



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



FRANCISCO ALLYSSON ASSIS FERREIRA GADELHA

**Implementação do modelo experimental de rinite alérgica crônica no
Laboratório de Imunofarmacologia do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB**

João Pessoa – Paraíba

2017

FRANCISCO ALLYSSON ASSIS FERREIRA GADELHA

**Implementação do modelo experimental de rinite alérgica crônica no
Laboratório de Imunofarmacologia do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Prof.^ª. Dr.^ª. Márcia Regina Piuvezam

ORIENTADORA

João Pessoa – Paraíba

2017

G124i Gadelha, Francisco Allysson Assis Ferreira.

Implementação do modelo experimental de rinite alérgica crônica no Laboratório de Imunofarmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB / Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha. - - João Pessoa, 2017.

64f.: il. -

Orientadora: Márcia Regina Piuvezam.
Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Rinite alérgica. 2. Modelo experimental. 3. Imunofarmacologia.

BS/CCS/UFPB

CDU: 616.211-002(043.2)

FRANCISCO ALLYSSON ASSIS FERREIRA GADELHA

**Implementação do modelo experimental de Rinite Alérgica Crônica no
Laboratório de Imunofarmacologia do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em: 25 de 05 de 2017

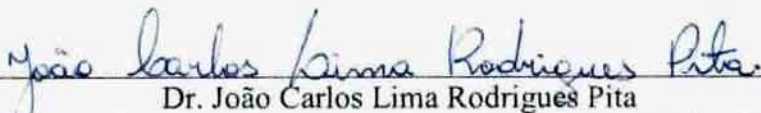
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Márcia Regina Piuevam (Orientadora)
(Departamento de Fisiologia e Patologia – UFPB)



Prof.^a. Dr.^a. Isabel Beserra Santos Gomes
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFPB)



Dr. João Carlos Lima Rodrigues Pita
(Unidade de Laboratório de Análises Clínicas – HULW – UFPB)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”
(Santa Teresa de Calcutá)

**Dedico este trabalho a Deus e a minha família,
porque por eles e para eles vivo.**

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida, pela oportunidade de conhecer Seus ensinamentos que a cada dia tenho a graça de receber.

Aos meus pais, **Dorgival Assis Gadelha** e **Maria Célia Ferreira Gadelha**, por todo o amor a mim entregue, pelo exemplo insuperável de PAI e de MÃE, pela educação, pelo conhecimento da vida, pelo estímulo contínuo aos estudos e a permanecer no caminho correto, de Deus. A minha avó-mãe **Rosa Assis Gadelha**, matriarca da minha família fonte de inigualável sabedoria, educação, respeito e fé. Aos meus irmãos **Francisco Werlisson** e **Jéssika** por todos os momentos que pudemos engrandecer um ao outro através de conversas, discursões ou das mais diversas formas.

A minha amada sobrinha, **Maria Júlia Gadelha Elias**, a quem nunca imaginara sentir um amor tão grande e valoroso, pela sua inocência de criança que traz a verdadeira alegria e o verdadeiro amor a qualquer coração.

Aos meus padrinhos, **Paula Bernadete Assis Gadelha Cavalcante** e **Humberto Ataíde Cavalcante**, que foram verdadeiramente meus padrinhos acolhendo-me como filho em sua casa, fornecendo tudo o que podiam e mais um pouco, seja material ou espiritual. Conselhos, ensinamentos, amor e carinho não faltaram em nenhum dia até hoje, sem vocês não teria conseguido esta vitória. Aos meus primos, **Paloma**, **José Thiago** e **José Dhiego** por me receberem da maneira particular de cada um, como um irmão.

Aos amigos da graduação, por proporcionarem uma vida acadêmica mais leve e feliz ao compartilharmos todos os desafios, batalhas e também as vitórias. Meus amados Friends, **Danielly**, **Deivid**, **Giuliana**, **Lisandra** e especialmente **Raquel**, hoje metade de mim não seria quem eu sou se não fosse por vocês. A **Raquel Fragoso**, minha irmã científica e acadêmica. Por todos os momentos compartilhados na busca do crescimento profissional e pessoal, te adoro Fido!

Aos Professores da graduação, por nos conduzirem de forma tão bela ao melhor profissional possível. Vocês são os exemplos que nos fazem seguir em frente, que nos fazem buscar ser o melhor sempre. **Adalberto Coelho**, **Robson Veras**, **José Maria Barbosa**, **Islânia Albuquerque**, **Giciane Carvalho Vieira**, por que em toda vossa humildade e sabedoria fizeram transcender o conhecimento da maneira mais bela e suave.

Em especial, a minha brilhante e sábia educadora **Marcia Regina Piuvezam**, fonte de gentileza e simpatia, ensinou-me a ser cada dia melhor como profissional e como pessoa.

Cada palavra dita pela senhora é uma riqueza de ensinamentos, agradeço a Deus todos os dias por tê-la colocado em minha vida.

A todos os componentes do Laboratório de Imunofarmacologia, sem vocês a vida na ciência não seria a mesma, vocês são uma segunda família. Em especial a **Profa. Giciane, Fagner, Raquel, Laércia, Larissa Adilis, Talissa, Larissa Rodrigues, Bianka, Grasiela, Thamires, Ícaro** e tantos que passam na nossa vida e nos ensinam a sermos melhores e entendermos que acompanhados podemos chegar sempre mais longe.

A professora **Giciane Carvalho Vieira**, por todos os ensinamentos de histologia, imunologia, ciência e vida. Por me acolher também como um filho científico, por incentivar sempre a ser um bom profissional, pela paciência e serenidade, alegria e diversão na bancada, no escritório e na vida.

Aos professores de imunologia **Cláudio Bezerra** e **Sandra Mascarenhas** por todos os ensinamentos compartilhados no Laboratório.

Aos funcionários da Universidade Federal da Paraíba, que estiveram presentes durante toda a minha graduação, participando direta ou indiretamente para realização desse sonho. Aos técnicos de laboratório, **Renata, Severina, Edjane**, entre outros, aos funcionários do Biotério Dr. Thomas George, **Crispim, Sr. Luiz**, por tornar possível a execução de nossos projetos. Aos funcionários do IPeFarM, em especial a **Mônica** por engrandecer a rotina com o seu BOM DIA cheio de benção e alegria.

A **Universidade Federal da Paraíba** pela estrutura física, recursos humanos e o estímulo à formação acadêmica, das mais diversas formas.

RESUMO

Rinite alérgica é uma inflamação da mucosa na cavidade nasal que patologicamente promove o desenvolvimento de sintomas como espirros, prurido, congestão nasal, rinorreia e/ou perda associada de cheiro e gosto desenvolvidos levando a perda da qualidade de vida do indivíduo. A rinite alérgica acomete cerca de 20% da população mundial e estudos vem sendo desenvolvidos também pela sua correlação com outras doenças alérgicas como a asma. A relevância mundial da doença e o alerta aos grupos de pesquisa científica expõe a necessidade de protocolos experimentais para os estudos pré-clínicos. O objetivo deste trabalho foi implementar um protocolo experimental de rinite alérgica crônica eficaz nos estudos de potenciais fármacos com atividades antialérgica no Laboratório de Imunofarmacologia. Para tal, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas para o desenvolvimento do modelo: nos dias 0 e 7 camundongos foram sensibilizados com 100µL/10g (i.p.) de uma suspensão contendo 50 µg/mL de OVA e 10 mg/mL de Al(OH)₃ em solução salina. Nos dias 14, 15, 16, 21, 22, 23, 28, 29 e 30 doses de 0,50µg de OVA em 20µl de solução salina foram administradas por via intranasal (i.n.). Foi dado um intervalo de 15 dias e nos dias 49, 50, 51, 52, 53, 54 e 55 do protocolo foi realizado o tratamento dos animais com a droga padrão dexametasona. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos (n=5): controle negativo (basal), controle positivo (ovalbumina) e dexametasona 2 mg/kg (i.n.) 1 hora antes dos desafios. Os resultados obtidos foram expressos em média ± EPM e tratados no software GraphPad Prisma versão 5.0. A análise estatística foi realizada pelo ANOVA one-way seguido de pós teste de Tukey. Os resultados demonstraram que os animais sensibilizados e desafiados com a ovalbumina desenvolveram o quadro de rinite alérgica crônica evidenciado pela intensa migração de células inflamatórias para a cavidade nasal, produção de IgE-OVA específica e alterações teciduais inflamatórias-alérgicas como aumento de mastócitos e de muco. A dexametasona apresentou efeito imunomodulador revertendo o processo alérgico como evidenciado nos parâmetros avaliados. Concluímos que o modelo experimental de rinite alérgica crônica foi implementado no supracitado laboratório estando este apto a realizar análises pré-clínicas de produtos naturais e sintéticos.

Palavra chave: rinite alérgica, modelo experimental, imunofarmacologia

ABSTRACT

Allergic rhinitis is an inflammation of the mucosa in the nasal cavity that pathologically promotes the development of symptoms such as sneezing, pruritus, nasal congestion, rhinorrhea and / or associated loss of smell and taste developed leading to loss of quality of life of the individual. Allergic rhinitis affects about 20% of the world population and studies have also been developed for its correlation with other allergic diseases such as asthma. The worldwide relevance of the disease and the alert to scientific research groups exposes the need for experimental protocols for preclinical studies. The objective of this work was to implement an experimental protocol of chronic allergic rhinitis in the studies of potential drugs with antiallergic activities in the Laboratory of Immunopharmacology. For this, female BALB / c mice were used for the development of the model: on days 0 and 7 mice were sensitized with 100 μ L / 10g (ip) of a suspension containing 50 μ g / mL OVA and 10 mg / mL Al (OH) 3 in saline solution. On days 14, 15, 16, 21, 22, 23, 28, 29 and 30 doses of 0.50 μ g of OVA in 20 μ l of saline were administered intranasally (i.n.). An interval of 15 days was given and on days 49, 50, 51, 52, 53, 54 and 55 of the protocol the animals were treated with the standard drug dexamethasone. The animals were divided into the following groups (n = 5): negative control (basal), positive control (ovalbumin) and dexamethasone 2 mg / kg (i.n.) 1 hour before challenge. The results were expressed as mean \pm SEM and treated in GraphPad Prisma software version 5.0. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. The results showed that animals sensitized and challenged with ovalbumin developed chronic allergic rhinitis as evidenced by the intense migration of inflammatory cells into the nasal cavity, specific IgE-OVA production and inflammatory-allergic tissue changes such as mast cells and mucus enlargement . Dexamethasone presented an immunomodulatory effect reversing the allergic process as evidenced in the evaluated parameters. We conclude that the experimental model of chronic allergic rhinitis was implemented in the aforementioned laboratory, being able to perform preclinical analyzes of natural and synthetic products.

Key words: allergic rhinitis, experimental model, immunopharmacology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Anatomia da cavidade nasal humana.

Figura 2. Protocolo de rinite alérgica crônica.

Figura 3. Fotomicrografias representante da cavidade nasal dos animais com rinite alérgica crônica, coradas com HE observadas no aumento de 400x.

Figura 4. Fotomicrografias representante da cavidade nasal dos animais com rinite alérgica crônica, corada com PAS e visualizadas no aumento de 400x.

Figura 5. Fotomicrografias representante da cavidade nasal dos animais com rinite alérgica crônica, coradas com AT e visualizadas no aumento de 100x.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamento dos animais de cada grupo.

Tabela 2. Solução Salina

Tabela 3. Solução Salina Tamponada

Tabela 4. Solução de Turk

Tabela 5. Tampão Fosfato pH 7,2 utilizado no EDTA

Tabela 6. HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) pH 7,4

Tabela 7. Corante Azul de Toluidina

Tabela 8. Reativo de Schiff para coloração de PAS

Tabela 9. Ácido periódico 1% para coloração de PAS

Tabela 10. Eosina amarelada para coloração de H&E

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito da sensibilização por ovalbumina (OVA) e tratamento com dexametasona na migração de células para a cavidade nasal dos camundongos BALB/c.

Gráfico 2. Efeito da sensibilização por ovalbumina (OVA) e tratamento com dexametasona na migração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos para a cavidade nasal dos camundongos BALB/c.

Gráfico 3. Efeito da sensibilização por ovalbumina (OVA) e tratamento com dexametasona na migração de eosinófilos para a cavidade nasal dos camundongos BALB/c.

Gráfico 4. Efeito da sensibilização por ovalbumina (OVA) e tratamento com dexametasona na produção de IgE-ova específica sérica nos camundongos BALB/c.

Gráfico 5. Efeito da sensibilização por ovalbumina (OVA) e tratamento com dexametasona na produção de citocinas nos camundongos BALB/c.

