foram tratados com GT nas doses de 12,5; 25 ou 50 mg/kg uma hora antes cada desafio. Após 24 h do último desafio, os animais foram eutanasiados para obtenção do BALF e análise em citometria de fluxo. Os dados numéricos foram expressos em média  $\pm$  e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; # p<0,05; ## p<0,001; ### p<0,0001; \* significativo em relação ao grupo OVA; \* p<0,05; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001.

#### **4.3.8 Efeito do tratamento com GT na expressão de moléculas sinalizadoras em células do lavado bronco alveolar de animais com asma alérgica experimental**

Células do lavado bronco alveolar foram analisadas quanto a presença ou ausência de mediadores inflamatórios intracelulares, tais como: JNK, AKT, ERK1/2, p38 e p65NFkB. As células provenientes do BALF de animais do grupo OVA apresentaram aumento significativo na expressão das quinases ERK1/2 ( $35,55 \pm 2,777$  vs  $24,40 \pm 1,163$ ;  $p < 0,001$ ; respectivamente), p38 ( $35,80 \pm 5,60$  vs  $1,133 \pm 0,8420$ ;  $p < 0,0001$ ; respectivamente) e p65NFkB ( $3,450 \pm 0,3536$  e  $14,87 \pm 2,183$ ;  $p < 0,001$  respectivamente) quando comparadas as do grupo basal (Gráfico 18). Ambos os tratamentos, GT50 ou dexametasona, não foram capazes de reverter o aumento de ERK1/2 (Gráfico 18C). Entretanto, os tratamentos com GT50 ou com dexametasona foram capazes de reduzir a expressão de p38 ( $6,227 \pm 1,059$ ;  $p < 0,001$  e  $2,877 \pm 1,114$ ; respectivamente;  $p < 0,001$ ), porém apenas o tratamento com GT50 diminuiu a ativação de p65NFkB ( $7,150 \pm 0,07071$ ;  $p < 0,001$ ) quando comparados com o grupo OVA (Gráfico 18).

Com relação a proteína JNK e AKT, não foi observado alterações significativas na expressão dessas proteínas nas células do BALF nos grupos analisados (Gráfico 18).

Gráfico 18. Análise da expressão das vias de sinalização nas células do lavado bronco alveolar de animais com asma alérgica experimental



Camundongos BALB/c fêmeas (n=6) desafiados com ovalbumina (OVA) foram tratados com GT nas doses de 12,5; 25 ou 50 mg/kg uma hora antes cada desafio. Após 24 h do último desafio, os animais foram eutanasiados para obtenção do BALF e análise em citometria de fluxo. **A.** JNK; **B.** AKT; **C.** ERK; **D.** p38; **E.** NFkB. Os dados numéricos foram expressos em média ± e.p.m. (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey). # significativo em relação ao grupo Basal; # p<0,05; ## p<0,001; ### p<0,0001; \* significativo em relação ao grupo OVA; \* p<0,05; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001.

# *DISCUSSÃO*

## 5. DISCUSSÃO

O uso de óleos essenciais como substâncias de cura é uma forma de tratamento de origem bastante antiga, fundamentada no acúmulo de informações passadas por sucessivas gerações (ALI et al., 2015).

Os óleos essenciais, bem como seus constituintes, têm sido extensivamente estudados, e apresentaram inúmeros efeitos biológicos evidenciados em diversos modelos experimentais, incluindo efeitos: antialérgico, tumoricida, analgésico, antimicrobiano, anticonvulsivante e anti-inflamatório (PASSOS et al., 2007; DA SILVA et al., 2015; KHODABAKHSH et al., 2015; MOIRANGTHEM et al., 2015; SARMENTO-NETO et al., 2015; AMBROZ et al., 2016; GIOVANNINI et al., 2016). Esse grande número de efeitos deve-se a diversidade estrutural de seus constituintes químicos.

Os principais constituintes dos óleos essenciais são os terpenos, compostos encontrados em plantas aromáticas, em especial os monoterpenos, que constituem cerca de 90% (GUIMARAES et al., 2013). Os monoterpenos são formados pela condensação de duas unidades de isopreno ou isopentano (BANTHORPE et al., 1972) e, estudos recentes têm demonstrado que esses compostos naturais apresentam uma grande variedade de ações biológicas, incluindo atividade anti-inflamatória (SILVA et al., 2012; JUERGENS, 2014; MOREIRA et al., 2014; SILVA et al., 2014).

A inflamação é uma reação de proteção local gerada por células/tecidos/moléculas do corpo em resposta a agentes microbianos, injúria, irritação alérgica ou química. Os sintomas clássicos da inflamação são caracterizados por dor, calor, vermelhidão, inchaço e perda de função, que resultando na dilatação dos vasos sanguíneos que conduzem a um aumento do fornecimento de sangue e de aumento dos espaços intercelulares, promovendo o movimento de leucócitos, proteínas e fluidos na região inflamada. Esse processo é essencial para a manutenção da homeostase dos tecidos (MEDZHITOV, 2010; KOTAS et al., 2015). Entretanto, uma inflamação descontrolada pode gerar danos nos tecidos, e contribuir para o aparecimento de doenças inflamatórias de caráter agudo, como por exemplo, a lesão pulmonar aguda (LPA) (TSUSHIMA et al., 2009; ZAWROTNIAK et al., 2013; KOTAS et al., 2015) e de caráter crônico como a rinite e a asma.

Constituintes obtidos de plantas que inibem alvos moleculares, responsáveis por iniciar e manter o processo inflamatório são substâncias com alto potencial terapêutico, podendo ser utilizados para a produção e desenvolvimento de novos medicamentos. Com base nestas observações, vários monoterpenos de origem vegetal vêm sendo pesquisados e analisados na busca de novas terapias para o tratamento de distúrbios inflamatórios (MENDES et al., 2010a).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo investigar o possível efeito do monoterpeno gama-terpineno (GT) em protocolos de inflamações aguda e crônica. Inicialmente, analisamos o efeito anti-inflamatório do GT na inflamação aguda no protocolo da LPA.

A LPA é uma síndrome de incidência mundial variável, potencialmente fatal que causa alta morbidade e mortalidade, com estimativa de 74.500 mortes por ano. Pacientes internados em unidades de terapia intensiva são os mais afetados. No entanto, os indivíduos com múltiplas comorbidades, abuso crônico de álcool, ou doença pulmonar crônica também apresentam um alto risco de desenvolver a doença (TSUSHIMA et al., 2009; HU et al., 2017). Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas e são responsáveis por danos teciduais na LPA. Em adição, a sua persistência tem sido associada com o prognóstico desfavorável da doença. Ativação dos neutrófilos induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e enzimas granulares, resultando na lesão do tecido pulmonar, e ativando a cascata inflamatória (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011).

A administração em animais experimentais de lipopolissacarídeo (LPS), componente de parede celular de bactérias gram-negativas, em camundongos, induz sintomas que se assemelham a LPA em humanos, e tem se destacado como uma importante estratégia para explorar os mecanismos envolvidos na patogênese da doença e descobrir novas formas de tratamento para a LPA (GUO et al., 2012; PACHECO DE OLIVEIRA et al., 2015).

Estudos demonstraram que o tratamento com os monoterpenos limoneno e 1,8-cineol diminuía os sintomas da LPA, uma vez que reduzia a migração celular, principalmente de neutrófilos, e este evento repetia-se na histologia do tecido pulmonar, bem como na diminuição do edema no tecido

(CHI et al., 2013; ZHAO et al., 2014). Estes eventos são importantes, pois existe uma semelhança estrutural entre o 1,8-cineol e o gama-terpineno.

No nosso estudo, verificou-se que o tratamento com GT em camundongos da linhagem isogênica BALB/c desafiados com LPS, reduziu significativamente a migração de leucócitos no lavado brônquioalveolar (BALF), tanto de neutrófilos, quanto de células mononucleares. Essa inibição da migração celular para a cavidade do pulmão sugere que o GT atenua a inflamação pulmonar induzida pelo LPS, evento importante na LPA.

Uma das causas da inflamação celular pulmonar na LPA é o aumento da permeabilidade vascular, o que leva a formação de edema, assim, a melhora deste parâmetro é extremamente benéfica para a não progressão da inflamação pulmonar na LPA (CHI et al., 2013; ZHAO et al., 2014). Zhao e colaboradores (2014) demonstraram que o tratamento com o monoterpeno 1,8-cineol diminuía tanto a quantidade de proteínas totais, como o edema pulmonar e estes eventos foram associados como uma marcante melhora no edema pulmonar.

Para averiguar a hipótese de que o GT poderia estar também diminuindo o edema pulmonar, verificamos a produção do mesmo ao medirmos o extravasamento de proteínas e o peso pulmonar. Como resultado, o tratamento com o GT nos animais com LPA diminuiu o exsudato proteico na cavidade pulmonar e conseqüentemente diminuiu o edema pulmonar, evidenciado também, pela redução da razão do peso. Esses dados corroboram com os achados histológicos no tecido pulmonar, que demonstram clara redução do edema, da hemorragia e diminuição de deposição de fibras colágenas no tecido local.

A deposição de fibra de colágeno no pulmão ocorre com o aumento do estresse oxidativo, responsável pelos danos endoteliais, expansão da permeabilidade vascular, inflamação pulmonar e edema; elevação na expressão de TGF- $\beta$ , que ativa migração e proliferação de fibroblasto (SUN et al., 2006; ZHI et al., 2011). Portanto esses resultados indicaram que GT apresenta a capacidade de, efetivamente, atenuar os danos no endotélio causado pelo LPS. Essa ação pode ser por via direta e/ou indireta sobre o endotélio.

Na LPA diversos mediadores são responsáveis por atuar sobre as células endoteliais e manter o recrutamento de neutrófilos de forma sustentada devido ao aumento da permeabilidade vascular (GROMMES; SOEHNLEIN, 2011; SHAH et al., 2014). Entre esses mediadores estão as citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6 (VITIELLO et al., 2012; ZHANG et al., 2013). Associada à produção exacerbada dessas citocinas está a produção das quimiocinas tais como: KC (quimiocina derivada de queratinócito), proteína inibidora de monócitos 2 (MIP-2), e CXCL5 que recrutam neutrófilos para o pulmão (WOLPE et al., 1989; WUYTS et al., 1996; ROSSI et al., 1999; SHAH et al., 2014). É amplamente aceito que as citocinas inflamatórias desempenham um papel crucial na patogênese da LPA induzida por LPS, dentre elas especialmente as descritas anteriormente, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, as quais foram identificadas como mediadores importantes na infiltração de leucócitos no pulmão e danos nos tecidos (ZHANG et al., 2013). Estudo demonstrou que o LPS induziu um aumento significativo dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nos tecidos pulmonares e que o tratamento com o monoterpeneo 1,8-cineol reduziu os níveis destas citocinas (ZHANG et al., 2013), demonstrando um efeito imunomodulador desta substância.

O óleo essencial 1,4-cineol, outro monoterpeneo de estrutura semelhante ao gama-terpineno, também foi descrito como supressor da produção das citocinas inflamatórias IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em modelo experimental de lesão pulmonar aguda, além de apresentar efeito anti-inflamatório, uma vez que seu tratamento inibiu a migração de leucócitos para fluido broncoalveolar (BALF), especialmente de neutrófilos, com redução da atividade da mieloperoxidase, enzima esta relacionada com os neutrófilos (LEITE et al., 2015). O tratamento com o monoterpeneo limoneno também apresentou efeito supressor destas mesmas citocinas (CHI et al., 2013).

Em nosso estudo o tratamento com GT na dose de 50 mg/kg reduziu a produção das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, induzidas pelo LPS. Esses resultados indicam que o monoterpeneo está atuando diretamente nas células do tecido pulmonar responsáveis pela produção dessas citocinas, sugerindo efeito nos mecanismos de ativação de vias de transcrição de sinal, envolvidas na produção desses mediadores, como por exemplo, o NF $\kappa$ B (fator nuclear  $\kappa$ B) e as MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*).

O efeito do LPS é mediado principalmente pela ativação de receptores semelhante ao *toll* em células fagocíticas (TLR4). Esses receptores ativados desencadeiam a ativação de vias de sinalização como MAPK, AP-1 (*activator protein 1*), STAT (*signal transducer and activator of transcription*), IRF3 (*interferon (IFN)-regulatory factor 3*) entre outras. As células envolvidas no processo inflamatório quando ativadas produzem citocinas e quimiocinas via p38, ERK1/2 e/o fator de transcrição NFκB ativados, os quais promovem a transcrição de genes para a síntese de dessas moléculas (SAKLATVALA, 2004; ZARUBIN; HAN, 2005; MAENG et al., 2006; SCHINDLER et al., 2007; LAWRENCE, 2009; MORRISON, 2012; HOESEL; SCHMID, 2013; HU et al., 2017). Estudo demonstrou que a expressão do TLR4 e ativação do NFκB foram reguladas positivamente após o desafio com LPS e que o tratamento com o monoterpeno 1,8-cineol reduziu essa expressão aumentada (ZHANG et al., 2013). Curiosamente, neste mesmo estudo, o corticoide prednisona diminuiu significativamente a ativação de NFκB, mas não apresentou efeito na expressão de TLR4, sugerindo que a sinalização de seu efeito pode ser diferente da de 1,8-cineol. Estes resultados indicaram que o efeito anti-inflamatório do 1,8-cineol, pelo menos em parte, pode ser mediado pela inibição da expressão de TLR4, que leva a diminuição da ativação de NF-κB (ZHANG et al., 2013).

O tratamento com GT50 diminuiu a expressão do ligante do LPS, o receptor TLR4, bem como reduziu a ativação de NFκB e p38. Portanto, o conjunto desses resultados indica que a redução dos níveis das citocinas inflamatórias observadas pelo tratamento com o GT seja, em parte, devido à redução da expressão do receptor TLR4, que induz uma diminuição da produção de citocinas por reduzir a ativação de fatores como o NFκB e p38.

Devido ao fato do tratamento com o GT ter inibido mediadores inflamatórios, proteicos e transcricionais no processo inflamatório agudo, evidenciado no protocolo de LPA, nosso próximo passo foi avaliar se o tratamento com GT poderia apresentar efeitos em modelos experimentais de inflamação crônica, representados pela rinite e asma alérgica.

A rinite alérgica (RA) caracteriza-se por ser uma inflamação das vias aéreas superiores, especificamente da mucosa, com sintomas clínicos tais como: congestão, rinorréia, espirros, coceira e prurido nasal (NG & WANG,

2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que cerca de 25% da população mundial seja portadora de RA (PAHO, 2016).

No modelo experimental de rinite alérgica induzida por ovalbumina (OVA) observamos um aumento dos sinais clínicos como fricção e espirro nos animais do grupo OVA e o tratamento com GT foi capaz de reverter este parâmetro. Assim prosseguimos com experimentos para entender de qual seria o mecanismo associado a esta melhora e evidenciamos que os animais sensibilizados e desafiados com OVA e não tratados (animais doentes) apresentaram um aumento na migração de células inflamatórias no fluido do lavado nasal (NALF), incluindo os eosinófilos, e que o tratamento com GT promoveu uma diminuição da migração dessas células. Na análise histológica dos tecidos nasais, corados com Hematoxilina Eosina (H&E), observou-se a instalação do processo inflamatório, evidenciado pelo aumento da migração celular perivascular subepitelial na cavidade nasal nos animais do grupo OVA. O tratamento com GT, por sua vez, diminuiu significativamente o infiltrado celular no tecido, corroborando com os resultados obtidos no NALF.

Na RA, a obstrução das vias aéreas superiores pela produção excessiva de muco é uma observação comum nos pacientes. O epitélio nasal apresenta aumento no número de células caliciformes da mucosa (hiperplasia/hipertrofia), com depósito excessivo de muco (WADSWORTH et al., 2011). Assim, a excessiva produção de muco é um sintoma importante na RA, e uma vez diminuído, promove uma melhora da sintomatologia da doença (PAPADOPOULOS et al., 2015). Estudo demonstrou que o tratamento com 1,8-cineol promoveu diminuição da hipersecreção de muco em protocolo de inflamação crônica como a RA (JUERGES et al., 2013).

No tecido nasal dos animais doentes tratados com o GT e corado com Ácido Periódico de Schiff (PAS) observou-se redução na produção de muco pelas células caliciformes. Estes resultados sugerem que o GT atua inibindo a produção de mediadores inflamatórios e, além disso, pode estar atuando nas células da mucosa, no sentido de diminuir suas ativações e, conseqüente, produção de muco, resultado este evidenciado na inflamação aguda ocasionada pela LPA.

Outra célula efetora na resposta da RA é o mastócito o qual é sensibilizado por IgE alérgeno-específica e, uma vez havendo a ligação

cruzada do alérgeno a esta IgE, promove a desgranulação desta célula, com consequente liberação tanto de citocinas como a IL-5 e IL-13, bem como de mediadores inflamatórios tais como histamina e leucotrienos, característicos de doenças alérgicas como rinite, asma, urticária e dermatite de contato (BROIDE et al., 2011). Estudo demonstrou que o tratamento com o monoterpene  $\alpha$ -terpineno, em protocolo de rinite, diminuía sintomas relacionados a esta doença, pois promovia diminuição secreção de muco no tecido nasal (NAM et al., 2014).

A análise histológica do tecido nasal, corado com Azul de Toluidina (AT), dos animais doentes e tratados com GT promoveu uma redução dos mastócitos quando comparados com os animais do grupo OVA. Este efeito do GT é de extrema importância para a diminuição do progresso do processo alérgico na rinite e consequente melhora dos sintomas.

O aumento de células e de mediadores inflamatórios, como consequência do quadro persistente de rinite, está associado também às alterações estruturais das vias aéreas, denominadas de remodelamento do tecido das vias aéreas (MANSO et al., 2012). Este conjunto de eventos inclui: a perda da integridade epitelial, a fibrose subepitelial com deposição de colágeno, hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas, aumento da produção de muco e de glândulas submucosas e espessamento da parede das vias aéreas (LEE et al., 2017). Nesse contexto avaliamos o tecido nasal com a coloração Tricrômico de Gomori (TG) e observamos que o tratamento com GT50 não foi capaz de reverter o remodelamento epitelial observado pelo depósito de fibras de colágeno no tecido nasal quando comparados com os animais do grupo OVA. Assim podemos sugerir que o GT50 não atua em fibroblastos, sendo seu mecanismo de ação por outra via.

A RA é uma doença multifatorial e que geralmente está associada a outras doenças, tais como: conjuntivite alérgica, rinosinusite e especialmente a asma (GOMÉZ et al., 2015). A RA constitui um fator de risco para o desenvolvimento da asma, onde mais de 80% desses pacientes possuem comorbidade com asma alérgica (CRUZ et al., 2007; HENS et al., 2008; LAMBRECHT et al., 2015), isso devido a fortes interações entre asma, rinite e seus alérgenos e que na rinite a inflamação é presente nas vias aéreas

superiores enquanto que na asma é nas vias aéreas inferiores (MOSCATO et al., 2008; SHAABAN et al., 2007; ROCHAT et al., 2010).

Ambas as doenças afetam diretamente a qualidade de vida do indivíduo, não apenas por alterações respiratórias, mas também por prejuízos comportamentais, funcionais e físicos, podendo estar relacionada com sintomas de depressão e ansiedade (MATOS et al. 2007; CAMPANHA et al., 2008; GIACCO et al., 2016). A alta prevalência desses sintomas psicológicos pode estar associada às manifestações clínicas das doenças, como intensa secreção e dispneia. Assim as respostas psicológicas do paciente surgem à medida que este se confronta com as significativas limitações para realizar as atividades de vida diária e com o esforço exigido para ajustar-se à incapacidade respiratória (FURTADO et al. 2012; GIACCO et al., 2016).

Observações clínicas de insuficiência respiratória grave em pacientes que apresentam transtornos de ansiedade têm estimulado muitas pesquisas no sentido de identificar anormalidades respiratórias associadas a esta síndrome.

Outro dado relevante é que animais submetidos à modelos de indução de alergias apresentam-se mais ansiosos do que aqueles que não passaram pelo mesmo processo, apresentando efeito ansiogênico o desafio com OVA (RIETVELD et al., 1999; VAMOS e KOLBE, 1999; PORTELA et al., 2001; MOZZINI-MONTEIRO et al., 2016). Este fato é de extrema importância, pois tanto a alergia como a ansiedade são capazes de alterar parâmetros respiratórios (CARNEVALI et al., 2013; MOZZINI-MONTEIRO et al., 2016). Além disso, a associação da ansiedade e da respiração vem sendo documentada, sendo a respiração um parâmetro de diagnóstico de desordens de ansiedade (FREIRE et al., 2012). Diante do exposto, medicações ideais para a asma deveriam combinar propriedades anti-inflamatórias e ansiolíticas.

Partindo do raciocínio descrito acima, avaliamos o efeito do tratamento com o GT em modelo experimental de asma alérgica (camundongos BALB/c sensibilizados e desafiados com OVA) no intuito de, além de observar os parâmetros inflamatórios relacionados à doença, verificar os parâmetros de ansiedade, desses animais, utilizamos dois testes: o labirinto em cruz elevado (LCE) e a placa perfurada (SCHMITT E HIEMKE, 1998; LIMA et al., 2013), uma vez que estudos com outros óleos essenciais demonstram a atividade ansiolítica de monoterpenos como: mirtenol (MOREIRA et al., 2014); limoneno (LIMA et al.,

2013; ALVES, et al., 2016); 1,4-cineol (GOMES, et al., 2010) e 1,8-cineol (KIM et al., 2014), sendo que os três últimos compostos apresentam semelhança estrutural com o gama-terpineno.

Em linhas gerais o LCE baseia-se no comportamento de ansiedade de roedores e a predisposição destes animais em permanecer nos espaços fechados, escuros, além de um incondicionado medo de alturas e espaços abertos (BRADLEY et al., 2007). Assim ao serem colocados no centro do aparato, os animais demonstram clara tendência a explorar os braços fechados, em detrimento aos abertos, devido á aversão por altura e por espaços abertos.

Inicialmente, os resultados do teste LCE demonstram diferenças comportamentais de ansiedade entre os animais do grupo basal e OVA, onde os animais do grupo OVA permaneceram tempo maior nos braços fechados do aparelho. O comportamento dos animais do grupo OVA, nesse teste, deve-se provavelmente às alterações respiratórias, as quais levam o animal a desenvolver o que chamamos de comportamento doentio, que se apresenta como o conjunto de alterações tais como: diminuição de locomoção em geral (mas com maior importância daquela dirigida à exploração ambiental) e, entre outros sinais e sintomas, redução da autolimpeza (PALERMO-NETO e ALVES, 2010; MOZZINI-MONTEIRO, 2016).

Entretanto, o tratamento desses animais com GT, nas diferentes doses (12,5; 25 e 50 mg/kg) foi capaz de reverter o comportamento de ansiedade sendo a de 50 mg/kg a mais efetiva, pois apresentou efeito semelhante a droga padrão diazepam, sugerindo um efeito ansiolítico do monoterpeneo GT, corroborando assim com os resultados de outros monoterpeneos que também apresentam atividade ansiolítica (GOMES, et al., 2010; LIMA et al., 2013; KIM et al., 2014; ALVES, et al., 2016).

Entretanto, para que uma substância seja caracterizada como ansiolítica, esta deve ser testada por no mínimo duas metodologias comportamentais, portanto aplicamos o teste da Placa Perfurada (PP). Este teste baseia-se na observação da atividade exploratória, espreitamento (mergulhos) ou *headdips* (mergulho de cabeça), e o número aumentado desses parâmetros são inversamente proporcionais ao estado de ansiedade dos animais (FILE e WARDILL, 1976; TSUJI et al., 1998).

Utilizando o teste PP observamos que houve diferenças comportamentais significantes entre o grupo basal (animais saudáveis) e o grupo OVA (animais doentes). Os animais do grupo OVA apresentaram diminuição da capacidade exploratória demonstrando, portanto, o efeito ansiogênico da OVA. Esses resultados corroboram com dados anteriores realizados em nosso laboratório (MOZZINI-MONTEIRO et al., 2016), onde foi demonstrado que animais do grupo OVA, apresentavam um comportamento doentio, o que diminuía a capacidade exploratória, aumentando assim os sinais de ansiedade, característicos deste comportamento (MOZZINI-MONTEIRO et al., 2016).

Os animais doentes tratados com GT apresentaram um quadro inverso ao observado nos os animais doentes e não tratados, sendo a melhor dose do monoterpeno a de 50 mg/kg, pois apresentou atividade ansiolítica semelhante ao diazepam.

Tem sido descrito que camundongos expostos a protocolos de alergia apresentavam-se ansiosos em testes comportamentais, e que ocorrem também mudanças na atividade cerebral de alguns núcleos específicos do hipotálamo. Tais mudanças cerebrais foram então evidenciadas pela presença da proteína c-fos nestes núcleos em animais alérgicos, os quais apresentavam elevada produção de IgE (BASSO et al., 2003; COSTA-PINTO et al., 2005).

O c-fos é o produto de um gene que desempenha um papel importante como fator de transcrição, transcrevendo a proteína Fos, em vários tipos de células, incluindo neurônios. A atividade desse gene demonstra intensa atividade cerebral na área onde a proteína se deposita. Segundo Costa-Pinto (2006) os núcleos cerebrais que são ativados na última hora antes da eutanásia aparecem castanho escuro após a coloração, permitindo a quantificação de núcleos Fos positivos, diretamente associados à atividade dessa área específica do cérebro. A ativação da proteína Fos se dá pelos mais diversos estímulos, como, por exemplo, a despolarização de neurônios, epilepsia, estímulo nociceptivo e estresse, podendo estar envolvida em vários processos fisiológicos (HUNT et al., 1987).

Estudos demonstraram aumento na atividade do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e do núcleo central da amígdala (CeA) evidenciados pela produção da proteína Fos em animais sensibilizados e desafiados com OVA

(modelo experimental de asma alérgica). Estas áreas cerebrais foram então associadas a alterações comportamentais e respostas ao estresse, promovendo a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (BASSO et al., 2003; COSTA-PINTO et al., 2005).

Costa Pinto e colaboradores (2006) também demonstraram, em no modelo experimental de asma induzido por OVA, que os animais alérgicos com altos níveis de IgE-OVA específica, apresentam elevada expressão de c-fos em determinadas áreas do cérebro como PVN e CeA e que, uma vez tratados com anticorpos anti-IgE, os mesmo apresentavam inibição na expressão do c-fos, sugerindo que há uma relação direta entre a expressão de c-fos no cérebro e a presença de IgE-alérgeno específica. Assim hipotetizamos que medicações que promovessem uma diminuição de IgE, poderiam então reduzir a expressão de c-fos no cérebro.

Em nosso estudo demonstramos que o tratamento com GT50 em animais sensibilizados e desafiados com OVA promoveu uma diminuição na expressão de c-fos nas áreas cerebrais PVN e CeA, quando comparados com os animais sensibilizados e desafiados com OVA e não tratados. Esses dados corroboram com estudos anteriores descritos acima (COSTA-PINTO et al. 2006) e apontam que o monoterpeneo GT apresenta um possível efeito imunomodulador na asma alérgica experimental.

A asma é uma doença com elevada prevalência em todo o mundo e é de grande preocupação para a saúde pública (KOATZ et al., 2016). Os pacientes com essas doenças apresentam respostas imunológicas exacerbadas, havendo uma preponderância do perfil Th2 e níveis elevados de IgE-alérgeno específica (CHEN et al., 2014; AL-MOHANNA et al., 1993; CIRILLO et al., 2007; JIN et al., 2014; KOATZ et al., 2016). O modelo experimental de asma alérgica induzida por OVA caracteriza-se por apresentar um perfil tipo Th2 e níveis elevados de IgE-OVA específica (LAMBRECHT et al., 2015; FAJT et al., 2015; MURARO et al., 2016; FRICKER et al., 2017).

Estudo demonstrou que o monoterpeneo timoquinona diminuiu tanto os níveis séricos elevados de IgE e IgG1 específicos para OVA, como a eosinofilia e o muco produzido pelas células caliciformes (GAZZAR et al., 2006).

Nossos resultados demonstram que o tratamento com o GT (50 mg/kg) reduziu, em 4 vezes, o título sérico de IgE-OVA-específica quando comparado

com os soros dos animais do grupo basal, sugerindo que o tratamento com o monoterpeno esteja imunomodulando a resposta imune característica da asma alérgica.

Além da presença de altos níveis de IgE, outra característica da asma é o recrutamento das células inflamatórias para o pulmão. Para avaliar a migração celular, as células totais e diferenciais (monócito, linfócito, neutrófilo e eosinófilo) foram quantificadas no BALF dos animais sensibilizados e desafiados com OVA. Os resultados demonstraram uma intensa migração celular no grupo OVA quando comparado com o grupo basal, indicando que o processo inflamatório foi estabelecido nestes animais. Além do aumento característico observado nas células totais, evidenciou-se também aumento nas células diferenciais, tais como: macrófago, linfócito, neutrófilo e eosinófilo nas vias aéreas, um indicativo de processo patológico. O tratamento com GT preveniu os sinais inflamatórios ao reduzir celularidade total e diferencial, sendo a dose de 50 mg/kg a mais eficaz, uma vez que atuou de forma semelhante a droga padrão dexametasona. Esses resultados corroboram com os anteriormente descritos, os quais foi observado efeito imunomodulador do GT no modelo experimental de inflamação aguda (LPA) e crônica (RA).

Tendo em vista que o tratamento com o GT nos animais com asma alérgica foi capaz de diminuir a migração de células inflamatórias para a cavidade pulmonar detectada no BALF, partimos então para confirmar se essa inibição de migração ocorria também no tecido, através de análise histológica, utilizando diferentes corantes.

Estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram em modelo experimental de asma alérgica, um aumento do infiltrado inflamatório no tecido pulmonar (VIEIRA et al., 2013; MOZZINI-MONTEIRO et al., 2016) e, esse infiltrado leucocitário também está presente quando se analisa a asma em conjunto com os testes de ansiedade (MOZZINI-MONTEIRO et al., 2016).

A coloração com o Ácido Periódico de Schiff (PAS) dos tecidos pulmonares promove a observação da secreção de muco pelas células caliciformes, evento este muito marcante na asma.

A hipersecreção de muco, no contexto de inflamação alérgica, é um processo complexo ainda não totalmente explicado. Foi demonstrado que a metaplasia das células produtoras de muco envolve a indução de genes de

mucina (MUC5AC), armazenamento nos grânulos pré-formados, liberação dos grânulos para o interior do lúmen das vias aéreas e, alterações na viscosidade do muco (GOUR et al., 2015). Sabe-se ainda, que o processo de produção da IL-13 no epitélio das vias aéreas exerce importância fundamental na hiper-responsividade (GOUR et al., 2015). Inicialmente, as células sofrem uma transição fenotípica para células caliciformes pelas ações de vários fatores de transcrição incluindo Spdef (ETS) e Foxa2. A IL-13 induz a expressão do Fator de transcrição do epitélio ETS (Spdef), mediado por STAT6 (PARK et al., 2007). O fator Spdef, por sua vez, inibe a transcrição de Foxa2, que é necessário para a manutenção da diferenciação do epitélio das vias aéreas dentro da normalidade (CHEN et al., 2009). A inibição de Foxa2 acarreta a metaplasia de células caliciformes e a produção de mucinas (ALEVY et al., 2012).

Recentemente foi demonstrado também que a deficiência no gene MUC5AC cessa a hiper-responsividade das vias aéreas (AHR) em modelo alérgico experimental, apresentando uma redução de 74% na obstrução pelo muco, sugerindo que a obstrução mediada por MUC5AC das vias aéreas é uma mecanismo de indução da AHR (EVANS et al., 2015).

Em nosso estudo observamos que os animais do grupo OVA apresentaram um aumento no número de células caliciformes (hiperplasia) e aumento na quantidade de muco (hipertrofia). O tratamento com GT50, por sua vez, reduziu a produção deste muco.

Outros aspectos avaliados nesse estudo foram as análises histológicas com colorações para visualização da presença de mastócitos e para a deposição de fibras colágenas, tendo em vista o processo de remodelamento do epitélio, explicado anteriormente. Os animais do grupo OVA apresentaram um aumento tanto no número de mastócitos como na presença de fibras de colágeno, evento este que não sofreu alterações pelo tratamento com o GT.

Um dos parâmetros da resposta imune fundamental na asma tipo 2 é a presença de citocinas do perfil Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13 nos indivíduos alérgicos. Assim, a regulação na produção dessas citocinas nos pulmões desses indivíduos é de vital importância para o controle dos sintomas da asma (FRICKER et al., 2017).

A imunomodulação do processo inflamatório da asma para o perfil Th1 com consequência da supressão do perfil Th2 é benéfica em relação aos sintomas clínicos, pois ocorre redução do processo inflamatório mediado por eosinófilos e IgE. Por exemplo, em estudos onde foi realizada a transferência adotiva de células Th1 para animais sensibilizados e desafiados com OVA houve diminuição dos sintomas relacionados a asma (GAVETT et al., 1995; LAMBRECHT et al., 2016). A imunomodulação também pode ser promovida por células Treg e estudos demonstraram que essas células promovem a supressão da inflamação na asma pela secreção das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ . Ambas as citocinas apresentam a capacidade de inibir a ativação de macrófagos e células dendríticas no pulmão, diminuindo assim o processo de apresentação antigênica aos linfócitos T (LEWKOWICH et al., 2005), além de interagir com células endoteliais, prevenindo a angiogênese (HUANG et al., 2009).