Gráfico 6. Efeito da sensibilização por ovalbumina (OVA) e do tratamento com dexametasona na análise histológica representada em score.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs – Células apresentadoras de antígeno

AT – Azul de Toluidina

BAL – Lavado Broncoalveolar

H&E – Hematoxilina e Eosina

HRB – Hiperrresponsividade Brônquica

I.N. – Intranasal

I.P. – Intraperitoneal

IFN- γ – Interferon gama

Ig – Imunoglobulina

IgE – Imunoglobulina E

IL – Interleucina

IL-13 – Interleucina 13

IL-17 – Interleucina 17

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

MHC – Complexo de histocompatibilidade

NALF – Fluido lavado nasal

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

OVA – Ovalbumina

PAS – Ácido periódico de shiff

PBS – Solução salina tamponada

PMN – Polimorfonucleares

q.s.p. – Quantidade suficiente para

RA – Rinite alérgica

RAC – Rinite alérgica crônica

RPM – Rotações por minuto

SPT – Teste cutâneo prick

Sumário

1. Introdução	19
1.1 Rinite	19
1.2. Hipersensibilidade Imediata	20
1.3. Relação rinite alérgica e asma.....	24
1.4. Modelos experimentais de rinite alérgica	25
1.5. Tratamento da rinite alérgica	26
2. Objetivos	27
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3. Material e Métodos	29
3.1. Animais	30
3.2. Preparo da droga padrão	30
3.3. Tratamento dos animais	30
3.4. Rinite alérgica induzida por ovalbumina (OVA)	31
3.5. Coleta do fluido lavado nasal (NALF)	32
3.6. Dosagem de imunoglobulina E OVA-específica	32
3.7. Contagem total e diferencial de células do NALF	33
3.8. Quantificação das citocinas	33
3.9. Análise histológica da cavidade nasal	34
3.10. Análise estatística	35
3.11. Substâncias e sais	35
3.12. Soluções	36
3.13. Score Histológico	41
3.14. Aparelhos	41
4. Resultados	42
4.1. Desenvolvimento da rinite alérgica induzida por ovalbumina e efeito de glicocorticoide na migração de células totais para o lavado da cavidade nasal	43
4.2. Efeito da sensibilização por ovalbumina e do tratamento com dexametasona na migração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o lavado da cavidade nasal ...	44
4.3. Efeito da sensibilização por ovalbumina e do tratamento com dexametasona na migração de eosinófilos para o lavado da cavidade nasal	45
4.4. Efeito da sensibilização por ovalbumina e do tratamento com dexametasona na produção de IgE ova-específica sérica	46
4.5. Efeito da sensibilização por ovalbumina e do tratamento com dexametasona na produção de citocinas no lavado da cavidade nasal	46

4.6. Efeito da sensibilização por ovalbumina e do tratamento com dexametasona na análise histológica da migração celular para o tecido da cavidade nasal.....	468
4.7. Efeito da sensibilização por ovalbumina e do tratamento com dexametasona na análise histológica de mucopolissacarídeo e metaplasia de células caliciformes no tecido da cavidade nasal.....	469
4.8. Efeito da estimulação por ovalbumina e do tratamento com dexametasona na análise histológica da migração de mastócitos na cavidade nasal.....	50
4.9. Efeito da estimulação por ovalbumina e do tratamento com dexametasona na análise histológica representada em score.....	51
5. Discussão	52
6. Conclusão	58
7. Referências	60

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Rinite

A Rinite, clinicamente, implica em um grupo heterogêneo de transtornos nasais caracterizados por um ou mais dos seguintes sintomas: prurido, congestão, rinorreia, dor de cabeça e fadiga desenvolvida a partir de um processo inflamatório que acomete as membranas mucosas nasais. (URMILA et. al., 2015)

Do ponto de vista etiológico, a rinite pode ser decorrente de uma infecção ou apenas de uma inflamação não infecciosa. A rinite não infecciosa tem sido tradicionalmente classificada como alérgica e não alérgica, e o diagnóstico tem-se baseado na história clínica do paciente e nas respostas ao teste cutâneo prick (SPT) (SIN et. al., 2011). No entanto, recentemente sugeriu-se que essa abordagem não está totalmente correta, pois pacientes previamente diagnosticado com rinite não alérgica ou rinite idiopática podem realmente ser classificados como tendo rinite alérgica (LOPEZ et. al., 2010). A forma alérgica é a mais comum de rinite, entretanto, ainda se encontra negligenciada e subnotificada pelos serviços de saúde mesmo sendo considerada uma das dez doenças que mais leva a busca por atendimento, bem como poucos estudos são realizados sobre a doença (BOUSQUET et. al., 2008).

A rinite alérgica (RA) é uma doença inflamatória das vias aéreas superiores comuns em crianças e adultos. Os sintomas mais frequentes, decorrentes das interações de células inflamatórias residentes e infiltrantes, associadas aos mediadores inflamatórios produzidos e liberados tais como as citocinas e neurotransmissores, são responsáveis pela alteração na qualidade de vida dos pacientes e envolvem custos consideráveis para a sociedade, afetando o sono, o desempenho escolar ou de trabalho (CIPRANDI et. al., 2007). No final da década de 90 estimou-se que os gastos com a RA chegaram aos 5,9 bilhões de dólares nos Estados Unidos da América (PRENNER et. al., 2006).

Estudos epidemiológicos demonstram que a RA é uma doença muito comum em todo o mundo afetando cerca de 20 a 25% da população o que corresponde a aproximadamente 1,8 bilhão de pessoas (OMS, OPAS, 2016). Em adição, tem sido mostrado que a rinite alérgica é um dos vários fatores de risco para o desenvolvimento de asma em adultos e crianças e que a

prevalência nos países industrializados aumenta a cada ano devido à exposição constante a diversas partículas (GUERRA et. al., 2002; SKONER et. al., 2001). Segundo a Hipótese de Higiene, alguns estudos atribuem o aumento da frequência de rinite alérgica na população e, principalmente na população dos países mais desenvolvidos, à mudanças na dieta, o uso indiscriminado de antimicrobianos e outros fatores que alterem a carga microbiana no início da vida, levando a uma maior susceptibilidade as alergias (BENDIKS et. al., 2013).

Algumas evidências dão suporte a relação de doenças nos sinos nasais e a rinite alérgica, 25 a 30% dos indivíduos com quadro agudo de sinusite tem rinite alérgica, e desses 40 a 67% possuem sinusite crônica unilateral e mais de 80% com sinusite crônica bilateral (FOKKENS et. al., 2007). Há relatos demonstrando a relação com outras alergias como a conjuntivite alérgica (YOKO et. al., 2012).

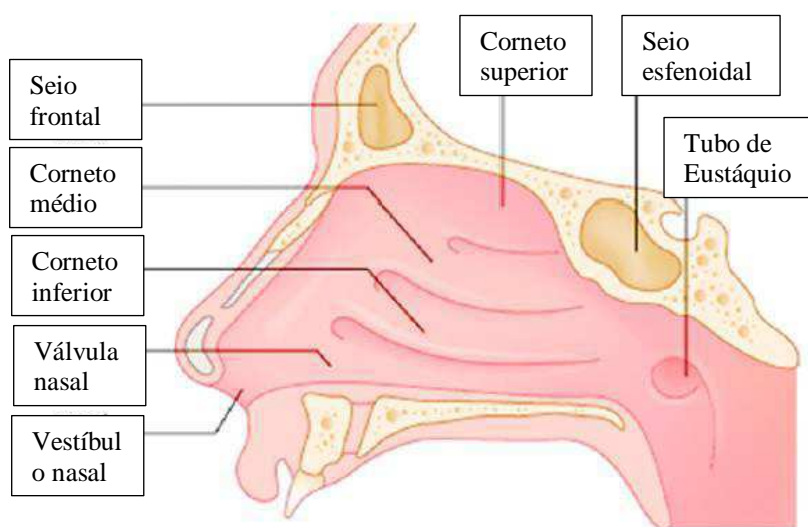
O desenvolvimento da RA aumenta a probabilidade de predisposição para sinusite pela inflamação das vias nasais resultando na congestão e obstrução nasal. A diminuição da ventilação sinusal e da disfunção ciliar, transudato de fluidos e estagnação do muco, todavia são promovidos também por bactérias patogênicas (FOKKENS et. al., 2007; HELING et. al., 2006).

A RA é classificada em sazonal caracterizada principalmente pela associação das mudanças de estação que promovem o contato com estruturas vegetais e/ou animais que possuem compostos proteicos extremamente alergênicos como, por exemplo, na poeira doméstica, pólenes e animais de estimação, e está associada ao aparecimento dos sintomas durante alguns dias com posterior resolução. A RA perene ou crônica é caracterizada pelo desenvolvimento dos sintomas durante todo o ano, provocada pelo contato com essas proteínas de forma mais intensa ou repetidamente (MANDHANE et. al., 2011).

1.2. Hipersensibilidade imediata

A cavidade nasal (Figura 1) é dividida, anatomicamente, pelo septo nasal, composto de osso e cartilagem, proximalmente e distalmente respectivamente. Apresenta os cornetos inferiores, médios e superiores responsáveis pelos processos de filtração, umidificação e

regulação da temperatura do ar antes que este alcance as vias inferiores. Os cornetos e toda a cavidade nasal são revestidos por uma mucosa epitelial ciliada colunar pseudoestratificada que adere por uma membrana basal e a submucosa (lâmina própria). Na região da submucosa são encontradas glândulas nasais serosas e seromucosas, além de nervos, vasos extensos e outros elementos celulares. Superficialmente à camada epitelial existe uma fina camada de muco de movimento dinâmico contínuo desenvolvido pelos cílios em direção a nasofaringe posterior (BRAUNSTAHL et. al., 2001).



Fonte: Dykewicz MS. Rinite e sinusite. *Imunologia Clínica*. 3a ed. Londres: Mosby Elsevier; 2008 p. 626-39.

Figura 1. Anatomia da cavidade nasal humana.

Nos processos infecciosos virais ou bacterianos bem como na inflamação alérgica, a depuração mucociliar é prejudicada. Além disso, desenvolve-se a obstrução nasal pelas alterações vasculares na rica rede presente nesta cavidade. A mucosa nasal é intensamente innervada e por isso rapidamente estimulada. O nervo simpático é estimulado com consequente aumento na resistência das vias aéreas nasais e vasoconstrição. Assim como o simpático, a estimulação também ocorre no nervo parassimpático, promovendo a secreção das glândulas nasais das vias aéreas e a congestão nasal. Especula-se que os neuropeptídeos substância P, neuroquinina A e K e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina desempenham um papel na vasodilatação, secreção de muco, extravasamento de plasma, inflamação neurogênica e interações de nervos aos mastócitos, necessitando de mais estudos para investigação dessas

ações, visto que todas ou a maioria já são descritas por vias imunológicas (BRAUNSTAHL et. al., 2001).

A mucosa das vias aéreas superiores humana é composta por uma “citobarreira” de células apresentadoras de antígeno (APCs) sendo elas macrófagos e células dendríticas (DCs) espacialmente e estreitamente relacionados. DCs residem nos espaços para e em torno das células epiteliais basais e atuam eficazmente na indução e regulação da resposta imune primária (BANCHEREAU et. al., 2000). Quando um alérgeno é inalado encontra as APCs nas paredes das vias respiratórias, essas células reconhecem, englobam, e processam o antígeno em peptídios curtos que são associados com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e deslocados para a membrana celular onde serão apresentadas às demais células do sistema imune. Ao migrarem para o linfonodo, as APCs induzem a mudança dos linfócitos TCD4 auxiliares em células Th2 por intermédio de citocinas, tais como IL-4 e IL-13, IL-5 (LAMBRECHT et. al., 2001).

As células Th2, efetoras do processo alérgico irão produzir citocinas e mediadores tais como IL-4 e IL-13, as quais realizam diversas funções, incluindo a estimulação da produção de IgE específica ao antígeno pelos linfócitos B. Os anticorpos IgE se ligam a um grupo de células, como mastócitos e basófilos, que se originam a partir de precursores da medula óssea que expressam o receptor CD34. Os mastócitos e basófilos expressam um receptor de alta afinidade (FcεRI) para a região Fc de IgE e, por conseguinte, a IgE liga-se essencialmente de forma irreversível a estes (BAHEKAR et. al., 2008)

Na reexposição ao mesmo antígeno ocorrerá a ligação desses na região variável da IgE ligada na superfície de mastócitos. A ligação cruzada de duas ou mais moléculas de IgE em mastócitos induz mudança de domínios intracelulares de agrupamento dos receptores de Fc ligado na célula, levando a uma complexa sequência de reações que geram um gatilho de degranulação das vesículas dos mastócitos. Sequencialmente estes liberam uma cascata de mediadores inflamatórios pré-formados como histamina e triptase e recém-sintetizados prostaglandinas e leucotrienos, resultando na obstrução aguda das vias respiratórias. Os mediadores pré-formados histamina e triptase atuam induzindo a inflamação localizada, estimulando o sistema nervoso e manifestando os sintomas clínicos da rinite alérgica (MANDHANE et. al., 2011).