Ao analisarmos os dados no nosso trabalho, observamos que o tratamento com o GT nos animais doentes diminuiu a produção de citocinas do perfil Th2 (IL-4 e IL-13), aumentou a citocina do perfil Th1 (IFN- $\gamma$ ), manteve as concentrações do perfil Th17 (IL-17) e aumentou a citocina do perfil regulatório (IL-10) quando comparado à produção dessas citocinas nos animais doentes não tratados. Esses dados indicam a capacidade imunomoduladora do monoterpeno desviando a resposta do perfil Th2 para o perfil Th1, devido a produção de IFN- $\gamma$ , sendo estas respostas imunoreguladas pela produção de IL-10.

Considerando que as citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) estão diretamente envolvidas na: produção de IgE-alérgeno específica por plasmócitos (IL-4 e IL-13) (WOODRUFF et al., 2007; WOODRUFF et al., 2009), produção, pela medula óssea, de eosinófilos (IL-5) (BRUSSELE et al., 1994) e remodelamento das vias aéreas (IL-13) (HOLGATE et al., 2008), os esforços em encontrar medicações que minimizam os efeitos desses mediadores têm sido grande. Visando a descoberta de medicações eficazes na asma e específicas, as terapias com anticorpos monoclonais que inibam a IL-4 e a IL-13 estão sendo cogitadas. O tratamento com dupilumab<sup>®</sup>, um anticorpo monoclonal para a cadeia  $\alpha$  do receptor para IL-4, em humanos, está em fase III de estudo (FAJT et al., 2015; FRICKER et al., 2017) e tem-se demonstrado

que sua administração promove o bloqueio da via de sinalização da IL-4 e assim melhora a função pulmonar e reduz a frequência de exacerbação da asma moderada a severa.

O lebrikizumab<sup>®</sup>, o anticorpo monoclonal anti-IL-13, apresenta alta afinidade de ligação para IL-13 humana (ULTSCH et al., 2013), e seu tratamento em humanos também está em fase III de estudo (FAJT et al., 2015). Os efeitos da IL-13 são mediados por sua ligação a um receptor heterodimérico consistindo de IL-13R $\alpha$ 1 e IL-4Ra. Os anticorpos criados contra IL-13 atuam bloqueando os seus efeitos anti-inflamatórios pela ligação a qualquer um dos dois receptores polipeptídeos com benefícios para o quadro clínico do paciente (ULTSCH et al., 2013). Porém um estudo em pacientes com asma grave, que apresentavam crises frequente não mostrou uma redução significativa na taxa de exacerbação da doença, nem melhora no controle da asma, embora a função pulmonar tenha melhorado significativamente na população total do estudo (BRIGHTLING et al., 2015).

Em suma a asma é uma doença complexa, onde mais de 50 citocinas foram identificadas e envolvidas na sua patogênese, incluindo citocinas derivadas de células T, citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas anti-inflamatórias (BARNES, 2008). Os resultados clínicos da inibição de citocinas específicas, usando anticorpos monoclonais no tratamento da asma foram decepcionantes, provavelmente por causa dos efeitos redundantes das citocinas associadas às doenças (BARNES, 2003).

Além disso, como mencionado anteriormente, a citocina IL-13 participa do processo de hipersecreção de muco pelas células caliciformes, evento marcante na asma. Assim, a diminuição da citocina IL-13 pelo tratamento com GT, corrobora com os resultados histológicos deste estudo, uma vez que se observou a diminuição do muco no tecido pulmonar. Diante do exposto é de extrema importância o resultado observado nesse trabalho onde o tratamento com GT, apresentou efeito na diminuição da produção das citocinas IL-4 e IL-13 pelas células envolvidas no processo inflamatório da asma.

Avaliamos também as citocinas relacionadas ao processo inflamatório agudo (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) considerando que no processo inflamatório crônico da asma pode haver envolvimento de outros perfis celulares além Th2 produtores destas citocinas. Recentemente Pina e colaboradores (2018)

demonstraram que os monoterpenos citronelol,  $\alpha$ -terpineol e carvacrol diminuíram tanto a migração celular, como a quantidade da citocina TNF- $\alpha$ , em modelo experimental de asma e que a sua redução estava relacionada ao efeito benéfico do tratamento com os monoterpenos, uma vez que promovia uma imunoregulação do perfil Th2.

Qi e colaboradores (2017) demonstraram que o aumento da secreção da IL-1 $\beta$  promove exacerbação da resposta imune do tipo Th2 na asma, pois esta citocina estaria atuando no início do desenvolvimento deste perfil celular na asma (WILLART et al., 2012; QI et al., 2017). Estudo anterior já havia observado que os pacientes com asma, geralmente apresentam produção excessiva de IL-1 $\beta$  (SOUSA et al., 1996). Além disso, um estudo demonstrou que a administração de IL-1 $\beta$  humana, na traqueia de camundongos, induz a inflamação das vias aéreas e a remodelação dos tecidos (KITAMURA et al., 2011). Estudo recente revelou que a citocina IL-1 ( $\alpha$  e  $\beta$ ), secretada em resposta a alérgenos inalados, pode levar as células dendríticas pulmonares a induzir uma resposta imune tipo Th2 (GUO et al., 2015b), sugerindo que as citocinas da família da IL-1 atuariam como um sinal inicial da cascata, que leva a ativação das células dendríticas e a conseqüentemente apresentação do antígeno e resposta imune do perfil Th2 (QI et al., 2017).

Outro aspecto dos efeitos da IL-1 $\beta$  está descrito no trabalho Iwata e colaboradores (2013), que demonstrou que fatores estressores elevam essa citocina e, portanto, promovem um *feedback* positivo no processo inflamatório da asma. Porém, o mecanismo direto dessa interação ainda não está esclarecido. Tem sido descrito que os neurônios sensoriais vagais são ativados durante a infecção viral ou bacteriana bem como a exposição alérgica nas vias aéreas (MAZZONE e UNDEM, 2016) sugerindo, portanto, o envolvimento de uma infecção e o desencadeamento da resposta alérgica no trato respiratório.

Neste estudo, observou-se que os animais do grupo OVA apresentaram um aumento significativo da citocina IL-1 $\beta$  em relação aos animais do grupo basal e que o tratamento com GT diminuiu a sua produção, indicando que o GT esteja interferindo ou na fase inicial do processo inflamatório da asma ou nas vias de sinalização responsáveis pela produção das citocinas.

Os linfócitos T e B como descritos acima são células primordiais nas respostas imunes da asma e a avaliação dessas populações celulares pode ser

feita utilizando diferenças de tamanho entre os linfócitos (células mononucleares) e as demais células inflamatórias pela técnica de citometria de fluxo. Essas análises vêm auxiliando na definição das populações celulares presentes no fluido do lavado broncoalveolar (BALF). Portanto, a análise das populações de linfócitos no citômetro, são identificadas por FSC<sup>lo</sup>/SSC<sup>lo</sup> e dos granulócitos por SSC<sup>hi</sup> (VAN RIJT et al., 2004) Estudo anterior realizado em nosso laboratório, demonstramos que no BALF dos animais do grupo OVA os linfócitos e granulócitos aparecem aumentados em técnica de citometria de fluxo (MOZZINI-MONTEIRO et al., 2016). Corroborando com este estudo, as células do BALF de animais do grupo OVA apresentaram um aumento tanto no número de linfócitos quanto de granulócitos, quando comparadas às animais do grupo basal. O tratamento com GT50 foi capaz de promover a diminuição dessas células de forma semelhante a dexametasona. Esses resultados corroboram com os resultados das contagens de células totais e diferenciais, anteriormente descritos neste trabalho, além de corroborar com a diminuição da migração celular nos protocolos de inflamação aguda (LPA) e crônica (RA) analisados.

A asma é uma doença inflamatória crônica do trato respiratório que envolve o recrutamento e a ativação de várias células inflamatórias, a secreção de múltiplos mediadores inflamatórios, incluindo mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, além de enzimas que geram produtos inflamatórios ou estão envolvidas na remodelação tecidual (BARNES, 2008). Muitas destas proteínas inflamatórias são reguladas por fatores de transcrição que estão intimamente ligados à receptores de superfície de células alvos nas vias aéreas, que culminam com a ativação celular e secreção de citocinas (BARNES, 2016). Entre as vias de sinalização e ativação celular temos: as MAPKs, AP-1, STAT, IRF3 entre outras. Dentre estas, as vias mais proeminentes nesse processo inflamatório são a do fator de transcrição NFκB, da p38 e da ERK1/2, as quais promovem a transcrição gênica de quimiocinas e citocinas importantes para a resposta inflamatória (SAKLATVALA, 2004; ZARUBIN; HAN, 2005; MAENG et al., 2006; SCHINDLER et al., 2007; LAWRENCE, 2009; MORRISON, 2012; HOESEL e SCHMID, 2013). No intuito de descobrir o mecanismos de ação do monoterpeneo GT, diversas vias de ativação foram analisadas por citometria de fluxo.

A quinase ERK1/2 controla a sobrevivência do mastócito pela fosforilação do BIM (proteína pró-apoptótica da família BH3) (MOLLER et al., 2005). Já o papel da ERK1/2 em células dendríticas é complexo, mas induz a produção de IL-10 (XIA et al., 2005; QIAN et al., 2006). Dillon e colaboradores (2004 e 2006) mostraram que ERK1/2, pela indução de c-Fos, inibe a produção de IL-12 em células dendríticas e que o aumento na IL-10 e diminuição na IL-12 favoreceria a diferenciação para o perfil Th2. Em nossos estudos demonstramos que as células do BALF dos animais doentes, não tratados apresentaram aumento significativo da expressão de ERK1/2 quando comparadas às dos animais do grupo basal e, o monoterpene não promoveu a sua diminuição de atividade, indicando que o GT não atua nessa via enzimática de ativação celular.

A quinase JNK (kinase c-jun N-terminal) faz parte da família das MAPKs e também participa de processos inflamatórios. Ci e colaboradores (2012), utilizando o protocolo de asma induzido por OVA, demonstraram não haver diferenças na ativação de JNK entre os grupos basal (não doente) e OVA (doente). Dado esse que corrobora com o resultado de nossa pesquisa, o qual não foi possível observar diminuição na atividade da JNK entre os grupos de animais em análise indicando a não participação do monoterpene na ativação dessa via.

A via das quinases JNK e p38 têm sido relacionadas às respostas celulares desencadeadas pelo estresse e, por isso, são também denominadas como SAPKs (*Stress-Activated Protein Kinases*) (WORTZEL e SEGER, 2011). Tem sido demonstrado que a inibição da atividade das MAPKs por via farmacológica ou abordagens genéticas bloqueia a inflamação alérgica (ALAM et al., 2011). Além disso, um estudo demonstrou que a via de ativação da p38 MAPK possui um papel relevante no processo de maturação das células dendríticas, estando envolvida com o aumento da expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, responsáveis pela ativação de linfócitos CD4<sup>+</sup> (LTh) (LANGOSCH et al., 2016).

Em nossos resultados não foram observados resultados significativos quando analisada a via JNK. Porém, na via p38, os do grupo OVA apresentaram um aumento da ativação desta via, o qual foi diminuído pelo

tratamento com GT50. Podemos assim inferir que doenças crônicas como a asma, induzem ao comportamento doentio animal, atuando como estressoras e ansiogênicas (dados discutidos anteriormente) o que leva a ativação de vias de sinalização como a p38. A diminuição da ativação desta via pelo GT50 corrobora com dados anteriores, uma vez que seu tratamento promove a redução dos marcadores da asma, o que resulta na atenuação dos fatores estressores relacionados a doença, além de apresentar efeito ansiolítico.

O fator de transcrição NFκB é um regulador imunológico de vias de sinalização celular, que fornece um mecanismo de resposta para as células frente a uma ampla variedade de estímulos que culminam em inflamação (SHIH et al., 2015). A fisiopatologia da asma alérgica ocorre principalmente como consequência superexpressão das citocinas do perfil Th2 e esses fatores inflamatórios são rigidamente regulados pelo sistema de rede transcricional. NFκB e STAT6, os quais são conhecidos por regular um conjunto de genes associados as respostas inflamatórias e imunes, e com isso desempenham um papel importante na indução de alergia asma (GREINER et al., 2013). Por tanto substâncias que inibem a via do NFκB, possuem efeitos benéficos para a asma.

Estudo demonstrou que o tratamento com o monoterpeno 1,8 cineol diminuiu a expressão de NFκB em modelos de inflamação crônica (GREINER et al., 2013), evento este descrito por curiosamente estar presente também em outros monoterpenos, conhecidos por inibir diretamente a sinalização via NFκB, dentre eles o limoneno e o α-pineno (SALMINEN et al., 2008).

Nossos resultados demonstram que as células do BALF dos animais doentes (grupo OVA) apresentaram um aumento significativo da expressão do fator de transcrição NFκB quando comparadas com as do grupo basal e que o tratamento com GT50 foi capaz de diminuir significativamente a expressão dessa via de transcrição. Esses resultados demonstram que o efeito anti-inflamatório do monoterpeno GT tem como mecanismo de ação a inibição das vias de sinalização dependentes de p38 e NFκB.

Portanto esse estudo demonstrou que o monoterpeno gama terpineno (GT) na dose de 50 mg/kg apresentou efeitos anti-inflamatórios em processos agudos e crônicos, efeito ansiolítico em processos crônicos, atuando também de forma a promover uma imunomodulação do processo inflamatório,

regulando a secreção de citocinas essenciais na patogênese de inflamações aguda e crônica.

Assim, em conformidade com a literatura atual sugerimos que medicações ideais para o tratamento da asma devem combinar propriedades anti-inflamatórias e ansiolíticas para uma melhor eficácia terapêutica. O monoterpeno em estudo apresentou tais propriedades, sendo portanto, um excelente candidato a futuros estudos pré-clínicos e clínicos, com o objetivo de desenvolver um medicamento que possa ser incluído no arsenal de substâncias para o tratamento de inflamações agudas, como a LPA e inflamações crônicas, como a rinite e a asma, além de apresentar propriedades ansiolíticas.

# *CONCLUSÃO*

## 6. CONCLUSÕES

Esse estudo demonstrou o efeito anti-inflamatório do óleo essencial Gama Terpineno (GT) em modelos experimentais de inflamações agudas e crônicas:

### Inflamação Aguda – LPA

- O tratamento dos animais com GT50 diminuiu os parâmetros inflamatórios agudos:

- Migração células inflamatórias
- Edema (pelo extravasamento de proteínas e peso do pulmão)
- Citocinas pró-inflamatórias no pulmão (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6)
- Expressão do TLR4 e vias de sinalização p38 e NF $\kappa$ B (Figura 22)

### Inflamação Crônica – Rinite e Asma

- O tratamento dos animais com GT50 diminuiu os parâmetros inflamatórios na rinite:

- Sinais clínicos associados a rinite tais como: espirro e fricção nasal
- Migração células inflamatórias para a cavidade nasal, observados no BALF
- Infiltrado celular, hipersecreção de muco e do número de mastócitos no tecido da cavidade nasal

- O tratamento dos animais com GT50 diminuiu os parâmetros na asma-ansiedade:

- O GT50 apresentou efeito ansiolítico, pois o tratamento promoveu aumento dos parâmetros analisados nos testes do labirinto em cruz elevado e da placa perfurada de forma semelhante a droga padrão diazepam
- Diminuição da expressão do c-fos em regiões cerebrais determinadas

- Nível sérico de IgE e reações alérgicas dependentes de IgE, diminuindo da inflamação no pulmão;

- Infiltrado pulmonar e hipersecreção de muco no tecido pulmonar

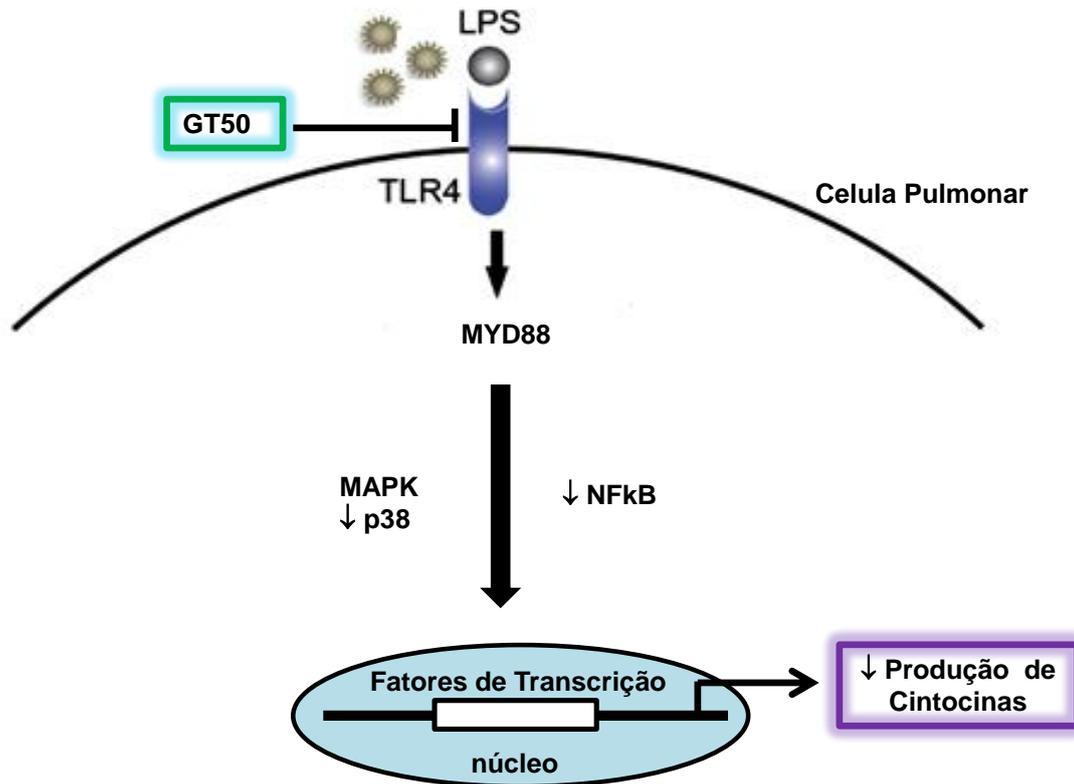
- Citocinas pró-inflamatórias como:  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{IL-6}$

- Citocinas do perfil Th2 como:  $\text{IL-4}$  e  $\text{IL-13}$ , ambas relacionadas com a troca de isotipo para IgE e secreção de muco no pulmão inflamado

- Em adição, o tratamento com o GT demonstrou aumento das citocinas imunoreguladoras  $\text{IFN}\gamma$  e  $\text{IL-10}$  no lavado broncoalveolar proveniente de camundongos BALB/c sensibilizados OVA, levando a uma supressão do perfil Th2 exacerbado na asma.