Estudos recentes investigam a atuação dos mediadores inflamatórios e seus receptores na patogênese da rinite alérgica, dentre eles os receptores CCR3 e CCR4 (WILLEMS *et. al.*, 2009; BANFIELD *et. al.*, 2010).

O receptor CCR3, predominante na superfície celular dos eosinófilos pode ser ativado por várias citocinas levando a quimiotaxia e a ativação celular (WILLEMS *et. al.*, 2009). O receptor CCR4 expresso nos linfócitos Th2 são caracterizados por participarem do recrutamento dos linfócitos T auxiliares e no desenvolvimento da inflamação da mucosa nasal na resposta frente ao alérgeno (BANFIELD *et. al.*, 2010). Devido a sua atuação, os receptores são excelentes alvos potenciais para drogas para o tratamento da rinite alérgica.

Presentes no processo inflamatório alérgico da rinite estão os eosinófilos. Os eosinófilos são recrutados aos sítios em processos severos e duradouros de alergia onde atuam de forma citotóxica pela liberação de componentes catiônicos como proteínas e de suas peroxidases. Os eosinófilos serão quimiotaticamente atraídos para o tecido, esse processo envolve mediadores inflamatórios tais como a IL-5 que é responsável pela diferenciação, mobilização, ativação, recrutamento, sobrevivência e crescimento dos eosinófilos (SRIVASTAVA *et. al.*, 2010; COOK-MILLS *et. al.*, 2013).

Assim como os eosinófilos, os mastócitos são células muito bem definidas no processo alérgico atuando via liberação de seus mediadores principalmente histamina e os eicosanoides. A ativação e estimulação dos mastócitos ocorrem via ligação cruzada de IgE nos seus receptores e o antígeno. Em adição, os basófilos, células sanguíneas que fazem transmigração para o tecido inflamado, assim como os mastócitos, apresentam receptores do tipo FcεRI para a IgE alérgeno-específico e dessa forma desempenham funções importantes na rinite alérgica (HE *et. al.*, 2012).

Nas reações inflamatórias da cavidade nasal, alguns quadros clínicos de rinite alérgica se devem a participação da família de citocinas IL-17, oriunda do LTh17, associadas a processos mais agressivos envolvendo principalmente neutrófilos e eosinófilos (WANG *et. al.*, 2008). Em humanos, a regulação entre os perfis linfocitários presentes na rinite alérgica, como o Th17 é suprimido pela expressão de IL-13 (NEWCOMB *et. al.*, 2011), bem com a

produção de IL-17A é inibida pela IL-4 (HELLING et. al., 2003). Em modelos alérgicos, a IL-17 promoveu uma neutrofilia acompanhada da inibição de eosinofilia nos tecidos periféricos desenvolvendo um processo inflamatório resistente aos glicocorticoides (HELLING et. al., 2003).

Em outros modelos de alergia, como a asma onde animais são sensibilizados com alérgeno, a superprodução de IL-17 e níveis mais baixos de IL-4 e IL-13 desencadeia migração celular de neutrófilos demonstrando que a regulação entre as células Th2 e Th17 define o perfil celular encontrado (HE et. al., 2009).

Nos modelos em que há a atuação característica de células Th2 a produção dos mediadores inflamatórios IL-4, IL-5 e IL-13 conduzem à metaplasia de células da mucosa em modelos animais e há hiperprodução de muco (ZUHDI et. al., 2000).

1.3. Relação entre rinite alérgica e asma

A palavra atopia está diretamente relacionada à produção de IgE-alérgeno específica definindo, portanto, a alergia atópica. Dentre as diversas doenças atópicas, além da rinite alérgica, temos a rino conjuntivite alérgica, asma, dermatite alérgica e alergia alimentar. Muitos fatores estão associados à predisposição no desenvolvimento de alergias atópicas, dentre elas a causa genética ligada os cromossomas 2, 5, 6, 7, 11, 13, 16 e 20 (VON-MUTIUS et. al., 2003).

Tem sido descrito que até 80% de asmáticos são afetados por RA e até 40% dos pacientes com RA tem asma concomitante (LOHIA et. al., 2013). Um em cada três pacientes com RA pode evoluir para asma dentro de 10 anos (BOUSQUET et. al., 2001). Estudos realizados com pacientes com RA sugerem que se a inflamação das vias aéreas superiores for tratada adequadamente impede a progressão para a asma (PASSALI et. al., 2013), reduz a sintomatologia das vias aéreas inferiores, e melhora o controle da asma (STELMACH et. al., 2006).

Um terço dos pacientes com RA apresenta quadros asmáticos e tem algum processo inflamatório nas vias aéreas inferiores que levam ao processo de hiperresponsividade brônquica (HRB) (BROWN et. al., 2007). O contato nasal de pacientes com alérgenos causa eosinofilia exacerbada e HRB em pacientes com rinite alérgica e asma (BRAUNSTAHL et. al., 2001; BONAY et. al., 2006). E os pacientes com rinite moderada ou grave tem mais chance de evoluir para quadros de asma grave resistente a glicocorticoides (HALPERN et. al., 2004; CORREN et. al., 2007).

Estudos sugerem que essas duas doenças apresentam manifestações clínicas de mesma etiologia, portanto podendo acometer todo o trato respiratório pela sua anatomia e fisiologia (LINNEBERG et. al., 2002). Foi observado que crianças, nos seus primeiros anos de vida, que desenvolvem quadros de RA apresentam maior chance de desenvolvimento de asma quando comparados com crianças que nunca tiveram RA. A exacerbação frequente que ocorre nos casos de asma, coincidentemente acontece em momentos de desenvolvimento de sintomas nasais característicos da RA (MATSUNO et. al., 2006).

1.4. Modelo experimental de rinite alérgica

No presente estudo, a abordagem experimental utilizada, desenvolveu-se inicialmente com a administração do agente alergênico ovalbumina, desconhecido pelo sistema imunológico dos animais, na cavidade peritoneal induz o reconhecimento do antígeno pelas células de defesa presentes nessa cavidade, o que a torna escolha para esse procedimento. Portanto, caracterizando o processo de sensibilização imunológica dos animais. No período de sensibilização são produzidas imunoglobulinas da subclasse IgE que são liberadas na corrente sanguínea e tecidos para reconhecimento do antígeno. Nos tecidos as IgE se ligam, com alta afinidade, a receptores nos mastócitos. Posteriormente, em exposição na cavidade nasal, via desafios imunológicos com o alérgeno desenvolve-se, nos animais, um processo de hipersensibilidade caracterizada pela mediação dos anticorpos IgE-alérgeno específicas acoplados aos mastócitos, ligação do alérgeno as IgE que induzem a degranulação dessas células com liberação de mediadores vasoativos culminando com a produção de muco, produção de mediadores inflamatórios, pelo recrutamento celular, proliferação leucocitária, levando o animal ao desenvolvimento da rinite alérgica.

1.5. Tratamentos para rinite alérgica (RA)

A RA, como as demais alergias, é uma doença sem cura, até o momento. Entretanto, a farmacoterapia da RA tem como objetivo a melhoria da qualidade de vida dos pacientes acometidos pelo controle dos sintomas e dessa forma prevenindo também sequelas. A principal forma de tratamento utilizada hoje na clínica é o manejo dos sintomas clínicos inibindo a liberação dos mediadores alérgicos pelas células efetoras do processo, portanto evitando o início rápido dos sintomas e posteriormente o manejo de outros mecanismos de ação interrompendo a manutenção das estimulações de células inflamatórias. (MANDHANE et. al., 2011). Desta forma, hoje estão disponíveis algumas classes de fármacos como os anti-histamínicos, os glicocorticoides, anti-leucotrienos, estabilizadores de mastócitos, agentes anticolinérgicos e mais recentemente a imunoterapia, terapia com os imunobiológicos, para o controle da rinite alérgica.

Apesar do número significativo de medicamentos para controle dos sintomas clínicos na RA, nenhum é capaz de levar a cura da doença. Os efeitos adversos provocados pelos fármacos são fatores que impedem o seu uso contínuo movendo, portanto, as pesquisas científicas na busca de moléculas de fontes naturais ou sintéticas com potenciais para serem acrescentadas ao arsenal de medicamentos para o manejo das alergias em especial a RA. Para tal, se faz necessário modelos experimentais estabelecidos que mimetizem a RA para que moléculas, com potencial de tratamento da RA com baixos efeitos colaterais, sejam testadas pré-clinicamente para então serem consideradas potenciais na continuidade de seus estudos na fase clínica.

O Laboratório de Imunofarmacologia lotado nas dependências do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) na UFPB, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Marcia Regina Piuvezam, tem por vocação estudar e respaldar cientificamente moléculas e/ou extratos de plantas medicinais em modelos experimentais de inflamação aguda, lesão pulmonar aguda e asma brônquica objetivando a descoberta de medicamentos para o manejo de tais doenças, portanto há a necessidade preeminente de estender os estudos implementando modelos experimentais de RA para complementar os estudos já realizados e descobrir drogas com capacidade de manejar os sinais e sintomas clínicos relacionados com doenças do trato respiratório.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Implementar o modelo experimental de rinite alérgica crônica no Laboratório de Imunofarmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Avaliar o desenvolvimento da rinite alérgica crônica induzida por ovalbumina (OVA);
- 2.2.2 Avaliar a migração celular para a cavidade nasal dos animais com rinite alérgica crônica;
- 2.2.3 Avaliar a produção de IgE-ova específica pelos animais com rinite alérgica crônica;
- 2.2.4 Avaliar a produção de citocinas na cavidade nasal dos animais com rinite alérgica crônica;
- 2.2.5 Avaliar histologicamente a reação inflamatória tecidual, produção de mucopolissacarídeo, presença de células caliciformes e presença de mastócitos na cavidade nasal dos animais com rinite alérgica crônica;

MATERIAL E MÉTODOS

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Camundongos isogênicos BALB/c fêmeas e ratas wistar foram utilizados nos protocolos experimentais e fornecido pelo biotério Prof. Dr. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba, Brasil. Os animais tiveram livre acesso à água e alimentação balanceada a base de ração tipo Pellets, numa temperatura média de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Os camundongos pesavam entre 20 e 25g e as ratas entre 200 e 250g. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais sob o número CEUA N° **114/2015** (Anexo I).

3.2. Preparo da droga padrão

A droga padrão utilizada foi a dexametasona (Sigma Aldrich) onde a dose utilizada foi 2 mg/kg. Para o seu preparo foram pesadas quantidades da droga, em vidro de relógio, de acordo com o peso dos animais do grupo para atingir 2 mg/kg, em seguida este pó foi solubilizado em solução salina em um volume de 1000 μl obtendo uma suspensão pronta para administração nos animais.

3.3. Tratamento dos animais

A via de administração bem como a dose da droga padrão administrada nos animais foram baseadas na literatura e na sua utilização na clínica de doenças alérgicas crônicas. O grupo de animais (n=5), definido como grupo dexa, foi tratado por via intranasal (i.n.) com a droga padrão (dexametasona, 2 mg/kg) sensibilizado e desafiado com ovalbumina (OVA), no grupo basal, os animais foram tratados com o veículo (salina) e não foram sensibilizados e desafiados com OVA, e no grupo OVA os animais foram tratados com salina, sensibilizados e desafiados com OVA. Os tratamentos foram realizados uma hora antes do desafio.

Tabela 1. Tratamento dos animais de cada grupo.

GRUPOS	SENSIBILIZAÇÃO	DESAFIOS	TRATAMENTO
BASAL	Salina	Salina	Salina
OVA	OVA	OVA	Salina
DEXA	OVA	OVA	Dexa

3.4. Rinite alérgica induzida por ovalbumina (OVA)

O modelo experimental de rinite alérgica escolhido foi baseado no protocolo experimental desenvolvido e publicado por Wang e colaboradores em 2013, com adaptações para sua realização no Laboratório de Imunofarmacologia. Para tal, nos dias 0 e 7 os camundongos foram submetidos a uma injeção de 100 μ L para cada 10g de animal via intraperitoneal (i.p.) de uma suspensão contendo 50 μ g/mL de ovalbumina (OVA) grade V (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) e 10 mg/mL de Al(OH)₃ (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) em solução salina 0,9% caracterizando o processo de sensibilização imunológica. Em seguida, foram submetidos aos desafios com doses de 0,50 μ g de OVA grade V em 20 μ L de solução salina 0,9% administrados via intranasal (i.n.) durante três dias na semana, três semanas seguidas, sendo estes o 14^o, 15^o, 16^o, 21^o, 22^o, 23^o, 28^o, 29^o e 30^o dias do protocolo experimental. Após um intervalo de 15 dias, nos dias 49, 50, 51, 52, 53, 54 e 55 foi realizado o tratamento com dexametasona ou veículo e, uma hora após, foi realizado o desafio alérgênico nos animais (Figura 2).

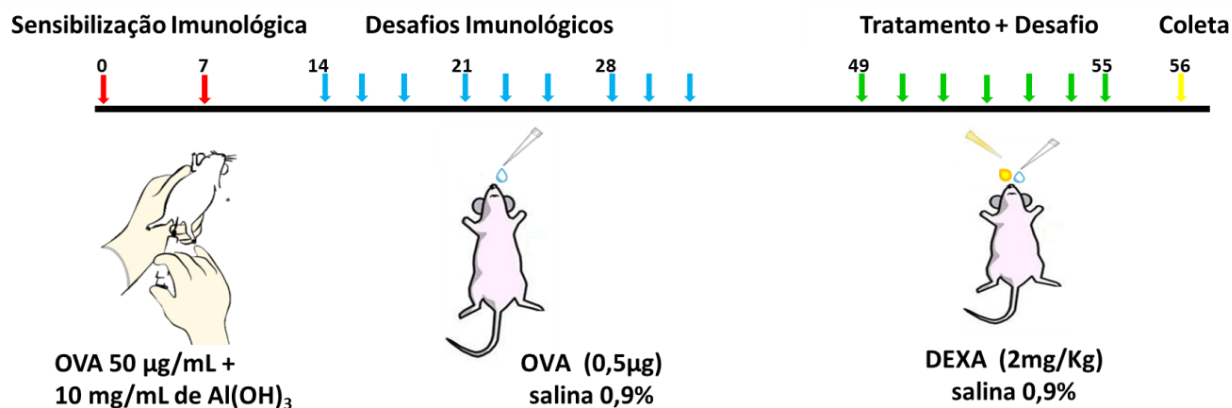


Figura 2. Protocolo de rinite alérgica crônica.

3.5. Coleta do fluido lavado nasal (NALF)

Para análise do material nasal, no último dia do protocolo experimental os animais foram eutanasiados pela administração intramuscular de overdose de solução anestésica de cetamina com xilasina (30 mg/kg e 300 mg/kg respectivamente) e o NALF foi coletado. O lavado foi realizado utilizando 1 mL de solução HBSS resfriada, administrada por via intratraqueal no animal no sentido traqueia-nariz e o fluido coletados em microtubos pela cavidade nasal. Os tubos foram centrifugados (Centrífuga MP4R, IEC) a 1500 rpm, em uma temperatura de 4°C, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram separados e coletados do sedimento e congelados no freezer a uma temperatura de -20°C para posterior dosagem de citocinas e o sedimento celular utilizado para avaliação da composição leucocitária do lavado.

3.6. Dosagem de imunoglobulina E – OVA específica

Para a dosagem da IgE – OVA específica foi desenvolvida via protocolo de anafilaxia cutânea passiva. As amostras de sangue foram retiradas pelo plexo braquial dos animais recém eutanasiados, centrifugadas a 4°C por 10 min a 1500 rpm. Em seguida o soro foi coletado e armazenado em microtubos. A partir de então foram realizadas diluições seriadas deste soro em solução de PBS iniciando em 1:32 até a diluição de 1:4096. Estas concentrações foram introduzidas no dorso de ratas Wistar, via subcutânea em regiões distantes três centímetros entre si. As diluições do soro revelam-se contendo IgE-OVA específica após a administração intravenosa de uma solução de OVA grade V associada ao corante Azul de Evans no intervalo de 24 horas. O fenômeno acontece pela ligação da OVA à IgE acoplada aos mastócitos do tecido e degranulação dessas células com liberação de histamina que promove a vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular promovendo portanto, uma coloração azulada do tecido subcutâneo das ratas na região de aplicação do soro. O diâmetro do halo formado foi medido após a eutanásia das ratas e retirada a pele do dorso. O menor halo azulado formado refere-se a maior diluição do soro e que determina o título de IgE-OVA específica no animal.

3.7. Contagem total e diferencial de células do NALF

O número total de células presente no NALF foi obtido utilizando a câmara de Neubauer. O NALF foi diluído na proporção de 1:2 em solução de Turk (VETEC, Rio de Janeiro, RJ). O líquido de Turk é um agente hemolítico e precipitador plaquetário utilizado para a contagem de leucócitos. A contagem foi realizada no microscópio óptico (40X - BX40, OLYMPUS). Para contagem diferencial foram retirados 200 µL de cada amostra de NALF e estes foram cito centrifugados em Cytospin (FANEN, São Paulo, SP, Brasil Mod 2400). As lâminas obtidas foram fixadas e coradas utilizando corantes rápidos do tipo panótipo. A contagem diferencial das células foi realizada na microscopia óptica onde foram contadas cem células por lâmina, usando critérios morfológicos para identificar os tipos de leucócitos e dessa forma determinar o percentual (Sousa et. al., 2010).

3.8. Quantificação das citocinas

As citocinas IL-4, IL-13, IL-17 e IFN- γ foram quantificadas no NALF pelo ensaio imuno enzimático - ELISA sanduíche baseadas no protocolo fornecido no Kit pelo fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA). Para tal, as placas de ELISA (NUNC-Immuno™) foram sensibilizadas com os anticorpos de captura anti-IL-4, anti-IL-13, anti-IL-17 e anti-IFN- γ preparados por diluições em tampão fosfato pH 6.5 e incubadas por 18h a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS 0,05% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas com a solução de bloqueio (PBS contendo 10 % de SFB) por uma hora. Em seguida, as placas foram lavadas com PBST e nos poços adicionadas às amostras a serem analisadas ou as diferentes concentrações das citocinas recombinantes IL-4, IL-13, IL-17 e IFN- γ para a formação da curva de concentração padrão. As placas foram novamente incubadas por 18 horas a 4°C. Após este período de incubação, as placas foram lavadas e o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotinilado foi adicionado aos poços das placas e essa incubadas por uma hora. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP) foi adicionado e 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 (H₂O₂) e após 15 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1N. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro (MICROPLATE READER versa Max, tunable, BN

2529 Molecular Devices) em comprimento de onda 450 nm. As concentrações de citocinas foram calculadas a partir das absorvâncias em relação a absorvância obtida na curva-padrão.

3.9. Análise histológica da cavidade nasal

Para avaliar as características histológicas da cavidade nasal dos grupos de camundongos descritos anteriormente foi feita a coleta da cabeça de cada animal 24h após o último desafio, após a coleta do NALF. As cabeças foram colocadas e identificadas em tubos do tipo *Falcon* com fixador formalina tamponada por 24h para interromper a degradação do tecido pela ação de enzimas celulares (autólise) ou de microrganismos após a morte do animal. O fixador preserva a estrutura dos tecidos ao interagir com os grupos aminos das proteínas, por pontes de hidrogênio. Logo em seguida, as amostras foram colocadas em solução de EDTA para processo de descalcificação e 15 dias após foram introduzidas e identificadas em cassetes e submetidas em banho em água corrente por 24 horas para retirada do excesso de fixador e de descalcificador. Em seguida, as amostras foram incubadas em álcool etílico 70% para iniciar a bateria de processamento. As cabeças lavadas foram inicialmente desidratadas em diferentes concentrações de álcool etílico 80, 90, 95 e 100%, 1 hora em cada solução. O processo de desidratação é necessário para preparar as amostras para a diafanização, já que a água nos tecidos não é miscível em substâncias apolares como o xilol e a parafina de inclusão. Após a desidratação as amostras foram submetidas à diafanização, banhos em xilol I e xilol II por 1 hora para preparar as amostras para a inclusão em parafina. Em seguida, os cassetes foram imersos em parafina líquida mantida a temperatura de 56°C, sendo dois os banhos, cada um de 1 hora em parafina I e II para infiltração desta na amostra. Posteriormente, o tecido foi transferido para o molde (forma histológica) onde foi imerso em parafina (Parafina para análise histológica- QEEL, São Paulo, SP). Poucos minutos após ser colocada na forma, a parafina solidifica e assim obtivemos o "bloco" de parafina contendo a amostra de tecido em seu interior, esse foi identificado e deixado em temperatura ambiente para resfriamento. Prosseguindo com o protocolo, foi realizada a microtomia, processo de corte dos blocos, de forma que se forme fitas de aproximadamente 5 µm de espessura com o auxílio de um micrótomo (LEICA, SP Labor 300). Os cortes foram colocados em banho-maria (38 – 39°C), sendo retirados após, com lâminas de vidro para microscopia. A secagem das lâminas foi realizada ao ar livre, em temperatura ambiente. Com os cortes aderidos as lâminas, foram realizadas as colorações

Hematoxilina-Eosina (HE) para análise de parâmetros inflamatórios como migração celular e vasodilatação, Ácido Periódico de Schiff (PAS) para evidenciação de muco e as células caliciformes e o corante Azul de Toluidina (AT) para marcação de mastócitos na região da cavidade nasal visto ser uma célula efetora do processo alérgico.

3.10. Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos com média \pm erro padrão da média e analisados estatisticamente utilizando o software Graphpad Prism na versão 5.0 (Graphpad Oftware Inc., San Diego, USA), empregando-se o teste ANOVA one-way seguido de pós-teste de Tukey para múltiplas comparações, onde os valores de $+++p < 0,0001$, foram considerados significativos quando comparados ao grupo OVA; $*p < 0,05$, $**p < 0,001$ e $***p < 0,0001$ foram considerados significativos quando comparados ao grupo basal. Os dados das análises histológicas foram tratados com o teste de Kruskal-Wallis e os parâmetros considerados para o cálculo da pontuação foram infiltração celular, produção de muco e número de mastócitos (Tabela 11). Os testes foram escolhidos conforme a natureza dos dados obtidos e descritos nas legendas das figuras.

3.11. Substâncias e sais

1. Ácido acético glacial – MERK
2. Cloreto de potássio (KCl) – MERK
3. Cloreto de sódio (NaCl) – SIGMA
4. Corante Azul de Evans – VETEC
5. Corante Azul de Toluidina – VETEC
6. Corante Eosina amarelada – VETEC
7. Corante Hematoxilina – VETEC
8. Corante Reativo de schiff – VETEC
9. Corante Violeta de Genciana – VETEC
10. EDTA – SIGMA
11. Formaldeído – MERCK
12. Fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) – MERCK

13. Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) - MERCK

14. Hidróxido de Alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) – VETEC

3.12. Soluções

Tabela 2. Solução Salina

Substância	Quantidade
NaCl (Cloreto de sódio)	9 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Para preparo da solução salina, após a pesagem do sal, foi adicionado o volume de água destilada em béquer de 1L e este colocado no agitador magnético VWR (MINI-HOT PLATE / STIRRER). O sal foi adicionado e homogeneizado até completa dissolução, posteriormente a solução foi filtrada.

Tabela 3. Solução salina tamponada (PBS)

Substância	Quantidade
Cloreto de sódio	8,76 g
Fosfato de Sódio dibásico	2,249 g
Fosfato de Sódio monobásico	0,255 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Para preparo da solução salina tamponada, inicialmente foram pesados todos os sais necessários. Em seguida o volume de água foi colocado em béquer, em agitador magnético VWR (MINI-HOT PLATE / STIRRER) e foi adicionado o cloreto de sódio. Depois da sua

dissolução foi adicionado o fosfato de sódio monobásico repetindo o processo e por último foi adicionado o fosfato de sódio dibásico.

Tabela 4. Solução de Turk

Substância	Quantidade
Ácido Acético Glacial	1,5 mL
Violeta de Genciana 1%	1,0 mL
Água destilada q.s.p.	100 mL

Para preparo da solução de Turk, inicialmente foi adicionado em béquer de 250 ml o volume de 50 ml de água destilada. Após, o ácido acético glacial. Em seguida foi adicionada a violeta de genciana e o volume foi completado para os 100 ml. Por último a solução foi filtrada.

Tabela 5. Solução Tampão Fosfato pH 7,2 utilizado no EDTA

Substância	Quantidade
Solução A	
NaH ₂ PO ₄	13,7 g
Água destilada	1000 mL
Solução B	
Na ₂ HPO ₄	35,8 g
Água destilada	1000 mL
Tampão Fosfato	
Solução A	750 mL
Solução B	250 mL

EDTA	
Tampão Fosfato	1000 mL
EDTA	100 g

Inicialmente foram pesados os sais fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico. Em seguida para preparar a solução A foi adicionado a béquer de 1L, 900 ml de água destilada. Após, foi adicionado o fosfato de sódio monobásico. A solução foi homogeneizada em agitador magnético VWR (MINI-HOT PLATE / STIRRER) para completa dissolução e adicionada água para completar o volume. Para preparo da solução B, o fosfato pesado foi adicionado a béquer contendo 900 ml de água destilada. Foi colocada em agitação magnética VWR (MINI-HOT PLATE / STIRRER) até completa dissolução e o volume foi completado para 1L.

Tabela 6. HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) pH 7,4

Substância	Quantidade
KCl	4,0 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
NaCl	80,0 g
Na ₂ HPO ₄	0,4788 g
D-glucose	10,0 g
Água destilada	1000 mL

Inicialmente foi adicionada a água em béquer de 1L. Em seguida foram adicionados os sais, um após a diluição do outro. Em seguida, foi misturada a esta solução 3,5 g de NaHCO₃. Posteriormente, o pH foi ajustado para 7,4 utilizando NaOH 1N e HCl 1N.