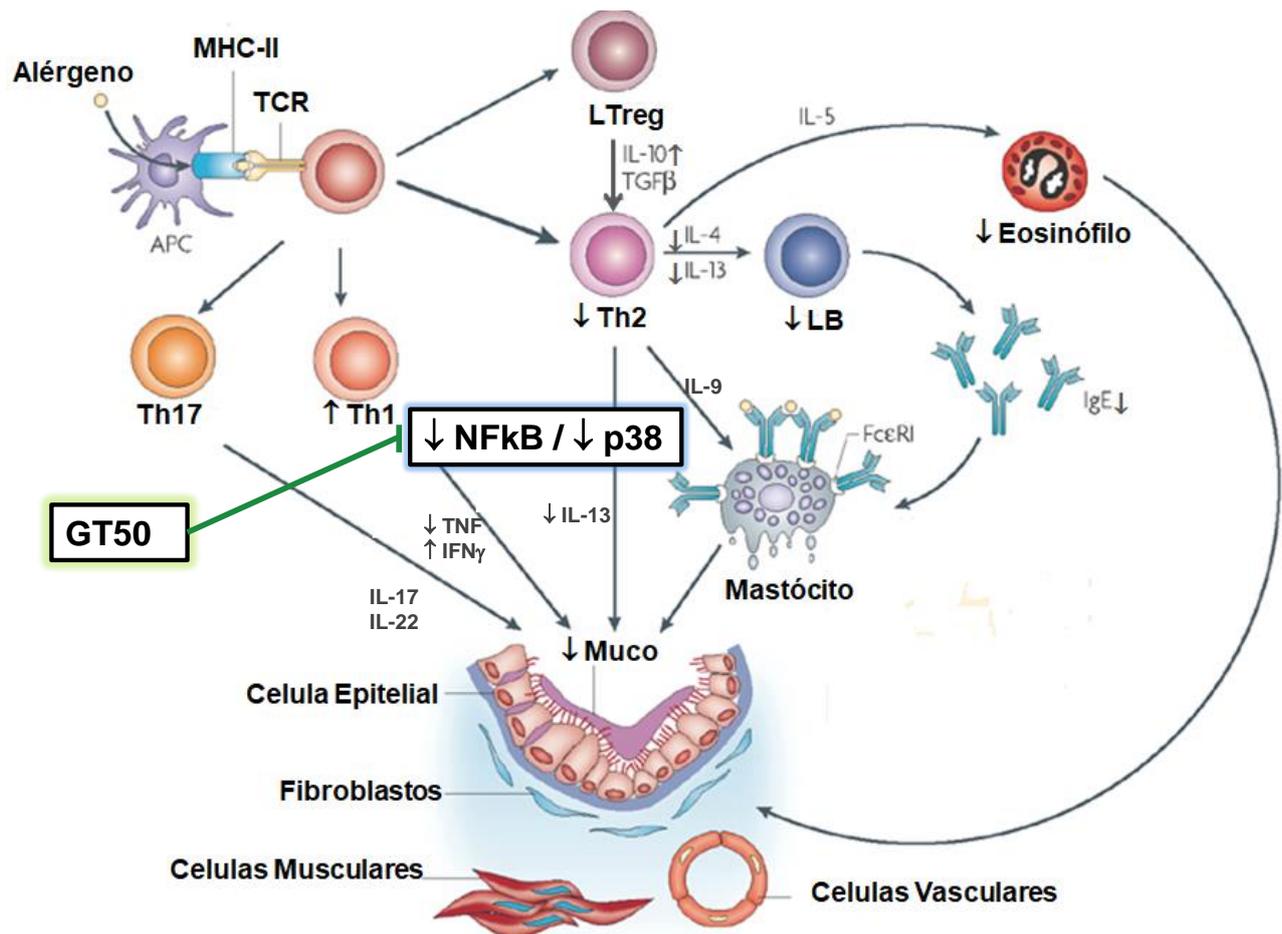
- O tratamento com GT em modelo de asma experimental, apresentou mecanismo de ação sobre as células ativadas via à diminuição das quinases  $\text{MAPKp38}$  e  $\text{NFkB}$ , responsáveis pela indução na produção de mediadores inflamatórios implicados nas inflamações do trato respiratório (Figura 23).

Figura 22. Atuação do GT50 na Lesão Pulmonar Aguda (LPA)



O tratamento com GT50 inibe a expressão do TLR4, diminuindo assim a ativação das vias de sinalização MAPKp38 e NFκB e consequentemente diminui a secreção de citocinas inflamatórias como IL-1β, TNF-α e IL-6. LPS-lipopolissacarídeo; TLR4- receptor *toll-like* 4; GT50- gama-terpineno na dose de 50 mg/kg.

Figura 23. Efeito do tratamento do GT50 na Asma e Rinite



O tratamento com GT50 diminui a ativação das vias de sinalização MAPKp38 e NFκB e consequentemente diminui a secreção de citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ; IL-6; IL-4 e IL-13. Em contrapartida aumentou a secreção da citocina do perfil regulatório IL-10 e do perfil Th1, IFN $\gamma$ . GT50 também foi capaz de diminuir a migração de células no lavado broncoalveolar, principalmente de eosinófilos, e de diminuir a produção de IgE. No tecido pulmonar, diminuiu a migração celular e a secreção de muco. GT50- gama-terpineno na dose de 50 mg/kg; LB- linfócito B; APC- célula apresentadora de antígeno; MHC-II- complexo principal de histocompatibilidade II; TCR- receptores de células T; LTreg- linfócito T regulatório; IgE- imunoglobulina tipo E; Th2- linfócito T *helper* 2; Th1- linfócito T *helper* 1; Th17- linfócito T *helper* 17.

# *REFERÊNCIAS*

## REFERÊNCIAS

- ABELSON, J.L.; WEG, J.G.; NESSE, R.M.; CURTIS, G.C. Persistent respiratory irregularity in patients with panic disorder. **Biology Psychiatry**, v. 49, p. 588–595, 2001.
- ADENIJI, K.; STEEL, A. C. The pathophysiology of perioperative lung injury. **Anesthesiology Clinic**, v. 30, n. 4, p. 573-90, 2012.
- AGACHE I, AKDIS C, JUTEL M, VIRCHOW JC. Untangling asthma phenotypes and endotypes. **Allergy**, v. 67; p. 835-846, 2012.
- ALAM, R.; GORSKA, M.M. Mitogen-activated protein kinase signalling and ERK1/2 bistability in asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 41; p. 149–159, 2011
- ALEVY, Y. G.; PATEL, A. C.; ROMERO, A. G.; PATEL, D. A. IL-13-induced airway mucus production is attenuated by MAPK13 inhibition. **Journal Clinical Investigation**, v.122, p. 4555-4568, 2012.
- ALI, B. et al. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 8, p. 601-611, 8// 2015.
- ALCORN, J.F.; CROWE, C.R.; KOLLS, J. K. TH17 Cells in Asthma and COPD. **Annual Review in Physiology**, v. 72, p. 495–516, 2010.
- ALLEN, D. B. Effects of inhaled steroids on growth, bone metabolism, and adrenal function. **Advances in Pediatrics**, v. 53, p.101-110, 2006.
- AL-MOHANNA, F.; PARHAR, R.; KAWAASI, A.; et al. Inhibition of neutrophil functions by human immunoglobulin E. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 92; p. 757–766, 1993.
- ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine**, v.8, p.310-322, 2001
- ALMEIDA, R.N.; MOTA, S.C.; FATURI, C.B.; CATALLANI, B.; LEITE, J.R. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.77, p.361-364, 2004.
- AL-RAMLI, W.; PRÉFONTAINE, D. F.; MARTIN, J. G.; OLIVENSTEIN, R.; LEMIÈRE, C.; HAMID, Q. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, p. 1185–1187, 2009.
- ALVES, G.J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmunomodulation: the cross-talk between nervous and immune systems. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, p. 363-369, 2007.
- ALVES M.F.; ALVES V.F. RAMALHO J.A.; DIAS G.E.N.; OLIVEIRA K.M.; LIRA A.B.; SANTOS S.G.; ALMEIDA R.N.; DINIZ M.F.F.M. Preclinical evaluation of repeated dose toxicity and anxiolytic activity of monoterpene R - (+) – limonene via inhalation. **African Journal Pharmacy Pharmacology**, v. 10, p. 598-603, 2016
- AMBROZ, M. et al. Essential Oil from Myrica rubra Leaves Potentiated Antiproliferative and Prooxidative Effect of Doxorubicin and its Accumulation in Intestinal Cancer Cells. **Planta Medica**, v. 82; n. 1-02; p. 89-96, 2016.
- ANGUS, D. C. The acute respiratory distress syndrome: what's in a name? **JAMA**, v. 307, n. 23, p. 2542-4, Jun 20 2012.
- AOISHI, K.; TAKAHASHI, H.; HATO, N.; GYO, K.; YOKOTA, M.; OZAKI, S.; SUZUKI, M. Treatment of allergic rhinitis with intranasal infusion of botulinum toxin type A in mice. **Life Sciences**, doi:10.1016/j.lfs.2015.08.003, 2015.

- AZOULAY, E. et al. Deterioration of previous acute lung injury during neutropenia recovery. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 4, p. 781-6, Apr 2002.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.
- BANTHORPE, D. V.; CHARLWOOD, B. V.; FRANCIS, M. J. O. Biosynthesis of monoterpenes. **Chemical Reviews**, v. 72; n. 2; p. 115-155, 1972.
- BAO, Z. et al. Humanized monoclonal antibody against the chemokine CXCL-8 (IL-8) effectively prevents acute lung injury. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 2, p. 259-63, Feb 2010.
- BARNES, P.J.; ADCOCK, I. M. How do corticosteroids work in asthma? **Annual International Medicine**, v. 139, p. 359-370, 2003.
- BARNES, P.J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 183-192, 2008.
- BARNES, P.J. Kinases as Novel Therapeutic Targets in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Pharmacology Review**, v. 68; p. 788–815, 2016.
- BASSO, A.S. et al. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal Neuroimmunology**, v. 140, p. 69–77, 2003.
- BELLINI, A. et al. Interleukin (IL)-4, IL-13, and IL-17A differentially affect the profibrotic and proinflammatory functions of fibrocytes from asthmatic patients. **Mucosal Immunology**, v. 5; p. 140–149, 2011.
- BENTLEY AM, JACOBSON MR, CUMBERWORTH V, BARKANS JR, MOQBEL R, SCHWARTZ LB, et al. Immunohistology of the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis: increases in activated eosinophils and epithelial mast cells. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 89; p. 877-883, 1992.
- BEZERRA-SANTOS, C. R.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BANDEIRA-MELO, C.; PIUVEZAM, M. R.; BOZZA, P. T. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1152-1160, 2006.
- BIALA, G.; KRUK, M. Calcium channel antagonists suppress cross-tolerance to the anxiogenic effects of D-amphetamine and nicotine in the mouse elevated plus maze test. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, p. 54–61, 2008.
- BHATIA, S.P.; MCGINTY, D.; LETIZIA, C.S; API, A.M. Fragrance material review on myrtenol. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.S237–S240, 2008.
- BHATIA, M.; ZEMANS, R. L.; JEYASEELAN, S. Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. **American Journal Respiratory Cell Molecular Biology**, v. 46, n. 5, p. 566-72, 2012.
- BISGAARD, H. E BONNELYKKE, K. Long-term studies of the natural history of asthma in childhood. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 126, p. 187–197, 2010.
- BOSWELL-SMITH, V.; CAZZOLA, M.; PAGE, C. P. Are phosphodiesterase- 4 inhibitors just more theophylline? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, p. 1237-1243, 2006.
- BOURGEOIS, E.A.; LEVESCOT, A.; DIEM, S.; CHAUVINEAU, A.; BERGÈS, H.; MILPIED, P.; LEHUEN, A.; DAMOTTE, D.; GOMBERT, J.M.; SCHNEIDER, E.; GIRARD, J.P.; GOURDY, P.; HERBELIN, A.. A natural protective function of invariant NKT cells in a mouse model of innate-cell-driven lung inflammation. **European Journal Immunology**, v. 41, p. 299–305, 2011.

BOUSQUET, J.; BOUSQUET, P.L.; GODARD P.; DAURES, J.P. The public health implications of asthma. **Bul World Health Organization**, v. 83, n. 7, p. 548-554, 2005.

BOUSQUET, J. et al. Eosinophilic inflammation in asthma. **National English Journal Medicine**, v. 323; p. 1033–1039, 1990.

BOUSQUET, J.; KHALTAEV, N.; CRUZ, AA.; DENBURG, J.; FOKKENS, W.J.; TOGIAS, A.; et al. Allergic Rhinitis and its impact on asthma (ARIA). **Allergy**, v. 63; n. 86; p. 86-88, 2008.

BOUSQUET, J.; SCHUNEMANN, HJ.; SAMOLINSKI, B.; DEMOLY, P.; BAENA-CAGNANI, CE.; BACHERT, C. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA): Achievements in 10 years and future needs. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 130; n. 5; p. 1049-1063, 2012.

BRADLEY, B.F.; STARKEY, N.J.; BROWN, S.L.; LEA, L.W. Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 517–525, 2007.

BRAGA, P. C. et al. Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. **Pharmacology**, v. 77, n. 3, p. 130-6, 2006a.

BRAGA, P. C. et al. Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. **Pharmacology**, v. 76, n. 2, p. 61-8, 2006b.

BRAMAN, S.S. The global burden of asthma. **Chest**, v. 130, p. 4s-12s, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas. Estatísticas de saúde e mortalidade. **Brasília: Ministério da Saúde**; 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Informações de saúde. 2012. [Citado em 8 de fevereiro de 2012. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Informações de saúde. [Citado em 23 de janeiro de 2015. Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/570-perguntas-e-respostas/35040-asma-atinge-6-4-milhoes-de-brasileiros>, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Informações de saúde, TABNET. [Citado em 13 de agosto de 2015 Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=02.acce>

BRIGHTLING, C.E.; CHANEZ, P.; LEIGH, R.; O'BYRNE, P.M.; KORN, S.; SHE, D.; MAY, R.D.; STREICHER, K.; RANADE, K.; PIPER, E. Efficacy and safety of tralokinumab in patients with severe uncontrolled asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. **Lancet Respiratory Medicine**, v. 3, p. 692–701, 2015.

BROIDE, D. H.; FINKELMAN, F.; BOCHNER, B. S.; ROTHENBERG, M. E. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2010. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 127, p. 689-695, 2011.

BROZEK JL, BOUSQUET J, BAENA-CAGNANI CE et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 26; p. 466–476, 2010.

BRUZZESE JM, STEPNEY C, FIORINO EK, et al. Asthma self-management is sub-optimal in urban Hispanic and African American/black early adolescents with uncontrolled persistent asthma. **Journal of Asthma**, v. 49; p. 90–97, 2012.

BUSSE, W.W. Expert Panel Report 3 (EPR-3): guidelines for the diagnosis and management of Asthma-Summary Report 2007. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, pg. 94-138, 2007.

BRUSSELLE, G.G. et al. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. **Clinical Experimental Allergy**, v. 24; p. 73–80, 1994.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CAMPANHA, S.M.A.; FREIRE, L.M.S.; FONTES, M.J.F. O impacto da asma, da rinite alérgica e da respiração oral na qualidade de vida de crianças e adolescentes. **Revista CEFAC**, v. 10, p. 513-519, 2008.

CARNEVALI, L.; SGOIFO, A.; TROMBINI, M.; LANDGRAF, R.; NEUMANN, I.D.; NALIVAICO E. Different Patterns of Respiration in Rat Lines Selectively Bred for High or Low Anxiety. **Plos One**, v. 8, p. 1-9, 2013.

CAVALCANTI DELA BIANCA AC, WANDALSEN G, PRESTES E, LAMENHA M, BESSA O, CHONG NETO H, et al. Treatment of wheezing in Brazilian infants in the first year of life. **Pediatrics Allergy Immunology**, v. 25; n. 2; p. 201–203, 2014.

CARVALHO, A. A. et al. Antitumor phenylpropanoids found in essential oils. **Biomedicine Respiration Int**, v. 2015, p. 1-21, 2015.

CEPKOVA, M.; MATTHAY, M. A. Pharmacotherapy of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. **Journal Intensive Care Medicine**, v. 21, n. 3, p. 119-43, May-Jun 2006.

CHAVAN, SS.; PAVLOV, V.A.; TRACEY, K.J. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. **Immunity**, v. 46, p. 927-942, 2017.

CHEN, G.; KORFHAGEN, T. R.; XU, Y.; KITZMILLER, J.; WERT, S. E.; GREGORIEFF, A.; CLEVERS, H. SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. **Journal Clinical Investigation**, v.119, p. 2914–2924, 2009.

CHEN, C.; DENG, Y.; CHEN, H.; et al. Decreased concentration of IL-35 in plasma of patients with asthma and COPD. **Asian Pac Journal Allergy Immunology**, v. 32; p. 211–217, 2014.

CHENG, D. et al. Epithelial interleukin-25 is a key mediator in Th2-high, corticosteroid-responsive asthma. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, v. 190; p. 639–648, 2014.

CHITTIPROL, S.; KUMAR, A.M.; SATISHCHANDRA, P.; TARANATH-SHETTY, K.; BHIMASENA-RAO, R.S.; SUBBAKRISHNA, D.K. Progressive dysregulation of autonomic and HPA axis functions in HIV-1 clade C infection in South India. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, p. 30-40, 2008.

CI, X.; CHU, X.; WEI, M.; YANG, X.; CAI, Q.; DENG, X. Different Effects of Ferrerol on an OVA-Induced Allergic Asthma and LPS-induced Acute Lung Injury. **Plos One**, v. 7; n. 4; p. e34634, 2012.

CIRILLO, I.; MARSEGLIA, G.; KLERSY, C.; et al. Allergic patients have more numerous and prolonged respiratory infections than nonallergic subjects. **Allergy**, v. 62; p. 1087–1090, 2007.

COSTA, C.; RUFINO, R.; TRAVES, S. L.; LAPA E SILVA, J. R.; BARNES, P. J.; DONNELLY, L. E. CXCR3 and CCR5 chemokines in induced sputum from patients with COPD. **Chest**, v. 133, p. 26-33, 2008.

- COSTA, H.F.; BEZERRA-SANTOS, C.R.; BARBOSA FILHO, J.M.; MARTINS, M.A.; PIUVEZAM, M.R. Warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, decreases immediate allergic and thermal hyperalgesic reactions in sensitized animals. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 519–525, 2008.
- COSTA-PINTO, F.A. et al. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. **Brain Behavior Immunity**, v. 19, p. 52–60, 2005.
- COSTA-PINTO, F.A. et al. Neural Correlates of IgE-Mediated Allergy. **Allergy and the CNS**, p. 117-131, doi: 10.1196/annals.1366.028, 2006.
- COUCHMAN, F. M.; PINDER, A.R.; BROMHAM, N.H. Studies on the essential oil of *Cyperus articulatus* L. **Tetrahedron**, v.20. p.2037-2045, 1964.
- CRUZ AA, POPOV T, PAWANKAR R, ANNESI-MAESANO I, FOKKENS W, KEMP J, et al. Common characteristics of upper and lower airways in rhinitis and asthma: ARIA update, in collaboration with GA(2)LEN. **Allergy**, v. 62, p. 1-41, 2007.
- CRUZ AA, FERNANDES ALG, PIZZICHINI E, FITERMAN J, PEREIRA LFF, PIZZICHINI MMM, et al. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 38; n. 1; p. S1–S46, 2012.
- D'ALESSIO, F. R. et al. CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. **Journal Clinical Investigation**, v. 119, n. 10, p. 2898-913, 2009.
- DA SILVA, G. L. et al. Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. **Anual Academia Brasileira Ciencia**, v. 87, n. 2; p. 1397-408, 2015.
- DAVIS, B.K., WEN, H., AND TING, J.P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. **Annual Review Immunology**, v. 29, p. 707–735, 2011.
- DE CASSIA DA SILVEIRA E SA, R.; ANDRADE, L. N.; DE SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1227-54, 2013.
- DE SOUSA, D.P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v.16, p.2233-2252, 2011.
- DE SOUSA, D.P.; GONÇALVES, J.C.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; CRUZ, J.S.; ARAÚJO, D.A.M.; ALMEIDA, R.N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v.401, p.231-235, 2006a.
- DE SOUSA, D.P.; SCHEFER, R.R.; BROCKSOM, U.; BROCKSOM, T.J. Synthesis and antidepressant evaluation of three para-benzoquinone mono-oximes and their oxy derivatives. **Molecules**, v.11, p.148-155, 2006b.
- DEGENHARDT, J.; KOLLNER, T. G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, n. 15-16, p. 1621-37, 2009.
- DEL, C. A.; MULLOL, J.; BARTRA, J.; DÁVILA, I.; JÁUREGUI, I.; MONTORO, J.; SASTRE, J.; VALERO, A. L. Comparative pharmacology of the H1 antihistamines. **Journal of Investigation in Allergology and Clinical Immunology**, v.16, p. 3-12, 2006.
- DILLON S, AGRAWAL A, VAN DYKE T et al. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. **Journal Immunology**, v. 172; p. 4733–43, 2004.
- DILLON S, AGRAWAL S, BANERJEE K et al. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 916–28, 2006.

DIXON, A.E. PRATLEY, R.E.; FORGIONE, P.M.; KAMINSKY, D.A.; WHITTAKER-LECLAIR, L.A.; GRIFFES, L.A.; GARUDATHRI, J.; RAYMOND, D.; POYNTER, M.E.; BUNN, J.Y.; IRVIN, C.G. Effects of obesity and bariatric surgery on airway hyperresponsiveness, asthma control, and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, p. 508–515, 2011.

DOHERTY, T.A. et al. Lung type 2 innate lymphoid cells express cysteinyl leukotriene receptor 1, which regulates TH2 cytokine production. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 132; p. 205–213, 2013.

EDWARDS, M.R.; BARTLETT, N.W.; HUSSELL, T.; OPENSHAW, P.; JOHNSTON, S.L. The microbiology of asthma. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 459-471, 2012.

EGE, M. J.; FREI, R.; BIELI, C.; SCHRAM-BIIKERK, D.; WASER, M.; BENS, M.R.; WEISS, G.; NYBERG, F.; VAN-HAGE, M. V.; PERSHAGEN, G.; BRUNEKREEF, B.; RIEDLER, J.; LAUENER, R.; BRAUN-FAHRLÄNDER, C.; VON-MUTIUS. Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, p. 1140–1147, 2007.

EVANS, C. M.; RACLAWSKA, D. S.; TTOFALI, F.; LIPTZIN, D. R.; FLETCHER, A. The polymeric mucin MUC5AC is required for allergic airway hyperreactivity. **Nature Communication**, v. 6, p. 6281-6287, 2015.

FAHY, J. Type 2 inflammation in asthma – present in most, absent in many. **Nature Reviews**, v. 15, p. 57-65, 2017.

FAJT, ML.; WENZEL, SE. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: The next steps toward personalized care. **Clinical reviews in allergy and immunology**, v. 135; n. 2; p. 299-310, 2015.

FELDMAN JM, STEINBERG D, KUTNER H, et al. Perception of pulmonary function and asthma control: the differential role of child versus caregiver anxiety and depression. **Journal Pediatric Psychology**, v. 38; p. 1091–1100, 2013.

FERNANDES, L.; FONSECA, J.; MARTINS, S.; DELGADO, L.; PEREIRA, A.C.; VAZ, M.; BRANCO, G. Association of Anxiety With Asthma: Subjective and Objective Outcome. **Measures Psychosomatics**, v. 51, p. 39-46, 2010.

FILE, S.E.; WARDILL, A.G.. The reliability of the hole-board apparatus. **Psychopharmacologia**, v. 44, p. 47–51, 1975.

FREIRE, R.C.; NARDI, A.E. Transtorno do pânico e sistema respiratório: subtipo clínico e testes de provocação. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34(Supl1), p. S32-S528, 2012.

FRICKER, M.; HEANEY, LG.; UPHAM, JW. Can biomarkers help us hit targets in difficult-to-treat asthma? **Respirology**, v. 22; p. 430–442, 2017.

FRYSZTAK, R.J.; NEAFSEY, E.J. The effect of medial frontal cortex lesions on respiration, “freezing,” and ultrasonic vocalizations during conditioned emotional responses in rats. **Cerebral Cortex**, v. 1, p. 418–425, 1991.

FURTADO, N.C.; DA SILVA, D.M.L.; VIANNA, G.M.M.; FERNANDES, A.B.S. Função pulmonar e análise postural de pacientes asmáticos atendidos na clínica-escola de fisioterapia do unifeso. **Revista Inspirar**, v. 4, p. 1-20, 2012.

GARCIA, G.; MAGNAN, A.; CHIRON, R.; CONTIN-BORDES, C.; BERGER, P.; TAILLE, C.; DEVOUASSOUX, G.; DE BLAY, F.; COUDERC, LJ.; DIDIER, A. A proof-of-concept, randomized, controlled trial of omalizumab in patients with severe, difficult-to-control, nonatopic asthma. **Chest**, v. 144; p. 411–419, 2013.

- GAVETT, S.H. et al. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and TH2 cytokine expression in mice. **Journal Exp. Medicine**, v. 182; p. 1527–1536, 1995.
- GAZZAR, M.E.; MEZAYEN, R.E.; MARECKI, J.C.; NICOLLS, M.R.; CANASTAR, A.; DRESKIN, S.C. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1135–1142, 2006.
- GERGEN, P.J. Understanding the economic burdem of asthma. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 107, p. 455-458, 2001.
- GIACCO, SRD.; CAPPAL, A.; GAMBULA, L.; CABRAS, S.; PERRA, S.; MANCONI, E.; CARPINIELLO, PB.; PINNA F. The asthma-anxiety connection. **Respiratory Medicine**, v. 120; p. 44-53, 2016.
- GINA- Global Initiative for Asthma. GINA workshop report: global strategy for asthma management and prevention. [Citado 23 de setembro de 2011]. Available from: [http://www.ginasthma.com/wr\\_clean.pdf](http://www.ginasthma.com/wr_clean.pdf).
- GINA- Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2008, [citado em 1 maio 2008]. Disponível em: <http://www.ginasthma.org/guidelines-gina-report-global-strategy-for-asthma.html>, v. 7, p. 93–132, 2008.
- GINA- Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention.[citado 1 dez 2009]. Disponível em: <http://www.ginasthma.org>. Acessado em 10.03.2012.
- GINA- Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention.[updated 2017]. Disponível em: <http://www.ginasthma.org>. Acessado em 20.12.2017.
- GIOVANNINI, D. et al. Lavandula angustifolia Mill. Essential Oil Exerts Antibacterial and Anti-Inflammatory Effect in Macrophage Mediated Immune Response to Staphylococcus aureus. **Immunology Investigation**, v. 45; n. 1; p. 11-28, 2016.
- GOMES, P.B.; FEITOSA, M.L.; SILVA, M.I.G.; NORONHA, E.C.; MOURA, B.A.; VENÂNCIO, E.T.; RIOS, E.R.V.; SOUSA, D.P.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; SOUSA, F.C.F. Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 96; p. 287–293, 2010.
- GOMÈZ, ET.; FERNANDEZ, DI; RONDON, CD.; et al. Inicial immunological changes as predictors for house dust mite for immunotherapy responses. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 45, p. 1542-1553, 2015.
- GOUR, N.; KARP, W. M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. **Cytokine**, v. 75, p. 68-78, 2015.
- GREINER, J.F.W.; MÜLLER, J.; ZEUNER, M.T.; HAUSER, S.; SEIDEL, T.; KLENKE, C.; GRUNWALD, L.M.; SCHOMANN, T.; WIDERA, D.; SUDHOFF, H.; KALTSCHMIDT, B.; KALTSCHMIDT, C. 1,8-Cineol inhibits nuclear translocation of NF-κB p65 and NF-κB-dependent transcriptional activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, p. 2866-2878, 2013.
- GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 3-4, p. 293-307, 2011.
- GUARRERA, P.M.; LEPORATTI, M.L. Ethnobotanical remarks on Central and Southern Italy. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.3, p.23-34, 2007.

GUIBAS, G. V.; LAKIS, S.; GKIMPAS, C.; MANDA, M.; KAPOUKRANIDOU, D.; SPANDOU, E. Efficiency of different decalcification protocols for nasal osseous structures in a rat experimental model of allergic rhinitis, and their effects on epithelial histology: An attempt at standardization. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 66, p. 469-475, 2014.

GUIMARAES, A. G.; QUINTANS, J. S.; QUINTANS, L. J., JR. Monoterpenes with analgesic activity--a systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 27; n. 1; p. 1-15, 2013.

GUO, Z.; LI, Q.; HAN, Y.; LIANG, Y.; XU, Z.; REN, T. Prevention of LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice by Progranulin. **Mediators of Inflammation**, v. 2012; ID 540794, 2012.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nature Medicine**, v. 21, n. 7, p. 677-87, 2015.

GUO, L.; HUANG, Y.; CHEN, X.; HU-LI, J.; URBAN, J.F.J.; PAUL, W.E. Innate immunological function of TH2 cells in vivo. **Nature Immunology**, v. 16; n. 10; p. 1051–1059, 2015b.

HALLSTRAND, T.S., MOODY, M.W., AITKEN, M.L. & HENDERSON, W.R.J. Airway immunopathology of asthma with exercise-induced bronchoconstriction. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.116, p. 586–593, 2005.

HALDAR, P.;PAVORD, I.D.; SHAW, D.E.; BERRY, M.A.; THOMAS, M.; BRIGHTLING, C.E.; WARDLAW, A.J.;GREEN, R.H. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medical**, v.178, p. 218–224, 2008.

HALIM, T.Y., KRAUSS, R.H., SUN, A.C. & TAKEI, F. Lung natural helper cells are a critical source of TH2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. **Immunity**, v. 36; p. 451–463, 2012.

HALLSTRAND, T.S.; WURFEL, M.M.; LAI, Y.; NI, Z.; GELB, M.H.; ALTEMEIER, W.A.; BEYER, R.P.; AITKEN, M.L.; HENDERSON -JR, W.R.Transglutaminase 2, a novel regulator of eicosanoid production in asthma revealed by genome-wide expression profiling of distinct asthma phenotypes. **Plos One**, v. 5, p. 1-9, 2010.

HANKIN, CS.; COX, L. Allergy immunotherapy: what is the evidence for cost saving? **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 14; n. 4; p. 363-370, 2014.

HASTIE, A.T.; MOORE, W.C.; MEYERS, D.A.; VESTAL, P.L.; LI, H.; PETERS, S.P.; BLEECKER, E.R. Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. 1028–1036, 2010.

HEGOBURU, C.; SHIONOYA, K.; GARCIA, S.; MESSAOUDI, B.; THEVENET, M. The RUB Cage: Respiration-Ultrasonic Vocalizations-Behavior Acquisition Setup for Assessing Emotional Memory in Rats. **Front Behavioral Neuroscie**, v. 5, p. 25, 2011.

HELLINGS PW, FOKKENS WJ, AKDIS C, BACHERT C, CINGI C, DIETZ DE LOOS D, et al. Uncontrolled allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: where do we stand today? **Allergy**; v. 68; p. 1-7, 2013.

HENS G, VANAUDENAERDE BM, BULLENS DM, PIESSENS M, DECRAMER M, DUPONT LJ et al. Sinonasal pathology in nonallergic asthma and COPD: 'united airway disease' beyond the scope of allergy. **Allergy**, v. 63; p. 261-267, 2008.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12; n. 1; p. 1-15, 2013.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 116-124, 2008.