Tabela 7. Corante Azul de toluidina

Substância	Quantidade
Azul de toluidina	10 g
Ácido acético glacial	10 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Inicialmente foi adicionado o ácido acético a 900 ml de água em béquer e em seguida o azul de toluidina. Posteriormente foi adicionado o volume restante para completar 1L e a solução foi mantida em homogeneização por 5 minutos em agitador VWR (MINI-HOT PLATE / STIRRER).

Tabela 8. Reativo de Schiff para coloração de PAS

Substância	Quantidade
Fucsina básica	2 g
Metabissulfito de sódio	4 g
Carvão ativado	2 g
HCl 1N	40 mL
Água destilada	200 mL

Para preparo do reativo de schiffit inicialmente dissolveu-se a fucsina básica em água destilada quente. Após a dissolução, deixa-se esfriar até 60°C. Nessa temperatura foi adicionado o carvão ativado agitando por 1 minuto e em seguida filtrando a solução.

Tabela 9. Ácido periódico a 1% para coloração de PAS

Substância	Quantidade
Ácido periódico	1 g
Água destilada	100 mL

Para preparar o ácido periódico, foi adicionada a água em béquer e homogeneizado por 5 minutos em agitador VWR (MINI-HOT PLATE / STIRRER).

Tabela 10. Eosina Y para coloração de H&E

Substância	Quantidade
Eosina Y	10 g
Álcool 95%	900 mL
Água destilada	100 mL

Para preparo da eosina y, depois da pesagem do corante, foi adicionada a água a um béquer de 1L e em seguida a eosina, homogeneizando até completa dissolução em agitador VWR (MINI-HOT PLATE / STIRRER). Posteriormente foi adicionado o álcool a 95% homogeneizado e por último filtrado.

3.13. Score Histológico dos parâmetros inflamatórios alérgicos

Tabela 11. Parâmetros inflamatórios de pontuação analisados para histologia da cavidade nasal

SCORE	INFILTRADO CELULAR E MUCO
0	Ausência de alterações histológicas
1	Suave: menos de 25% do campo microscópico
2	Moderado: 25-49% do campo microscópico
3	Acentuado: 50-75% do campo microscópico
4	Muito acentuado: mais de 75% do campo
SCORE	MASTÓCITOS
0	Menos de 5 células por campo
1	5 a 15 células por campo microscópico
2	De 15 a 25 células por campo microscópico
3	De 25 a 35 células por campo microscópico
4	Mais de 35 células por campo microscópico

Para realização do score histológico, foram analisadas quatro lâminas de cada grupo, para cada coloração de acordo com o parâmetro avaliado. Foram atribuídas as pontuações de acordo com o nível de alterações visualizado em cada lâmina obedecendo a tabela descrita acima.

3.14. Aparelhos

1. Agitador Magnético - VWR – STIRRER
2. Balança analítica – Marte MOD: AY220
3. Centrífuga refrigerada – Centra MP4R – International Equipment Company (IEC)
4. Cytospin – FANEM – MOD: 2400
5. Espectrofotômetro – MICROPLATE READER versa Max, BN 2529
6. Microscópio óptico – Motic MOD: BA210
7. Micrótomo – LEICA, SP Labor 300

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Desenvolvimento da rinite alérgica crônica induzida por ovalbumina e efeito de glicocorticoide na migração de células inflamatórias totais para o lavado da cavidade nasal.

O desenvolvimento da rinite alérgica foi alcançado no protocolo experimental adaptado no Laboratório de Imunofarmacologia. A utilização da ovalbumina (OVA) inicialmente sensibilizando, em duas etapas, e posteriormente desafiando, via intranasal, por vários dias (nove desafios) antes dos tratamentos, foi capaz de induzir o processo inflamatório-alérgico nas mucosas nasais. No grupo de animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com salina (grupo OVA) foi possível identificar um aumento significativo ($p < 0,0001$) no número de células que migraram para a cavidade nasal desses animais quando comparados aos animais do grupo salina que não foram sensibilizados e desafiados com OVA, mas tratados com salina. O tratamento por via intranasal com o glicocorticoide dexametasona (2,0 mg/kg), 1 h antes dos desafios com a OVA (sete desafios), inibiu a migração das células para a cavidade nasal quando comparado ao grupo OVA (Gráfico 1). E, como esperado, o grupo basal não apresentou migração de células inflamatórias para a cavidade nasal.

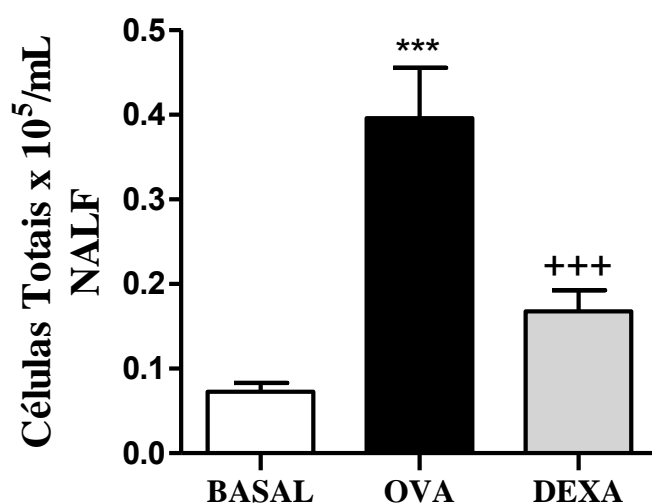


Gráfico 1. Efeito da sensibilização com ovalbumina (OVA) e tratamento com dexametasona (DEXA) na migração de células para a cavidade nasal dos camundongos BALB/c. Os camundongos foram tratados com a dexametasona na dose de 2 mg/kg (DEXA) após 1 h, receberam por instilação nasal a OVA. A análise da migração foi observada pela contagem das células presentes no lavado nasal (NALF) pela câmara de Neubauer. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média onde os valores para *** $p < 0,0001$ quando comparados ao grupo basal e, +++ $p < 0,0001$ quando comparados ao grupo OVA foram considerados significativos. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.

4.2. Efeito da sensibilização com ovalbumina e do tratamento com a dexametasona na migração de neutrófilos e macrófagos para o lavado da cavidade nasal.

O gráfico 2 apresenta os resultados relacionados a sensibilização dos animais com a OVA e a relação com a migração das células inflamatórias na cavidade nasal. Macrófagos, neutrófilos e linfócitos fazem parte do processo inflamatório atuando no combate ao agente agressor para retorno do tecido a homeostasia. Embora não seja as células desencadeadoras dos processos alérgicos são de fundamental importância no processo inflamatório alérgico. E como podemos observar nos gráficos 2A e 2B o número dessas populações celulares está aumentado significativamente. Já o número de linfócitos observados em 2C não apresenta elevação nos animais sensibilizados com OVA.

A droga padrão, dexametasona (2 mg/kg), como esperado, foi capaz de diminuir significativamente a migração de neutrófilos e macrófagos quando comparado ao grupo OVA. Em relação aos linfócitos, a dexametasona diminuiu o número dessas células em relação ao basal, sem diferença estatística do grupo OVA.

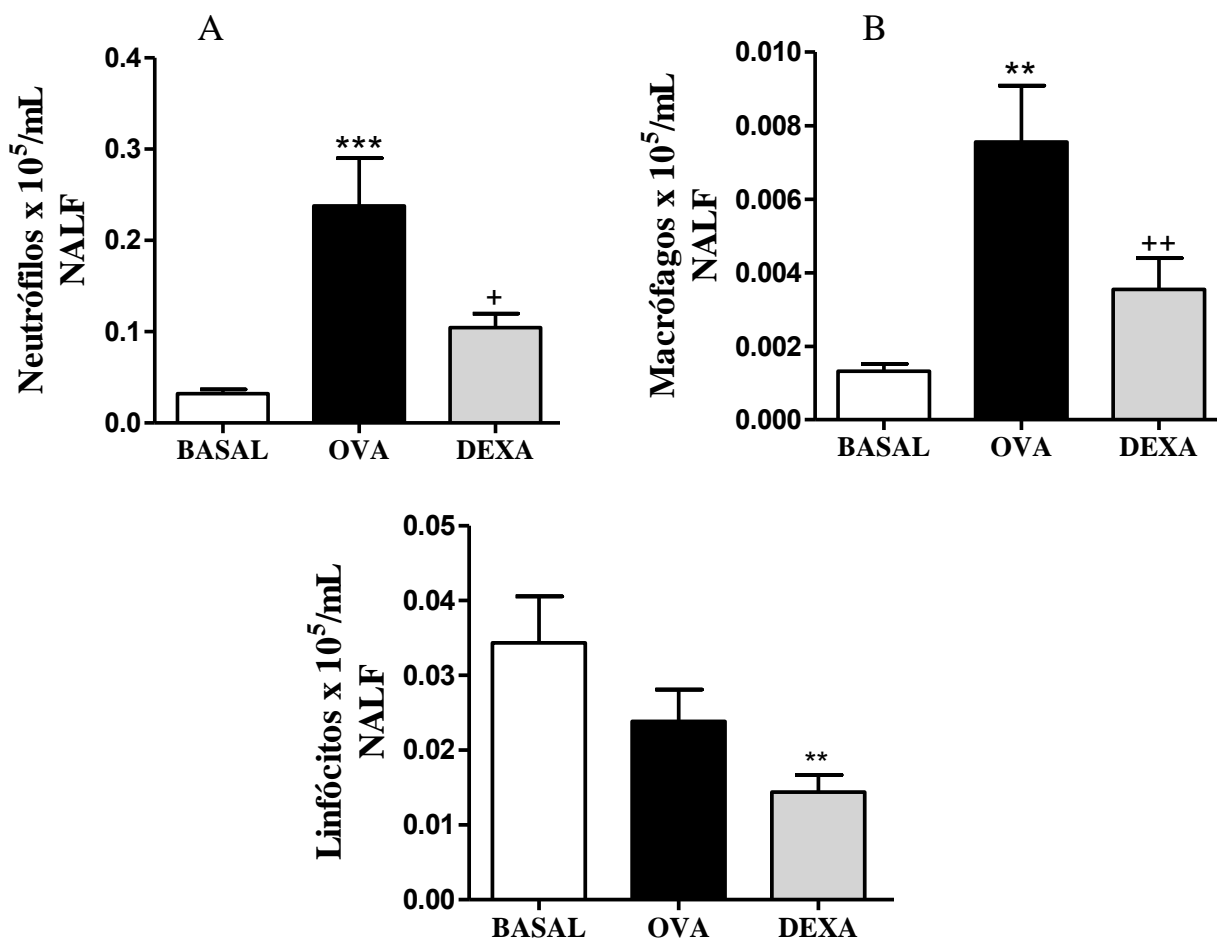


Gráfico 2. Efeito da dexametasona na migração de neutrófilos (A), macrófagos (B) e linfócitos (C) para a cavidade nasal dos camundongos BALB/c desafiados com OVA. Camundongos foram tratados com a dexametasona na dose de 2 mg/kg (DEXA) e 1 h depois foram desafiados via instilação nasal com a ovalbumina. A análise da migração foi observada pela contagem das células via a citocentrifugação de parte da suspensão celular do lavado nasal, coradas com panótico e análise das lâminas ao microscópio. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média onde os valores para *** $p < 0,0001$ quando comparados ao grupo Basal e, + $p < 0,05$ quando comparados ao grupo OVA foram considerados significativos. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.

4.3. Efeito da sensibilização com ovalbumina e do tratamento com dexametasona na migração de eosinófilos para o lavado da cavidade nasal.

O gráfico 3 apresenta os resultados relacionados a sensibilização dos animais com a OVA e a relação com a migração de eosinófilo, célula que demonstra o desenvolvimento do processo alérgico. Como pode ser observado a OVA foi capaz de induzir a migração de eosinófilos para a cavidade nasal quando comparados ao grupo basal. E, como esperado, a droga padrão dexametasona foi capaz de diminuir, significativamente, a migração de eosinófilo para a cavidade nasal quando comparada ao grupo OVA.

Pelos resultados apresentados, o protocolo experimental induziu a migração dos eosinófilos para a cavidade nasal, evidenciando o desenvolvimento da doença alérgica, conseqüentemente demonstrando que o protocolo foi eficaz para a realização das análises pré-clínicas da rinite alérgica.