HOLT, P.G.; ROSE, A.H.; BATTY, J.E.; TURNER, K.J. Induction of adjuvant-independent IgE responses in inbred mice: Primary, secondary and persistent IgE responses to ovalbumin and ovomucoid. **International Archive Allergy Applied Immunology**, v. 65, p. 42-50, 1981.

HOSHINO, A.; TANAKA, Y.; AKIBA, H. Critical role for OX40 ligand in the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma. **European Journal of Immunology**, v. 33, p. 861-869, 2003.

HOSOI, T., OKUMA, Y., MATSUDA, T., AND NOMURA, Y. Novel pathway for LPS-induced afferent vagus nerve activation: possible role of nodose ganglion. *Auton. Neuroscience*, v. 120, p. 104–107, 2005.

HOSSEINZADEH, H.; KHOSHDEL, M.; GHORBANI, M. Antinociceptive, antiinflammatory effects and acute toxicity of aqueous and ethanolic extracts of *Myrtus communis L.* aerial parts in mice. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v.4, n.4, p.242-247, 2011.

HU, Y.; TAO, L.; TAN, H.; ZHANG, M.; SHIMIZU, K.; ZHANG, F.; ZHANG, C. An active drimane-type lactone from *Polygonum jucundum* attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through TLR4-MAPKS Signaling Pathway. **Inflammation**, v. 40; n. 4, p. 1204-1224, 2017.

HUANG, M.T. et al. Regulatory T cells negatively regulate neovasculature of airway remodeling via DLL4-Notch signaling. **Journal Immunology**, v. 183; p. 4745–4754, 2009.

HUMBERT, M.; DURHAM, S.R.; YING, S.; KIMMITT, P.; BARKANS, J.; ASSOULI, B.; PFISTER, R.; MENZ, G.; ROBINSON, D.S.; KAY, A.B.; CORRIGAN, C.J. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against “intrinsic” asthma being a distinct immunopathologic entity. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medical**, v.154, p. 1497–1504, 1996.

HUMBERT, M.; MENZ, G.; YING, S.; CORRIGAN, C.J.; ROBINSON, D.S.; DURHAM, S.; KAY, A. B. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. **Immunology Today**, v. 20, p. 528-533, 1999.

HUNT SP; PINI A & EVAN G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. **Nature**, v. 328, p. 632-634, 1987.

IWATA, M.; OTA, K T.; DUMAN, RS. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses, **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 31; p. 105–114, 2013.

JATAKANON, A.; UASUF, C.; MAZIAK, W.; LIM, S.; KIAN, F.C.; PETER, J.B. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medical**, v. 160, p. 1532–1539, 1999.

JIN, J.; LIU, X.; SUN, Y. The prevalence of increased serum IgE and *Aspergillus* sensitization in patients with COPD and their association with symptoms and lung function. **Respiration Research**, v. 15; p. 130, 2014.

JUERGENS UR, ENGELEN T, RACKE K, et al. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. **Pulmonary Pharmacology Therapy**, v. 17, p. 281-287, 2004.

JUERGENS, U. R. Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1.8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. **Drug Research**, v. 64; n. 12; p. 638-646, 2014.

JUNGSUWADEE, P.; DEKAN G.; STINGL G.; EPSTEIN M. M. Inhaled dexamethasone differentially attenuates disease relapse and established allergic asthma in mice. **Clinical Immunology**, v. 110, p. 13-21, 2004.

KANG, Z. et al. Epithelial cell-specific Act1 adaptor mediates interleukin-25-dependent helminth expulsion through expansion of Lin-c-Kit+ innate cell population. **Immunity**, v. 36; p. 821–833, 2012.

KARPANEN, T. J. et al. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal Antimicrobiologic Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. 1031-6, Nov 2008.

KATO, T.; TAKEDA, Y.; NAKADA, T.; SENDO, F. Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis in vitro. **Nature Immunology**, v. 14, p. 198–208, 1995.

KATON, W.J; RICHARDSON, L.; LOZANO, P.; MCCAULEY, E. The relationship of asthma and anxiety disorders. **Psychosomatic Medicine**, v. 66; n. 3; p. 349 e 355, 2004.

KAWASHIMA, K., FUJII, T., MORIWAKI, Y., MISAWA, H., AND HORIGUCHI, K. Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on  $\alpha 7$  nAChRs. **International Immunopharmacology**, v. 29, p. 127–134, 2015.

KEARLEY, J., BARKER, J. E., ROBINSON, D. S. & LLOYD, C. M. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. **Journal of Experience Medical**, v. 202, p. 1539–1547, 2005.

KHOA, D.N.; CHRISTOPHER, V.; ALISON, F.; KARI, C.N. Selective deregulation in chemokine signaling pathways of CD4+CD25hiCD127lo regulatory T cells in human allergic asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, p. 933–939, 2009.

KHODABAKHSH, P.; SHAFAROODI, H.; ASGARPANA, J. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrus aurantium* L. blossoms essential oil (neroli): involvement of the nitric oxide/cyclic-guanosine monophosphate pathway. **Journal Nature Medicine**, v. 69; n. 3; p. 324-31, 2015.

KHOVIDHUNKIT W, KIM MS, MEMON RA, SHIGENAGA JK, MOSER AH, FEINGOLD KR, et al. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. **Journal Lipidic research**; v. 45, n.6, p.1169-96, 2004.

KIM JH, et al. CGRP, a neurotransmitter of enteric sensory neurons, contributes to the development of food allergy due to the augmentation of microtubule reorganization in mucosal mast cells. **Biomedical Research**, v. 35, p. 285–293, 2014.

KIM, K.Y.; SEO, H.J.; MIN, S.S.; PARK, M.; SEOL, G.H. The Effect of 1,8-Cineole Inhalation on Preoperative Anxiety: A Randomized Clinical Trial. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014; p. 1-7, 2014.

KITAMURA, H.; CAMBIER, S.; SOMANATH, S.; BARKER, T.; MINAGAWA, S.; MARKOVICS, J. Mouse and human lung fibroblasts regulate dendritic cell trafficking, airway inflammation, and fibrosis through integrin  $\alpha v \beta 8$ -mediated activation of TGF- $\beta$ . **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121;n. 7; p. 2863–2875, 2011.

KOATZ, AM.; COE, NA.; CICERA, A.; ALTER, AJ. Clinical and Immunological Benefits of OM-85 Bacterial Lysate in Patients with Allergic Rhinitis, Asthma, and COPD and Recurrent Respiratory Infections. **Lung**, V. 194; p. 687–697, 2016.

KOHLBOECK, G.; KOLETZKO, S.; BAUER, C.P.; VON BERG, A.; BERDEL, D.; KR€AMER, U.; SCHAAF, B.; LEHMANN, I.; HERBARTH, O.; HEINRICH, J. Association of atopic and non-atopic asthma with emotional symptoms in school children. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 24, p. 230–236, 2013.

KOMAKULA, S.; KHATRI, S.; MERMIS, J.; SAVILL, HAQUE, S.S.; ROJAS, M.; BROWN, L.A.; TEAGUE, G.W.; HOLGUIN, F. Body mass index is associated with reduced exhaled nitric oxide and higher exhaled 8-isoprostanes in asthmatics. **Respiratory Research**, v. 8, p. 32, 2007.

KOTAN, R.; KORDALI, S.; CAKIR, A.; KESDEK, M.; KAYA, Y.; KILIC, H. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.36, p.360-368, 2008.

KOTAS, M. E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. **Cell**, v. 160; n. 5; p. 816-827, 2015.

KROPSKI, J. A. et al. Clara cell protein (CC16), a marker of lung epithelial injury, is decreased in plasma and pulmonary edema fluid from patients with acute lung injury. **Chest**, v. 135, n. 6, p. 1440-7, Jun 2009.

KUDO, M. et al. IL-17A produced by  $\alpha\beta$  T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. **Nature Medicine**, v. 18; p. 547–554, 2012.

KUMAR R, CLERMONT G, VODOVOTZ Y, CHOW CC. The dynamics of acute inflammation. **Journal theo Biology**; v. 230, p.145-55, 2004

LAJOIE, S.; LEWKOWICH, I. P.; SUZUKI, Y, CLARK, J. R.; SPROLES, A. A.; DIENGER, K.; BUDELSKY, A. L.; WILLS-KARP, M. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. **Nature Immunology**, 2010.

LAMBRECHT BN AND HAMMAD H. The immunology of asthma. **Nature Immunology**, v. 16, p. 45-56, 2015.

LANGOSCH, S. et al. Immunobiology impact of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on immunostimulatory properties of human 6-sulfo LacNAc dendritic cells. **Immunobiology**, v. 1; n. 6; p. A0011651, 2016.

LARTIGUE, G., BARBIER DE LA SERRE, C., ESPERO, E., LEE, J., AND RAYBOULD, H.E. Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in vagal afferent neurons. **American Journal Physiology Endocrinology Metabolic**, v. 301, p. E187–E195, 2011.

LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1; n. 6; p. a001651, 2009.

LEDFORD D. Inadequate diagnosis of nonallergic rhinitis: assessing the damage. **Allergy Asthma Proc**, v. 24; p. 155–162, 2003.

LEE, I. S.; LEE, S.; PARK, Y. S.; SIK, G. C.; YOON, J. H.; KIM, B. S. Applicability of endoscopic submucosal dissection for undifferentiated early gastric cancer: Mixed histology of poorly differentiated adenocarcinoma and signet ring cell carcinoma is a worse predictive factor of nodal metastasis. **Surgical Oncology**, v. 26, p. 8-12, 2017.

LEPOITTEVIN, B.; WANG, X.; BALTAZE, J.P.; LIU, H.; HERRY, J.M.; BELLON-FONTAINE, M.N.; ROGER, P. Radical polymerization and preliminary microbiological investigation of new polymer derived from myrtenol. **European Polymer Journal**, v. 47, p.1842-1851, 2011.

LEWKOWICH, I. P.; HERMAN, N.S.; SCHLEIFER, K.W.; DANCE, M.P.; CHEN, B.L.; DIENGER, K.M.; SPROLES, A.A.; SHAH, J.S.; KÖHL, J.; BELKAID, Y.; WILLS-KARP, M. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, p. 1549–1561, 2005.

LI, B. et al. Pulmonary epithelial CCR3 promotes LPS-induced lung inflammation by mediating release of IL-8. **Journal Cell Physiology**, v. 226, n. 9, p. 2398-405, Sep 2011.

LIAO, W. et al. Opposing actions of IL-2 and IL-21 on Th9 differentiation correlate with their differential regulation of BCL6 expression. **Proc. National Academic Science**, v. 111; p. 3508–3513, 2014.

LIMA, N.G.P.B.; DE SOUSA, D.P.; PIMENTA, F.C.F.; ALVES, M.F.; DE SOUZA, F.S.; MACEDO, R.O.; CARDOSO, R.B.; DE MORAIS, L.C.S.L.; DINIZ, M.F.F.M.; ALMEIDA, R.N. Anxiolytic-like activity and GC–MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 103, p. 450–454, 2013.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180–5, 1987.

LLOYD, C.M.; GONZALO, J.; NGUYEN, T.; DELANEY, T.; TIAN, J.; OETTGEN, H.; COYLE, A.J.; GUTIERREZ-RAMOS, J.C. Resolution of bronchial hyperresponsiveness and pulmonary inflammation is associated with IL-13 and tissue leukocyte apoptosis. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 2033-2040, 2001.

LLOYD, C.M.; HAWRYLOWICZ, C. M. Regulatory T cells in asthma. **Immunity**, v. 31, p. 438–449, 2009.

LIMA, N.G.P.B.; DE SOUSA, D.P.; PIMENTA A, F.C.F.; ALVES, M.F.; DE SOUZA, F.S.; MACEDO, R.O.; CARDOSO, R.B.; MORAIS, L.C.S.L.; MELO DINIZ, M.F.F.; ALMEIDA, R.N. Anxiolytic-like activity and GC–MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 103, p. 450–454, 2013.

LIU Y, LU X, YU HJ et al. The expression of osteopontin and its association with Clara cell 10 kDa protein in allergic rhinitis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 40, p. 1632–1641, 2010.

LOCKE, G.R.; TALLEY, N.J.; FETT, S.L.; ZINSMEISTER, A.R.; MELTON, L.J. Risk factors associated with symptoms of gastroesophageal reflux. **American Journal of Medical**, v. 106, p. 642–649, 1999.

LOTUFO PA, BENSENOR IM. Temporal trends of asthma mortality rates in Brazil from 1980 to 2010. **Journal of Asthma**, v. 49; n. 8; p. 779–84, 2012.

LLOYD, C.M.; HESSEL, E.M. Functions of T cells in asthma: more than Just Th2 cells. **Nature**, v. 10, p. 838-848, 2010.

MACHADO, B.F.M.; FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v.3, p.105-127, 2011.

MAENG, Y.-S. et al. ERK is an anti-inflammatory signal that suppresses expression of NF-κB-dependent inflammatory genes by inhibiting IKK activity in endothelial cells. **Cellular Signalling**, v. 18; n. 7; p. 994-1005, 2006.

MAGGI, F.; BRAMUCCI, M.; CECCHINI, C.; COMAN, M.M.; CRESCI, A.; CRISTALLI, G.; LUPIDI, G.; PAPA, F.; QUASSINTI, L.; SAGRATINI, G.; VITTORI, S. Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations. **Fitoterapia**, v.80, p.313-319, 2009.

MANDHANE SN, SHAH JH, THENNATI R. Allergic rhinitis: An update on disease, present treatments and future prospects. **International Immunopharmacology**, v. 11; p. 1646–1662, 2011.

MANSO, L.; RECHE, M.; PADIAL, M. A.; VALBUENA, T.; PASCUAL, C. Diagnostic tools assessing airway remodelling in asthma. **Allergy Immunopathology**, v. 40, p. 108-116, 2012.

MARCO, F.; VERGA, M.; SANTUS, P.; GIOVANNELLI, F.; BUSATTO, P.; NERI, M.; GIRBINO, G.; BONINI, S.; CENTANNI, S. Close correlation between anxiety, depression, and asthma control. **Respiratory Medicine**, v. 104, p. 22-28, 2010.

MARINO, F., COSENTINO, M. Adrenergic modulation of immune cells: an update. **Amino Acids**, v. 45, p. 55–71, 2013.

MARTIN, P.E.; MATHESON, M.C.; GURRIN, L.; BURGESS, J.A.; OSBORNE, N.; LOWE, ; MORRISON, S.; MÉSZÁROS, D.; GILES, G.G.; ABRAMSON, M.J.; WALTERS, E.H.; ALLEN, K.J.; DHARMAGE, S.C.; Childhood eczema and rhinitis predict atopic but not nonatopic adult asthma: a prospective cohort study over 4 decades. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, p. 1473–1479, 2011.

MATTHAY, M. A.; ZEMANS, R. L. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. **Annual Review Pathology**, v. 6, p. 147-63, 2011.

MATTHAY, M. A.; WARE, L. B.; ZIMMERMAN, G. A. The acute respiratory distress syndrome. **Journal Clinical Investigation**, v. 122, n. 8, p. 2731-40, Aug 2012.

MATOS, A.P.S.; MACHADO, A.C.C. Influência das Variáveis Biopsicossociais na Qualidade de Vida em Asmáticos. **Psicologia Teórica e Pesquisa**, v. 23(2), p. 139-148, 2007.

MATUTE-BELLO, G.; FREVERT, C. W.; MARTIN, T. R. Animal models of acute lung injury. **American Journal Physiology Lung Cell Molecular Physiology**, v. 295, n. 3, p. L379-99, 2008.

MARCO, F.; VERGA, M.; SANTUS, P.; GIOVANNELLI, F.; BUSATTO, P.; NERI, M.; GIRBINO, G.; BONINI, S.; CENTANNI, S. Close correlation between anxiety, depression, and asthma control. **Respiratory Medicine**, v. 104; p. 22–28, 2010.

MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLT, S.; BEASLEY, R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA. **Dissemination Committee Report Allergy**, v. 59, p. 469-477, 2004.

MATZINGER, P. Tolerance, danger, and the extended family. **Annual review of immunology**, v. 12, p. 991-1045, 1994.

MAZZONE, SB.; UNDEM, BJ. Vagal Afferent Innervation of the Airways in Health and Disease. **Physiologic Review**, v. 96; p. 975–1024, 2016.

MCADAM, A. J.; CHANG<sup>2</sup>, T. T.; LUMELSKY, A. E. Mouse inducible costimulatory molecule (icos) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. **Journal of Immunology**, v.165, p. 5035-5040, 2000.

MCKINLEY, L.; ALCORN, J.F.; PETERSON, A.; DUPONT, R.B.; KAPADIA, S.; LOGAR, A.; HENRY, A.; IRVIN, C.G.; PIGANELLI, J.D.; RAY; A.; KOLLS, J.K. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. **Journal of Immunology**, v. 181, p. 4089–4097, 2008.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428–435, 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-6, Mar 19 2010.

MEI, S. H. et al. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 9, p. e269, 2007.

MELTZER EO, BLAISS MS, DEREBERY MJ et al. Burden of allergic rhinitis: results from the Pediatric Allergies in America survey. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 124; p. S43–S70, 2009.

MELTZER EO, BLAISS MS, NACLERIO RM, STOLOFF SW, DEREBERY MJ, NELSON HS et al. Burden of allergic rhinitis: allergies in America, Latin America, and Asia-Pacific adult surveys. **Allergy Asthma Proc**, v. 33; p. 113–141, 2012.

MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391-7, 2010a.

MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010b.

MOIRANGTHEM, D. S. et al. Essential oil of *Cephalotaxus griffithii* needle inhibits proliferation and migration of human cervical cancer cells: involvement of mitochondria-initiated and death receptor-mediated apoptosis pathways. **Nature Products Research**, v. 29; n. 12; p. 1161-1165, 2015.

MOLLER C, ALFREDSSON J, ENGSTROM M et al. Stem cell factor promotes mast cell survival via inactivation of FOXO3a-mediated transcriptional induction and MEK-regulated phosphorylation of the proapoptotic protein Bim. **Blood**, v. 106, p. 1330–6, 2005.

MOON, T. C., BEFUS, A. D. E KULKA, M. Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. **Frontiers in Immunology**, V.5, n. 69, p. 1-18, 2014.

MOORE, W.C.; MEYERS, D.A.; WENZEL, S.E.; TEAGUE, W.G.; LI, H.; LI, X.; D'AGOSTINO-JR. R.; CASTRO, M.; CURRAN-EVERETT, D.; FITZPATRICK, A.M.; GASTON, B.; JARJOUR, N.N.; SORKNESS, R.; CALHOUN, W.J.; CHUNG, K.F.; COMHAIR, S.A.A.; DWEIK, R.A.; ISRAEL, E.; PETERS, S.P.; BUSSE, W.W.; ERZURUM, S.C.; BLEECKER, E.R. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 181, p. 315–323, 2010.

MOREIRA, M. R. C. et al. Anxiolytic-like effects and mechanism of (-)-myrtenol: A monoterpene alcohol. **Neuroscience Letters**, v. 579; p. 119-124; 2014.

MORRISON, D. K. MAP Kinase Pathways. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4; n. 11, 2012.

MORO, K. et al. Innate production of TH2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit+Sca-1+ lymphoid cells. **Nature**, v. 463; p. 540–544, 2010.

MOSCATO G, VANDENPLAS O, GERTH VAN WIJK R, MALO JL, QUIRCE S, WALUSIAK J, et al. Occupational rhinitis. **Allergy**, v. 63; p :969-980, 2008.

MOWEN, K. A.; GLIMCHER, L. H. Signaling pathways in Th2 development. **Immunological Reviews**, v. 202, p. 203-22. 2004.

MOZZINI-MONTEIRO, T.; COSTA, HF.; VIEIRA, GC.; SALGADO, PRR.; SALVADORI, MGSS.; ALMEIDA, RN.; SOUZA, MFV.; MATIAS, WN.; BRAGA, VA.; NALIVAICO, E.; PIUVEZAM, MR. Anti-asthmatic and anxiolytic effects of *Herissantia tiubae*, a Brazilian medicinal plant. **Immunity, Inflammation and Disease**, doi: 10.1002/iid3107.; p. 1-16, 2016.

MUNOZ, N. M. et al. Secretory group V phospholipase A2 regulates acute lung injury and neutrophilic inflammation caused by LPS in mice. **American Journal Physiology Lung Cell Molecular Physiology**, v. 296, n. 6, p. L879-87, 2009.

MURARO, A.; LEMANSKE, RF.; HELLINGS, PWJ.; AKDIS, CA.; BIEBER, T. Precision medicine in patients with allergic diseases: Airway diseases and atopic dermatitis—PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. PRACTALL consensus report. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 137; p. 1347-1358, 2016.

- MUTIUS, E. V.; VERCELLI, D. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p.861-868, 2010.
- NALIVAICO, E.; SGOIFO, A.; TROMBINI, M.; RAINER, L.; NEUMANN, I.D.; CARNEVAL, L. Different Patterns of Respiration in Rat Lines Selectively Bred for High or Low Anxiety, **Plos One**, v. 8, p. 1-9, 2013.
- NG, CHEW LIP; WANG, D. Y. latest developments in allergic rhinitis in allergy for clinicians and researchers. **Allergy**, v. 70, n. 12, p. 1521-1530, 2015.
- NGAN, L.T.M.; MOON, J.K.; KIM, J.H.; SHIBAMOTO, T.; AHN, Y.J. Growth-inhibiting effects of *Paeonia lactiflora* root steam distillate constituents and structurally related compounds on human intestinal bacteria. **World journal of microbiology & biotechnology**, v.28, p.1575-1583, 2012.
- NILSSON, M.; JOHNSEN, R.; YE, W.; HVEEM, K.; LAGERGREN, J. Obesity and estrogen as risk factors for gastroesophageal reflux symptoms. **Journal of American Medical Association**, v. 290, p. 66–72, 2003.
- NÓBREGA, F.F. de F. **Monoterpeno 4-terpineol – uma molécula com atividade anticonvulsivante: estudos comportamentais e eletrofisiológicos**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.
- OKOH, O.O.; SADIMENKO, A.P.; AFOLAYAN, A.J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v.120, p.308-312, 2010.
- OLIVEIRA, J.T. Behavioral aspects of chronic pain syndromes. **Arquivo Neuropsiquiatria**, v. 58, p. 360-365, 2000.
- ONISHI, Y.; FEHERVARI, Z.; YAMAGUCHI, T.; SAKAGUCHI, S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 105, p. 10113–10118, 2008.
- ORAKA, E., M. E. KING, AND D. B. CALLAHAN. Asthma and serious psychological distress: prevalence and risk factors among US adults, 2001–2007. **Chest**, v. 137; p. 609–616, 2010.
- PACHECO DE OLIVEIRA, M.T.; DE OLIVEIRA RAMALHO, T.R.; PAIVA FERREIRA, L.K.; ARAÚJO LIMA, A.L.; BARBOSA CORDEIRO, M.; FERREIRA COSTA, H.; RODRIGUES, L.C.; PIUVEZAM, M.R. Synthesis, toxicity study and anti-inflammatory effect of MHTP, a new tetrahydroisoquinoline alkaloid. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.37, n. 4; p. 400-412, 2015.
- PAHO, Pan American Health Organization. **Doenças respiratórias crônicas**. Disponível em: [http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=581:doencas-respiratorias-cronicas&Itemid=539](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=581:doencas-respiratorias-cronicas&Itemid=539). Acesso em: 01 dez 2016.
- PAKHALE, S.; DOUCETTE, S; VANDEMHEEN, K.; BOULET, L.P.; MCIVOR, R.A.; FITZGERALD, J.M.; HERNANDEZ, P.; LEMIERE, C.; SHARMA, S.; FIELD, S.K.; ALVAREZ, G.G.; DALES, R.E.; AARON, S.D. A comparison of obese and nonobese people with asthma: exploring an asthma-obesity interaction. **Chest**, v. 137, p. 1316–1323, 2010.
- PALMQVIST, C.; WARDLAW, A.J.; BRADDING, P. Chemokines and their receptors as potential target for the treatment of asthma. **British Journal of Pharmacology**, v.151, p. 725-736, 2007.
- PALERMO-NETO, J.; ALVES, G.J. Neuroimunomodulação: influências do sistema imune sobre o sistema nervoso central. **Revista de Neurociências**, v. 18, p. 214-219, 2010.

PALLISTER, I.; DENT, C.; TOPLEY, N. Increased neutrophil migratory activity after major trauma: a factor in the etiology of acute respiratory distress syndrome? **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 8, p. 1717-21, Aug 2002.

PAPP, L.A.; MARTINEZ, J.M.; KLEIN, D.F.; COPLAN, J.D.; NORMAN, R.G. Respiratory psychophysiology of panic disorder: three respiratory challenges in 98 subjects. **American Journal Psychiatry**, v. 154, p. 1557–1565, 1997.

PARK, K. S.; KORFHAGEN, T. R.; BRUNO, M. D.; JOSEPH, A.; WERT, E.; HERSHEY.; KHURANA, G. K.; CHEN, G.; WHITSETT, J. A. SPDEF regulates goblet cell hyperplasia in the airway epithelium. **Jounal Clinical Investigation**, v.117, p. 978-988, 2007.

PARK, C.K., XU, Z.Z., BERTA, T., HAN, Q., CHEN, G., LIU, X.J., AND JI, R.R. Extracellular microRNAs activate nociceptor neurons to elicit pain via TLR7 and TRPA1. **Neuron**, v. 82, p. 47–54, 2014.

PASSOS, G. F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323-33, 2007.

PAUL, W.; ZHU, J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified. **Nature Reviews Immunology**, v.10, p.225-235, 2010.

PEJMAN, S.; TAYLOR, A. D. TH9 and allergic disease. **Immunology**, v. 127, p. 450–458, 2009.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:close arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscice Methods**, v. 14, p. 149–167, 1985.

PETERS-GOLDEN, M.; SWERN, A.; BIRD, S. S.; HUSTAD, C. M.; GRANT, E.; EDELMAN, J.M. Influence of body mass index on the response to asthma controller agents. **European Respiratory Journal**, v. 27, p. 495–503, 2006.

PINHO-RIBEIRO, F.A., VERRI, W.A., JR., AND CHIU, I.M. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends Immunology**, v. 38, p. 5–19, 2017.

POLOSA, R. Critical appraisal of antileukotriene use in asthma management. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v.13, p. 24-30, 2007.

PONIKAU, J. U.; SHERRIS, A. D.; KEPHART, M. G.; KERN, E. B.; GAFFEY, A. T.; TARARA, J. E.; KITA, H. Features of airway remodeling and eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis: Is the histopathology similar to asthma? **Journal Allergy Clinnical Immunology**, v.112, p. 887-882, 2003

PORTH, C. M. Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States. **Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins**, 1280, 2010.

PHUA, J. et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review. **Am Journal Respiratory Critical Care Medicine**, v. 179, n. 3, p. 220-7, 2009.

QIAN C, JIANG X, AN H et al. TLR agonists promote ERK-mediated preferential IL-10 production of regulatory dendritic cells (diffDCs), leading to NK-cell activation. **Blood**, v. 108, p. 2307–15, 2006.

QI, X.; GURUNG, P.; MALIREDDI, RKS.; KARMAUS, PWF.; SHARMA, D.; VOGEL, P.; CHI H.; GREEN, DR.; KANNEGANTI, TD. Critical role of caspase-8–mediated IL-1 signaling in promoting Th2 responses during asthma pathogenesis. **Mucosal Immunology**, v. 10; n. 1; p. 128–138, 2017.

RAGHAVENDRAN, K. et al. Pharmacotherapy of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. **Current Medicine Chemistry**, v. 15, n. 19, p. 1911-24, 2008.

RACKEMANN, F. A working classification of asthma. **American Journal of Medicine**, v. 3, p. 601–606, 1947.

RAMALHO, T. R. et al. Gamma-Terpinene Modulates Acute Inflammatory Response in Mice. **Planta Medica**, v. 81, n. 14, p. 1248-54, 2015.

RAMOS, R. G.; TALBOTT, E. O.; YOUK, A.; KAROL, M. H. Community urbanization and hospitalization of adults for asthma. **Journal of Environmental Health**, v. 68, p. 26-32, 2006.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J.T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v.57, p.405-424, 2012.

RIEDLER, J.; BRAUN-FAHRLÄNDER, C.; EDER, W.; SCHREUER, M.; WASER, M.; MAISCH S.; CARR, D.; SCHIERL, R.; NOWAK, D.; VON MUTIUS, E. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. **Lancet**, v. 358, p. 1129–1133, 2001.

RIELLA, K. R. et al. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 656-63, 2012.

RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc.), Acute toxicity study of myrtenol by oral administration to Sprague-Dawley rats. **Unpublished report from Dragoco Gerberding and Co. GbmH. RIFM**, Woodcliff Lake, NJ, USA. RIFM Report Number 37779, 2001.

ROBERTS G, XATZIPSALTI M, BORREGO LM, CUSTOVIC A, HALKEN S, HELLINGS PW et al. Paediatric rhinitis: position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. **Allergy**, v. 68; p. 1102–1116, 2013.

ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. 1978. **Agents and actions**, v. 43, n. 3-4, p. 86-90, Dec 1994.

ROCHAT MK, ILLI S, EGE MJ, LAU S, KEIL T, WAHN U, et al. Allergic rhinitis as a predictor for wheezing onset in school-aged children. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 126; p. 1170-1175, 2010.

RODRIGUEZ-PALMERO, M.; HARA, T.; THUMBS, A.; HUNIG, T. Triggering of T cell proliferation through CD28 induces Gata-3 and promotes T helper type 2 differentiation in vitro and in vivo. **European Journal of Immunology**, v. 29, p. 3914- 3924, 1999.

ROGERS, P. R.; SONG, J.; GRAMAGLIA, I.; KILLEEN, N.; CROFT, M. OX40 promotes bcl-xl and bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. **Immunity**, v.15, p. 445-455, 2001.

ROSSI, D. L. et al. Lungkine, a novel CXC chemokine, specifically expressed by lung bronchoepithelial cells. **Journal Immunology**, v. 162; n. 9; p. 5490-7, 1999.

RYANNA, K.; STRATIGOU, V.; SAFINIA, N.; HAWRYLOWICZ, C. Regulatory T cells in bronchial asthma. **Allergy**, v. 64, p. 335–347, 2009.

SAKLATVALA, J. The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease. **Current Opinion Pharmacology**, v. 4; n. 4; p. 372-7, 2004.

SALMINEN, A.; LEHTONEN, M.; SUURONEN, T.; KAARNIRANTA, K.; HUUSKONEN, J. Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. **Cellular Molecular Life Science**, v. 65, p. 2979-2999, 2008.

SARMENTO-NETO, J. F. et al. Analgesic Potential of Essential Oils. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 1-29, 2015.

SCHINDLER, J. F.; MONAHAN, J. B.; SMITH, W. G. p38 pathway kinases as anti-inflammatory drug targets. **Journal Dental Research**, v. 86; n. 9; p. 800-11, 2007.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annual review of biomedical engineering**, v. 8, p. 93-131, 2006.

SCHMITT, U.; HIEMKE, C. Combination of open field and elevated plus-maze: a suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behavior. **Program Neuropsychopharmacology Biological Psychiatry**, v. 22, p. 1197–215, 1998.

SCHWARTZ, G.E.; GOETZ, R.R.; KLEIN, D.F.; ENDICOTT, J.; GORMAN, J.M. Tidal volume of respiration and “sighing” as indicators of breathing irregularities in panic disorder patients. **Anxiety**, v. 2, p. 145–148, 1996.

SHAABAN R, ZUREIK M, SOUSSAN D, ANTO JM, HEINRICH J, JANSON C, et al. Allergic rhinitis and onset of bronchial hyperresponsiveness: a population-based study. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, v. 176; p. 659-66, 2007.

SHAABAN R, ZUREIK M, SOUSSAN D, NEUKIRCH C, HEINRICH J, SUNYER J, et al. Rhinitis and onset of asthma: a longitudinal population-based study. **Lancet**, v. 372; p. 1049-1057, 2008.

SHAH, D. et al. Extracellular ATP mediates the late phase of neutrophil recruitment to the lung in murine models of acute lung injury. **American Journal Physiology Lung Cell Molecular Physiology**, v. 306; n. 2; p. L152-61, 2014.

SHAKOORY, B.; FITZGERALD, S.M.; LEE, S.A.; CHI, D.S.; KRISHNASWAMY, G. The role of human mast cell-derived cytokines in eosinophil biology. **Journal Interferon Cytokine Research**, v. 24, p. 271-281, 2004.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best practice & research Clinical anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 85-405, 2004.

SHERWIN, C.M.; CHRISTIANSEN, I.J.; DUNCAN, H.W.E.. Guidelines for the ethical use of animals in applied ethology studies. **Applied Animal Behavioral Science**, v. 8, p. 291–305, 2003.

SHIH, R.H.; WANG, C.Y.; YANG, C.M. NF-kappa B Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, p. 1-8, 2015.

SHII D, NAKAGAWA S, YOSHIMI M, KATSUTA O, ODA T, NAKAMURA M. Inhibitory effects of cyclosporine a eye drops on symptoms in late phase and delayed-type reactions in allergic conjunctivitis models. **Biological Pharmacology Bull**, v. 33; p. 1314–1318, 2010.

SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; SAMPAIO, A.L.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M. O. Óleos essenciais – potencial anti-inflamatório. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, v.16, p.38-43, 2000.

SILVA, F. V. et al. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. **Journal Medical Food**, v. 15; n. 11; p. 984-991, 2012.