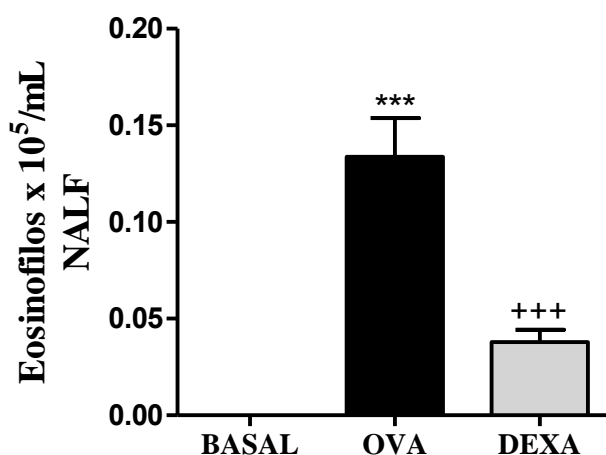


Gráfico 3. Efeito da dexametasona na migração de eosinófilos para a cavidade nasal dos camundongos BALB/c desafiados com OVA. Camundongos foram tratados com a dexametasona na dose de 2 mg/kg (DEXA) e 1 h depois foram desafiados via instilação nasal com a ovalbumina. A análise da migração celular foi observada pela contagem dos eosinófilos no lavado nasal via cito centrifugação de parte do material, coloração com panótico e análise das lâminas ao microscópio. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média onde os valores para *** $p < 0,0001$ quando comparados ao grupo Basal e, +++ $p < 0,0001$ quando comparados ao grupo OVA. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.

4.4. Efeito da sensibilização com ovalbumina e do tratamento com dexametasona na produção de IgE ova-específica sérica.

O gráfico 4 apresenta os resultados relacionados a sensibilização dos animais com a OVA e a relação com a produção de Imunoglobulina E OVA-específica quantificada nos soros dos animais. O tratamento com dexametasona na dose de 2 mg/kg, 1 h antes dos desafios reduziu significativamente a produção de IgE OVA-específica quando comparado aos animais do grupo OVA.

A produção de IgE pelos linfócitos B ocorre após o contato com o alérgeno e é intensificada à medida que os animais são expostos diariamente ao alérgeno e são liberadas na corrente sanguínea e nos tecidos quando se ligam aos receptores de alta afinidades presentes nos mastócitos.

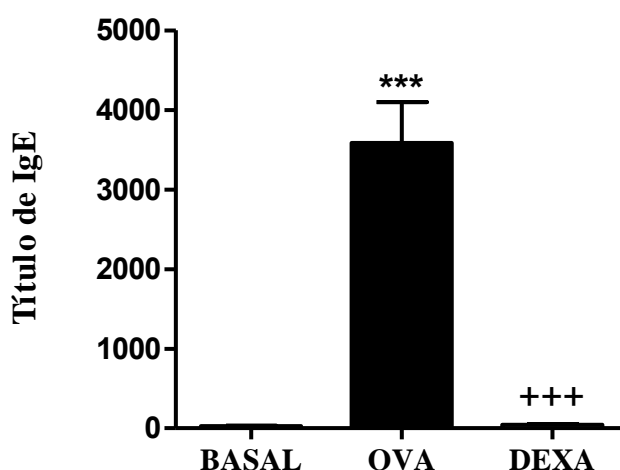


Gráfico 4. Efeito da sensibilização com OVA e tratamento com dexametasona na produção de IgE – OVA específica nos animais com rinite alérgica. O título de IgE – OVA específica foi determinado pela técnica de anafilaxia cutânea passiva (PCA). O título da IgE é definido como a maior diluição do soro capaz de promover o desenvolvimento de um halo azulado mensurável no dorso de ratas wistar (vide 3.6 do Material e Métodos). Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média onde os valores para *** $p < 0,0001$ quando comparados ao grupo Basal e, +++ $p < 0,0001$ quando comparados ao grupo OVA foram estatisticamente significantes. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.

4.5. Efeito da sensibilização por ovalbumina e do tratamento com dexametasona na produção de citocinas características do processo alérgico.

A produção das citocinas do tipo 2 (IL-4, IL-13), no processo inflamatório alérgico, é essencial para o desenvolvimento da rinite alérgica. As citocinas, acima citadas, são produzidas por várias células entre elas os LT CD4 tipo Th2. Entretanto, a imunomodulação do processo alérgico pode ocorrer e o INF-gama é o marcado apropriado para verificar tal

processo. Os processos alérgicos resistentes às drogas como dexametasona têm sido caracterizados com a produção da IL-17. Os gráficos 4A, 4B, 4C e 4D demonstram que não foi possível identificar diferenças significativas nas produções das citocinas, acima mencionadas, entre o grupo basal e o grupo OVA bem como entre os animais do grupo tratado com a dexametasona e o grupo OVA.

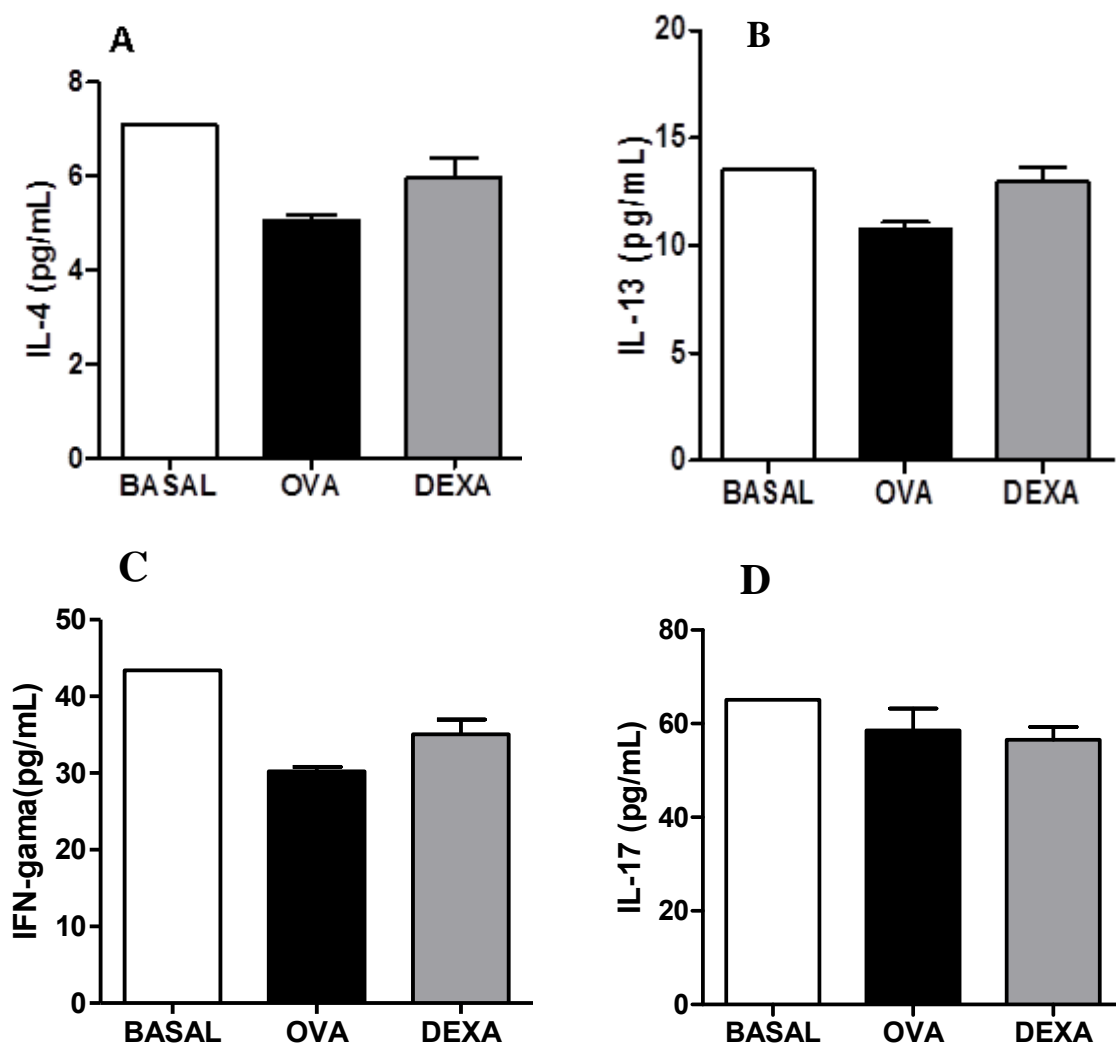


Gráfico 5. Efeito da sensibilização com ovalbumina (OVA) e tratamento com dexametasona (DEXA) na produção de citocinas IL-4 (A), IL-13 (B), IFN- γ (C) e IL-17 (D) na cavidade nasal dos camundongos BALB/c. Os camundongos foram tratados com a dexametasona na dose de 2 mg/kg (DEXA) após 1 h, receberam por instilação nasal a OVA. A dosagem foi realizada pelo método de ELISA-sanduiche obedecendo ao protocolo determinado pelo fabricante. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média onde os valores para *** $p < 0,0001$ quando comparados ao grupo basal e, +++ $p < 0,0001$ quando comparados ao grupo OVA foram considerados significativos. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Tukey.

4.6. Efeito da sensibilização por ovalbumina e do tratamento com a dexametasona na análise histológica da migração celular para o tecido da cavidade nasal

A análise histológica permitiu avaliar, pela coloração com H&E a morfologia dos vasos sanguíneos, das membranas, a infiltração de células e parênquima nasal. O tecido nasal dos animais do grupo basal (Figura 6A) não apresentou alterações morfológicas citadas acima. Entretanto o tecido nasal dos animais do grupo OVA (Figura 6B) apresentou-se com alterações patológicas, com exacerbada infiltração de células nas regiões perivasculares e subepitelial que caracterizam o processo inflamatório-alérgico, em comparação com o grupo basal (Figura 6A). O tecido nasal dos animais do grupo DEXA (Figura 6C) mostrou diminuir a infiltração de células em comparação com os tecidos nasais do grupo OVA evidenciando seu potente efeito anti-inflamatório e antialérgico.

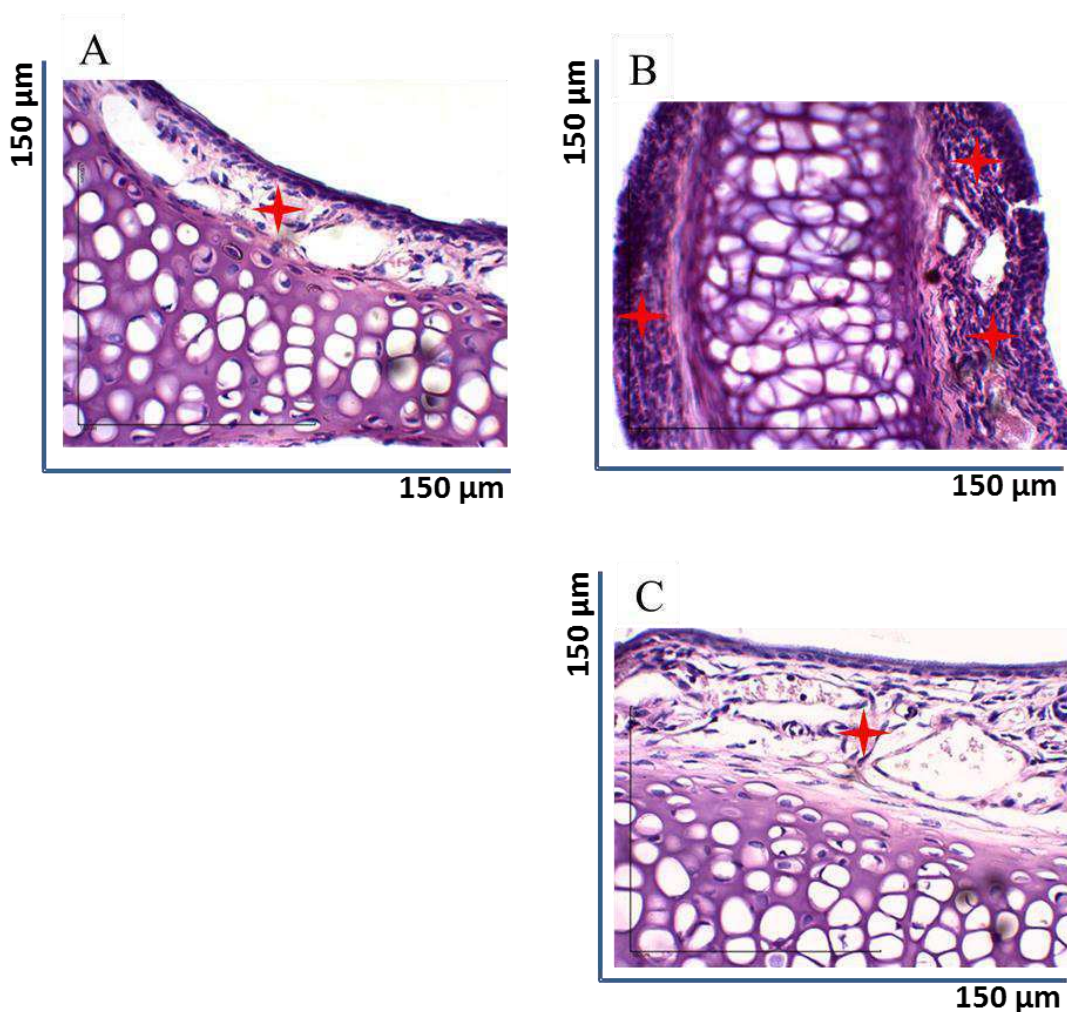


Figura 3. Fotomicrografias representante de tecido da cavidade nasal dos animais dos diferentes grupos experimentais de rinite alérgica. Os tecidos corados com H&E são representativos de quatro seções nasais de cada grupo de animais: BASAL (A); OVA (B) e DEXA (C). A análise histológica foi realizada em microscopia óptica no aumento de 400x.