SILVA, R. O. et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol, a plant-derived monoterpene alcohol, in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29; n. 3; p. 184-192, 2014.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia – da planta**

**ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2004. cap.18, p.467-495.

SIMPSON, J.L.; SCOTT, R.J.; BOYLE, M.J.; GIBSON, P.G. Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 172, p. 559–565, 2005.

SIN, D.D.; JONES, R.L.; MAN, S.F. Obesity is a risk factor for dyspnea but not for airflow obstruction. **Archieve International Medical**, v. 162, p. 1477–1481, 2002.

SOLÉ, D.; ARANDA CA.; WANDALSEN, GF. Asthma: epidemiology of disease control in Latin America – short review. **Asthma Research and Practice**, v. 3; n. 4; p. 1-6, 2017.

SOROOSH, P.; DOHERTY, T. A. Th9 and Allergic Disease. **Immunology**, v.127, p. 450-458, 2009.

SOUSA, AR.; LANE, SJ.; NAKHOSTEEN, JA.; LEE, TH.; POSTON, RN. Expression of interleukin-1 beta (IL-1beta) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on asthmatic bronchial epithelium. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 154; n. 4; p. 1061–1066, 1996.

SOUSA, H.F.; CARDOSO, I.R.; PASSOS, L.S.; COSTA M.R.S.R. Prevalência de comorbidades e classificação de nível de controle em pacientes com asma grave. **Revista Pesquisa Saúde**, v. 12, p. 27-31, 2011.

SOUZA-MACHADO A, SANTOS PM, CRUZ AA. Adherence to treatment in severe asthma: predicting factors in a program for asthma control in Brazil. **World Allergy Organ Journal**, v. 3; n.3; p. 48–52, 2010.

SOWNDHARARAJAN, K. et al. Effect of inhalation of essential oil from *Inula helenium* L. root on electroencephalographic (EEG) activity of human. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 8; n. 4;p. 453-457, 2016.

SPRAGG, R. G. et al. Beyond mortality: future clinical research in acute lung injury. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, v. 181, n. 10, p. 1121-7, 2010.

STEELANT B, FARRE R, WAWRZYNIAK P, BELMANS J, DEKIMPE E, VANHEEL H, et al. Impaired barrier function in patients with house dust mite–induced allergic rhinitis is accompanied by decreased occludin and zonula occludens-1 expression. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 137; p. 1043-1053, 2016.

STEINBERG, B.E., SILVERMAN, H.A., ROBBIATI, S., GUNASEKARAN, M.K., TSAAVA, T., BATTINELLI, E., STIEGLER, A., BOUTON, C.E., CHAVAN, S.S., TRACEY, K.J., AND HUERTA, PT. Cytokine-specific neurograms in the sensory vagus nerve. **Bioelectronic Medicine**, v. 3, p. 7–17, 2016.

STRIBULOV, R.; BERND, L.A.G.; SOLÉ, D. IV Diretrizes brasileiras para o manejo da asma. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.32, p. S447-74, 2006.

STRIBULOV, R.; LOPES DA SILVA, N.; MAIA, SCOM.; CARVALHO-NETTO, E.; ANGELINI, L. Cost of severe asthma in Brazil—systematic review. **Journal of Asthma**, v. 53; n. 10, p. 1063–1070, 2016.

SUN, S., H. ZHANG, B. XUE, Y. WU, J. WANG, et al. Protective effect of glutathione against lipopolysaccharide-induced inflammation and mortality in rats. **Inflammation Research**, v. 55; p. 504–510, 2006.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 350, p. 21–29, 1998.

TALBOT S., et al. Silencing Nociceptor Neurons Reduces Allergic Airway Inflammation. **Neuron**, v. 87, p. 341–354, 2015.

THORLEY, A. J. et al. Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated primary human lung alveolar type II epithelial cells and macrophages. **Journal Immunology**, v. 178, n. 1, p. 463-73, Jan 1 2007.

TODO-BOM, A. E PINTO, A.M. Fisiopatologia da Asma Grave. **Revista Brasileira Alergia e Imunopatologia**, v. 29, p. 113-116, 2006.

TSUJI, M.; TAKEDA, H.; MATSUMIYA, T. Different effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists and benzodiazepine anxiolytics on the emotional state of naive and stressed mice: a study using the hole-board test. **Psychopharmacology**, v. 152, p. 157-66, 2000.

TSUSHIMA, K. et al. Acute lung injury review. **International Medicine**, v. 48, n. 9, p. 621-30, 2009.

ULTSCH, M.; BEVERS, J.; NAKAMURA, G.; VANDLEN, R.; KELLEY, R.F.; WU, L.C.; EIGENBROT, C. Structural basis of signaling blockade by anti-IL-13 antibody lebrikizumab. **Journal of Molecular Biology**, v. 425; p. 1330-1339, 2013.

VAICKUS, L.J.; BOUCHARD, J.; KIM, J.; NATARAJAN, S.; REMICK, D.G. Inbred and Outbred Mice Have Equivalent Variability in a Cockroach Allergen-Induced Model of Asthma. **Comparative Medicine**, v. 60, p. 420–426, 2010.

VAN GERVEN L, ALPIZAR YA, WOUTERS MM, HOX V, HAUBEN E, JORISSEN M, et al. Capsaicin treatment reduces nasal hyperreactivity and transient receptor potential cation channel subfamily V, receptor 1 (TRPV1) overexpression in patients with idiopathic rhinitis. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 133; p. 1332-1339 2014.

VAN RIJT LS, KUIPERS H, VOS N, HIJDRA D, HOOGSTEDEN HC, LAMBRECHT BN.. A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. **Journal of Immunological Methods**, v. 288, p. 111-121, 2004.

VESTWEBER, D. How the leucocytes cross the vascular endothelium. *Nature review immunology*, v. 15, p. 692-704, 2015.

VICTORY, F.N.; BRAHM, A.S.; SAVEGNAGO, L. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neuroscience Letters**, v.544, p.105-109, 2013.

VIEIRA, AA.; SANTORO, IL.; DRACOUKAKIS, S.; CAETANO, LB.; FERNANDES, ALG. Ansiedade e depressão em pacientes com asma: impacto no controle da asma. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 37; p. 13–18, 2011.

VIEIRA, G.C.; DE LIMA, J.F.; DE FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; MASCARENHAS, S.R.; BEZERRA-SANTOS, C.R.; PIUVEZAM, M.R. Inhaled Cissampelos sympodialis Down-Regulates Airway Allergic Reaction by Reducing Lung CD3+ TCell. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 916–925, 2013.

VITIELLO, L. et al. Immunoregulation through extracellular nucleotides. **Blood**, v. 120; n. 3; p. 511-8, 2012.

WADSWORTH, D. S.; DORSCHIED, D. R. Clinical update on the use of biomarkers of airway inflammation in the management of asthma. **Journal of Asthma and Allergy**, v. 4, p.101-112, 2011.

WAKASHIN, H.; HIROSE, K.; MAEZAWA, Y.; KAGAMI, S.; SUTO, A.; WATANABE, N.; SAITO, Y.; HATANO, M.; TOKUHISA, T.; IWAKURA, Y.; PUC CETTI, P.; IWAMOTO, I.; NAKAJIMA H.

IL-23 and TH17 cells enhance TH2 cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. **American Journal of Respiratory and Critic Care Medical**, v. 178, p. 1023–1032, 2008.

WALKER, J.A., BARLOW, J.L. & MCKENZIE, A.N. Innate lymphoid cells—how did we miss them? **Nature Review Immunology**, v. 13; p. 75–87, 2013.

WANG M, ZHANG W, SHANG J, YANG J, ZHANG L, BACHERT C. Immunomodulatory effects of IL-23 and IL-17 in a mouse model of allergic rhinitis. **Clinical Experimental Allergy**, v. 43; p. 956-966, 2013.

WANNMACHER, L. Tratamento medicamentoso da asma em crianças. **ISSN 1810-0791**, v. 3, nº 9, 2006.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. **N English Journal Medicine**, v. 342, n. 18, p. 1334-49, 2000.

WATANABE, N.; HANABUCHI, S.; MARLOIE-PROVOST, M. A.; ANTONENKO, S.; LIU, Y. J.; SOUMELIS, V. Human TSLP promotes CD40 ligand-induced IL-12 production by myeloid dendritic cells but maintains their Th2 priming potential. **Blood**, v. 105, p. 4749-4751, 2005.

WATERMAN, P. G. Biochemistry of the Mevalonic Acid Pathway to Terpenoids. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 19, n. 7, p. 611, 1991.

WENZEL, S. E. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. **Lancet**, v. 368, p. 804-813, 2006.

WENZEL, S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nature America**, v. 18, p. 716-725, 2012.

WENZEL SE. Emergence of Biomolecular Pathways to Define Novel Asthma Phenotypes. Type-2 Immunity and Beyond. **American Journal of Respiration Cell Mollecular Biology**, v. 55; n.1, p.1-4, 2016.

WHITEHEAD, G.S. et al. IL-35 production by inducible costimulator (ICOS)-positive regulatory T cells reverses established IL-17-dependent allergic airways disease. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.129; p. 207–215, 2012.

WILHELM, F.H.; GEVIRTZ, R.; ROTH, W.T. Respiratory dysregulation in anxiety, functional cardiac, and pain disorders. Assessment, phenomenology, and treatment. **Behavioral Modification**, v. 25, p. 513–545, 2001a.

WILHELM, F.H.; TRABERT, W.; ROTH, W.T. Physiologic instability in panic disorder and generalized anxiety disorder. **Biological Psychiatry**, v. 49, p. 596–605, 2001b.

WILLART MAM.; DESWARTE, K.; POULIOT, P.; BRAUN, H.; BEYAERT, R.; LAMBRECHT, BN.; et al. Interleukin-1 $\alpha$  controls allergic sensitization to inhaled house dust mite via the epithelial release of GM-CSF and IL-33. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209; n. 8; p. 1505–1517, 2012.

WILLS-KARP M, LUYIMBAZI J, XU X, SCHOFIELD B, NEBEN TY, KARP CL, DONALDSON DD. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. **Science**, v. 282; p.2258–2261, 1998.

WOLPE, S. D. et al. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. **Proc National Academic Science USA**, v. 86; n. 2; p. 612-6, 1989.

WOODRUFF, P.G. et al. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. **Proc. National Academy Science**, v. 104; p. 15858–15863, 2007.

WOODRUFF, P.G. et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. **American Journal Respiration Critical Care Medicine**, v. 180; p. 388–395, 2009.

WORTZEL, I.; SEGER, R. The ERK Cascade: distinct functions within various subcellular organelles. **Genes Cancer**, v. 2; n. 3; o. 195-209, 2011.

WU, W. et al. Unsupervised phenotyping of Severe Asthma Research Program participants using expanded lung data. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 133; p. 1280–1288, 2014.

WU W, BLEECKER E, MOORE W, BUSSE WW, CASTRO M, CHUNG KF, et al. Unsupervised phenotyping of Severe Asthma Research Program participants using expanded lung data. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v.133, p. 1280-1288, 2014.

WUYTS, A. et al. Identification of mouse granulocyte chemotactic protein-2 from fibroblasts and epithelial cells. Functional comparison with natural KC and macrophage inflammatory protein-2. **Journal Immunology**, v. 157; n. 4; p. 1736-43, 1996.

XIA, C.Q.; PENG, R.; BEATO, F.; CLARE-SALZLER, M.J. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. **Scand Journal Immunology**, v. 62, p. 45–54, 2005.

YANG, E.J.; LEE, J.S.; YUN, C.Y.; RYANG, Y.S.; KIM, J.B.; KIM, I.S. Suppression of Ovalbumin-induced Airway Inflammatory Responses in a Mouse Model of Asthma by Mimosa pudica Extract. **Phytotherapy Research**, v.25, p. 59–66, 2011.

YAO, W. et al. Interleukin-9 is required for allergic airway inflammation mediated by the cytokine TSLP. **Immunity**, v.38; p. 360–372, 2013.

YINGKUN N, ZHENYU W, JING L, et al. Stevioside protects LPS-induced acute lung injury in mice. **Inflammation**, v. 36, p. 242–250, 2013

YOMNA, I.M. Grape seed extract attenuates lung parenchyma pathology in ovalbumin-induced mouse asthma model: An ultrastructural study. **Micron**, v. 43, p. 1050-1059, 2012.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J. B. Plantas Mediciniais: sob a ótica da química medicinal moderna. **Chapecó: Argos**, p. 299-313, 2001.

XU, X. L. et al. Mannose prevents lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. **Inflammation Research**, v. 57, n. 3, p. 104-10, Mar 2008.

ZAWROTNIAK, M.; RAPALA-KOZIK, M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. **Acta Biochimical Pol**, v. 60; n. 3; p. 277-84, 2013.

ZHANG, H. et al. IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality. **Journal Clinical Investigation**, v. 123; n. 3; p. 1019-31, 2013.

ZHANG, H., NEUHÖFER, P.; SONG, L.; RABE, B.; LESINA, M.; KURKOWSKI, M.U.; TREIBER, M.; WARTMANN, T.; REGNÉR, S.; THORLACIUS, H.; SAUR, D.; WEIRICH, G.; YOSHIMURA, A.; HALANGK, W.; MIZGERD, J.P.; SCHMID, R.M.; ROSE-JOHN, S.; ALGÜL, H. IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, p. 1019–1031, 2013.

ZHANG, L.; ZHANG, X.; ZHENG, J.; WANG, L.; ZHANG, HP.; WANG, L.; WANG, G. Co-morbid psychological dysfunction is associated with a higher risk of asthma exacerbations: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Thoracic Disease**, v. 8; n. 6; p. 1257-1268, 2016.

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell Research**, v. 15; n. 1; p. 11-18, 2005.

ZHI, Q., SUN H., QIAN X., YANG L. Edaravone, a novel antidote against lung injury and pulmonary fibrosis induced by paraquat? **International Immunopharmacology**, v. 11; p. 96-102, 2011.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A.; SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 577-614, 2004.

## ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito do tratamento com o monoterpene sintético gama-terpineno em modelo experimental de asma", protocolo nº 035/2016 sob a responsabilidade do pesquisador Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2016 - 2017
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus</i> Balb/C e <i>Rattus norvegicus</i> Wistar
Número de animais	94 + 47= 141
Idade/peso	6-8 semanas – 25-35g e 120-150g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Thomas George

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra  
Vice-Coordenador CEUA-UFPB

**APÊNDICES****APÊNDICE A - Substâncias e sais**

Ácido acético glacial (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) – VETEC

Ácido clorídrico (HCl) –VETEC

Ácido fosfotungstíco (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) – VETEC

Ácido periódico (HIO<sub>4</sub>) – VETEC

Álcool metílico (CH<sub>3</sub>OH) – VETEC

Aldeído fórmico (CH<sub>2</sub>O) – MERCK

Alúmen de potássio (KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) – MERCK

Aminofilina - MERK

Bissulfito de sódio (NaHSO<sub>3</sub>) – MERCK

Carvão ativado – VETEC

Cloral hidratado – VETEC

Cloreto de potássio (KCl) – MERCK

Cloreto de sódio (NaCl) – SIGMA

Cloridrato de ketamina – VETBRANDS

Clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) – LTF

Corante azul de evans – VETEC

Corante cromotrope 2R – VETEC

Corante eosina azul de metileno segundo Giemsa – VETEC

Corante eosina azul de metileno segundo May-Grünwald – VETEC

Corante eosina Y – VETEC

Corante floxina-β – VETEC

Corante fucsina básica – VETEC

Corante hematoxilina – VETEC

Corante Panótico – NEWPROV

Corante test-green F.C.F. – VETEC

Corante violeta de genciana – VETEC

Dexametasona – MESE

D-glucose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) – SIGMA

Diazepam - MERK

Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) – LTF

Fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) – REAGEN  
Fosfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) – MERCK  
Formaldeído – MERCK  
Glicerina ( $\text{C}_3\text{H}_3(\text{OH})_3$ ) – VETEC  
Hidróxido de alumínio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) – VETEC  
Hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) – REAGEN  
Metabissulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) – MERCK  
OVA grade II – SIGMA  
OVA grade V – SIGMA  
Óxido de mercúrio amarelo ( $\text{Hg}_2\text{O}$ ) – LAFAN  
Parafina para Histologia – COAL  
Timol ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$ ) – VETEC  
Xilol ( $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)_2$ ) – VETEC

**APÊNDICE B - Aparelhos e equipamentos**

Aagitador Vortex – VWR – ScientificProducts

Autoinclusor – Leica EG 120

Balança analítica – Sartorius

Banho histológico – ANCAP

Centrífuga refrigerada - Centra MP4R – InternationalEquipmentCompany  
(IEC)

Citômetro – FACS Callibur

Estufa – ICAMO – modelo 3

Histotécnico processador automático de tecidos – OMA – DM – 40

Microscópio óptico – Nikon

Micrótomo – Leica RM 2125 – RT

Nebulizador – Pulmosonic Star – Soniclear

Platina aquecedora – Olidef CZ

Citômetro de Fluxo