4.7. Efeito da sensibilização por ovalbumina e do tratamento com dexametasona na análise histológica da produção de mucopolissacarídeo e metaplasia de células caliciformes no tecido da cavidade nasal.

A coloração pela reação do ácido periódico com o Reativo de Schiff permitiu visualizar o tecido nasal dos animais do grupo basal demonstrando que não houve alterações significativas quanto a produção de muco (Figura 7A). Entretanto, o tecido nasal dos animais do grupo OVA apresentou elevada produção de mucopolissacarídeos pelas glândulas exócrinas unicelulares (células caliciformes) no epitélio em comparação com o grupo basal (Figura 7B). O tratamento com a dexametasona na dose de 2 mg/kg foi capaz de regular a produção de muco quando comparado com o tecido nasal dos animais do grupo OVA (Figura 7C).

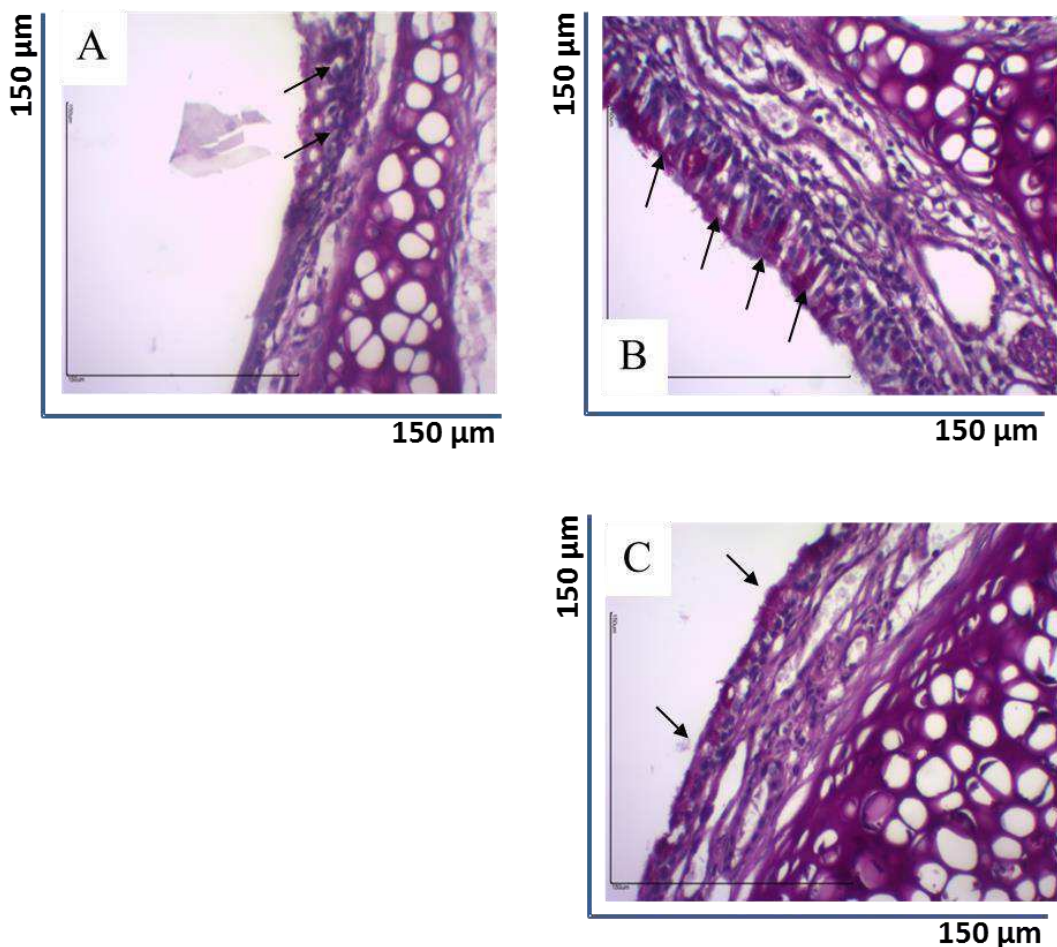


Figura 4. Fotomicrografia representante de tecido da cavidade nasal dos diferentes grupos experimentais de rinite alérgica. Os tecidos corados com PAS são representativos de quatro seções nasais de cada grupo de animais: BASAL (A); OVA (B) e DEXA (C). A análise histológica foi realizada em microscopia óptica no aumento de 400x.

4.8. Efeito da sensibilização por ovalbumina e do tratamento com dexametasona na análise histológica da presença de mastócitos na cavidade nasal.

As amostras submetidas a coloração com AT permitiram a visualização dos mastócitos presentes na cavidade nasal dos animais, seja na mucosa, seja nos tecidos adjacentes. A figura 8A representa o tecido nasal de animais do grupo basal e podemos observar que o número de mastócitos no tecido é inferior ao observado na figura 8B que representa o tecido nasal de animais do grupo OVA. Como pode ser observado nessa figura o número de mastócitos aumentou de forma significativa. Os mastócitos são células efetoras da alergia. O tratamento com dexametasona na dose de 2 mg/kg (Figura C) foi capaz de diminuir a presença dos mastócitos na cavidade nasal quando comparada com aos animais do grupo OVA (Figura B).

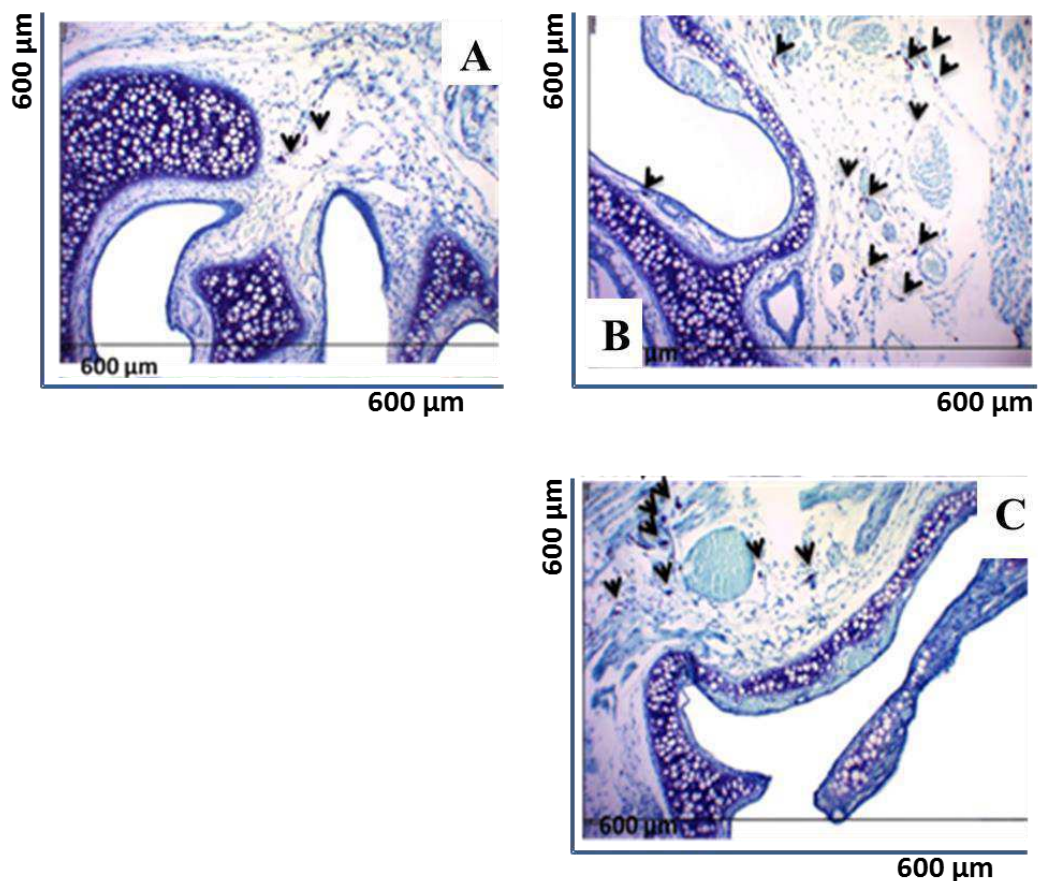


Figura 5. Fotomicrografia de tecido representante da cavidade nasal no modelo de rinite alérgica. Os tecidos foram corados com AT (Azul de Toluidina) para marcação de mastócitos visualizados no microscópio óptico no aumento de 100x. A análise histológica foi feita em quatro seções nasais de cada grupo de animais: BASAL (A); OVA (B) e DEXA (C).

4.9. Efeito da sensibilização por ovalbumina e do tratamento com dexametasona na análise histológica representada em score.

A avaliação estatística das lâminas histológicas demonstrou o aumento dos parâmetros inflamatórios alérgicos nos animais estimulados com a sensibilização com ovalbumina. Os resultados para infiltração celular e produção de muco pelas células caliciformes corroborou com a análise visual por demonstrar o aumento significativo nos animais sensibilizados com OVA e a diminuição nos animais tratados com a DEXA. Em relação a presença de mastócitos é possível visualizar uma diminuição do números dessas células nos animais tratados com a DEXA, porém não foi significativamente diferente do grupo OVA.

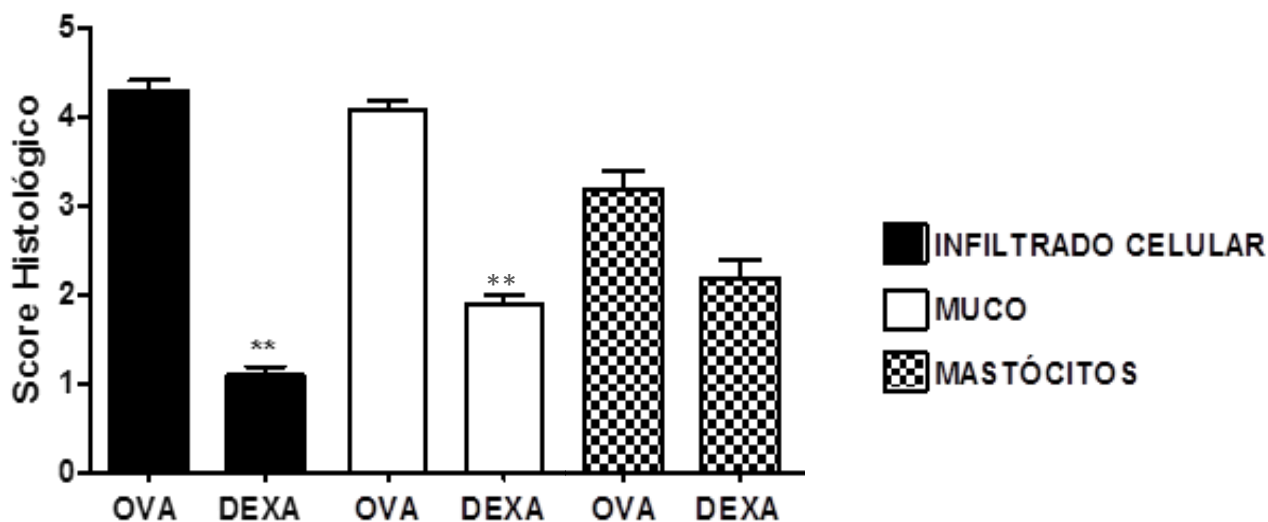


Gráfico 6. Efeito da sensibilização com ovalbumina (OVA) e tratamento com dexametasona (DEXA) na avaliação histológica da cavidade nasal dos camundongos BALB/c. Os camundongos foram tratados com a dexametasona na dose de 2 mg/kg (DEXA) após 1 h, receberam por instilação nasal a OVA. Foram analisadas quatro seções de cada grupo. A atribuição de pontuação para as análises histológicas foi realizada seguindo a Tabela 11. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média onde os valores para $**p < 0,001$ quando comparados ao grupo OVA foram considerados significativos. Os resultados foram tratados com o teste de Kruskal-Wallis.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o modelo experimental de rinite alérgica crônica foi implementado no Laboratório de Imunofarmacologia da UFPB-Campus I/João Pessoa-PB para ser utilizado nas análises pré-clínicas de moléculas oriundas de plantas medicinais e/ou sintéticas. O protocolo experimental foi desenvolvido utilizando a ovalbumina (OVA), como alérgeno, em camundongos fêmeas da linhagem BALB/c descrita ser hipersensível a essa molécula, em um período de 56 dias envolvendo sensibilizações, desafios e tratamentos dos animais promovendo um processo inflamatório crônico caracterizado pela migração celular majoritariamente de eosinófilos, produção de IgE-OVA específica, metaplasia das células caliciformes e migração de mastócitos na cavidade nasal.

A análise do trabalho demonstrou a reversão do processo inflamatório alérgico experimental da rinite com a droga padrão dexametasona através da melhora dos parâmetros tais como: migração celular, produção de imunoglobulinas antígeno-específica e alterações histológicas inflamatório-alérgicas pelo seu mecanismo de imunossupressão descrito.

O protocolo experimental, com adaptações, se mostrou eficaz, pois a sensibilização com OVA induziu a migração de células inflamatórias para a cavidade nasal, sendo elas eosinófilos, neutrófilos e macrófagos. O número de linfócitos nos animais sensibilizados com OVA não diferiu estatisticamente do grupo salina, pois o número de linfócitos no grupo OVA não apresentou-se elevado já que a análise é relativa, ou seja, percentual, e pela elevação do número de eosinófilos e neutrófilos os linfócitos são reduzidos. Apesar disso, o perfil desses linfócitos é totalmente diferente dos linfócitos dos animais salina, possivelmente nos animais do grupo OVA os linfócitos presentes são característicos do perfil alérgico. Essa diferenciação poderia ser realizada utilizando citometria de fluxo pela marcação do tipo celular que se deseja observar. Aoishi e colaboradores (2015), demonstraram a infiltração eosinofílica na cavidade nasal de animais sensibilizados com OVA em um modelo de 63 dias. Sakine e colaboradores (2016), demonstraram recentemente o aumento do número de eosinófilos no NALF de camundongos BALB/c sensibilizados com OVA em modelo experimental de rinite alérgica e a redução dessas células ocorreu quando os animais foram tratados com a substância em teste. No presente estudo a dexametasona reduziu significativamente a migração dessas células no NALF dos animais com rinite alérgica crônica. Jung e colaboradores (2013) demonstraram o aumento das células inflamatórias, principalmente

eosinófilos no NALF dos animais do grupo OVA quando comparados ao grupo controle e a redução dessas células nos animais tratados com dexametasona corroborando com os nossos resultados.

Os animais sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram no soro altos títulos de IgE-OVA específica comprovando que a sensibilização com a OVA ativou células T e B, bem como o aumento do número de linfócitos no fluido lavado nasal. O tratamento dos animais com a droga padrão dexametasona inibiu a produção da IgE como esperado pelo seu mecanismo de ação imunossupressor. Hong Li e colaboradores (2015) demonstraram, em modelo de rinite alérgica com animais BALB/c sensibilizados com OVA, o aumento significativo dos níveis séricos de IgE-OVA específica. Yi-Zheng e colaboradores (2011) e Ning e colaboradores (2015) demonstraram em modelos de rinite alérgica (OVA como alérgeno) níveis elevados de IgE-OVA específica. Em adição, Yi-Zheng e colaboradores (2011) mostraram redução dos níveis de IgE com o uso do glicocorticoide budesonida como droga padrão.

O modelo de rinite alérgica experimental induzida por OVA demonstra claramente a elevação dos níveis de IgE total e OVA-específica (YONG-SEOK et. al., 2015), caracterizando e estabelecendo, portanto, o modelo de rinite alérgica experimental. Portanto, podemos inferir que o modelo experimental de rinite alérgica implantado no laboratório de Imunofarmacologia está de acordo com os descritos na literatura.

Os níveis aumentados de citocinas do perfil Th2 incluindo a IL-4 e IL-13 estão presentes nos processos alérgicos, entretanto no modelo experimental desenvolvido no nosso laboratório não foi possível observar diferenças na concentração de IL-4 entre os grupos basal, OVA e DEXA bem como não foi possível visualizar diferenças nos níveis das citocinas do perfil Th1 - IFN- γ (imunomodulatória) ou IL-17 entre os grupos sugerindo que o tempo que se realizou a coleta das amostras não seja o ideal ou ainda o método ELISA-sanduíche não seja sensível ao ponto de detectar diferenças nesse tipo de material (NALF). Outra possível explicação para esses resultados seria pelo fato de se tratar de uma cavidade aberta (cavidade nasal), ou seja, muco, células, citocinas e outros mediadores são expelidos pela narina do animal. Talvez pelo método da reação de cadeia de polimerase (PCR) fosse possível detectar as citocinas em análise. Jiaying e colaboradores (2015) também não conseguiu

diferenciar os níveis de citocinas no NALF de animais de todos os grupos com rinite alérgica através do método de ELISA. Yi-Zheng e colaboradores (2011) utilizando modelo de rinite alérgica, possivelmente por não conseguir analisar citocinas no NALF, analisou a presença das citocinas no lavado broncoalveolar (BAL). Semelhante estudo foi observado Yong-Seok e col. (2015) possivelmente pelo mesmo motivo, avaliou a produção de citocinas entre animais do grupo OVA e controle em amostras de soro dos animais.

No processo alérgico da rinite, a inflamação da camada submucosa do tecido das vias aéreas superiores está associada à migração de células para esta região. (BOUSQUET et. al., 2008). O modelo de rinite desenvolvido no nosso laboratório induziu o recrutamento celular para o tecido da cavidade nasal visualizado pelo corte histológico do tecido nasal e corado com H&E com aglomerados na região subepitelial e perivascular, observando também processos de vasodilatação e decréscimo dessas células quando os animais foram tratados com dexametasona. Jung e colaboradores (2013) demonstraram essas alterações histológicas pela coloração do tecido com H&E nos animais do grupo OVA e uma redução dessas alterações quando tratados com o glicocorticoide dexametasona. Urmila e colaboradores (2015) também demonstraram a infiltração de células na cavidade nasal em amostras coradas com H&E de animais com rinite alérgica desenvolvida com OVA e a redução dessa infiltração nos animais tratados com a droga padrão utilizada xilometazolina.

No processo alérgico da rinite observa-se metaplasia das células caliciformes na região do epitélio respiratório. A análise histológica de cortes do tecido da cavidade nasal e corada com a coloração de PAS permitiu a visualização do aumento do número dessas células bem como de sua ativação pela presença de muco na sua superfície e no interior. Aoishi e colaboradores (2015), em modelo de rinite alérgica (OVA como alérgeno) de 63 dias demonstraram a metaplasia das células caliciformes. Sakine e colaboradores (2016), demonstraram a metaplasia dessas células em análise histológica e imunohistoquímica em modelo de rinite alérgica utilizando também a OVA nas sensibilizações e nos desafios intranasais, corroborando com os nossos resultados.

O tratamento com a dexametasona reduziu visualmente a produção de muco e a ativação das células caliciformes no epitélio do trato nasal. Mehmet e colaboradores (2016) demonstraram o aumento do número de células caliciformes em animais com rinite alérgica e a

redução dessas células no grupo de animais tratado com o glicocorticoide fuarato de mometasona, corroborando com os resultados obtidos nesse estudo.

Interações complexas entre mastócitos, células epiteliais, células dendríticas, células T, células linfoides inatas, eosinófilos e basófilos com liberação de quimiocinas e citocinas regulam os sintomas clínicos na rinite alérgica podendo persistir por horas após a exposição ao alérgeno. Sendo assim, as drogas que estabilizam ou diminuem o número de mastócitos no tecido nasal melhoraram os sintomas de rinite. Na análise tecidual pela coloração de Azul de Toluidina, específica para marcação de mastócitos, demonstrou que nos animais do grupo OVA houve um aumento de mastócitos quando comparado ao grupo basal e, o tratamento com dexametasona reduziu o número dessas células demonstrando sua atividade antialérgica. Alguns estudos têm demonstrado (Sakine et. al., 2016) por análise histológica, o aumento de mastócitos na cavidade nasal no modelo de rinite alérgica desenvolvida por OVA pela coloração com May-Grunwald e Yong-Seok e colaboradores (2016) mostraram a inibição da reação inflamatória mediada por mastócitos no processo de rinite alérgica pela fosforilação de proteínas citoplasmáticas evidenciando sua participação efetiva. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos no nosso estudo.

A análise das lâminas para mensuração do score histológico possibilitou estatisticamente visualizar as diferenças existentes entre os animais de cada grupo. Pelo score confirmou-se a análise visual pois migração de células, metaplasia de células caliciformes no tecido respiratório da cavidade nasal, produção de muco por estas células e a presença de mastócitos apresentaram resultados semelhantes ao observado.

Portanto, frente ao exposto acima podemos inferir que o modelo experimental de rinite alérgica crônica foi devidamente implementado no Laboratório de Imunofarmacologia de UFPB, podendo ser utilizado para testar moléculas de diversas origens com potencial antialérgico.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse estudo concluímos que o modelo de rinite alérgica crônica foi adaptado e implementado no Laboratório de Imunofarmacologia do Centro de Ciências da Saúde da UFPB e que permitirá estudos com o fim de testar moléculas naturais ou sintéticas que possam interferir na:

1. Migração de células inflamatórias para a cavidade nasal;
2. Produção de citocinas, mediadores inflamatórios, na cavidade nasal;
3. Produção de IgE-alérgeno específica;

Além dos parâmetros acima mencionados, o modelo experimental desenvolvido permitirá:

4. Avaliação histológica do tecido nasal quanto à migração de células;
5. Avaliação histológica do tecido nasal quanto à metaplasia de células caliciformes e produção/secreção de muco;
6. Avaliação do tecido nasal na quantificação de mastócitos.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

AOISHI, K. et al. Treatment of allergic rhinitis with intranasal infusion of botulinum toxin type A in mice, **Life Sciences**, v. 10, p. 1016, 2015.

BAHEKAR, P.C. et al. Validation of guinea pig model of allergic rhinitis by oral and topical drugs. **Inter Immunopharmacol**, v. 8, p. 1540-51, 2008.

BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **An Rev Immunol**, v.18, p. 767–811, 2000.

BANFIELD, G. et al. CC chemokine receptor 4 (CCR4) in human allergen-induced late nasal responses. **Allergy**, v. 65, p. 1126–33, 2010.

BENDIKS M, KOPP MV. The relationship between advances in understanding the microbiome and the maturing hygiene hypothesis. **Curr Aller Asthma Rep**, v. 13, p. 487–94. 2013.

BONAY, M. et al. Changes in airway inflammation following nasal allergic challenge in patients with seasonal rhinitis. **Allergy** v. 61, p. 111-118, 2006.

BOUSQUET, J. et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA). **Allergy**, v. 63, (suppl 86) p. 160-168, 2008.

BOUSQUET, J.; VAN, C. P.; KHALTAEV, N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. **J Aller Clin Immunol**, v. 108, (suppl) p. 147-334, 2001.

BRAUNSTAHL, G.J. et al. Nasal allergen provocation induces adhesion molecule expression and tissue eosinophilia in upper and lower airways. **J Aller Clin Immunol**, v. 107, p. 469-476, 2001.

BRAUNSTAHL, G.J. et al. Segmental bronchoprovocation in allergic rhinitis patients affects mast cell and basophil numbers in nasal and bronchial mucosa. **Am J Respir Crit Care Med** v. 164, p.858-865, 2001.

BROWN, J.L. et al. Lower airways inflammation in allergic rhinitis: a comparison with asthmatics and normal controls. **Clin Exp Allergy** v. 37, p. 688-695, 2007.

CIPRANDI, G. et al. Quality of life in allergic rhinitis: relationship with clinical, immunological, and functional aspects. **Clin Exp Allergy** v. 37, p. 1528-1535, 2007.

COOK-MILLS, J. M. **Eosinophil-endothelial interactions during inflammation**. IN: *Eosinophils in Health and Disease*, eds. J Lee, HF Rosenberg, Elsevier/Academic Press: London; Waltham, MA. p.140–141, 2013.

CORREN J. The connection between allergic rhinitis and bronchial asthma. **Curr Opin Pulm Med** v. 13, p. 13-21, 2007.

DYKEWICZ, M. S. Rhinitis and sinusitis. **Clinical Immunology**. 3rd ed. London: Mosby Elsevier, p. 626-39, 2008.

FOKKENS, W. et al. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps. **Rhinol Suppl**, v. 20, p. 135–136, 2007.

GUERRA, S. et al. RA: Rhinitis as an independent risk factor for adult-onset asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 109, p. 419-425, 2002.

HALPERN, M. T. et al. Allergic rhinitis: a potential cause of increased asthma medication use, costs, and morbidity. **J Asthma**, v. 41, p.117-126, 2004.

HE, R. et al. Exaggerated IL-17 response to epicutaneous sensitization mediates airway inflammation in the absence of IL-4 and IL-13. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 4, p. 761–770, 2009.

HE, S. et al. Self-amplification mechanisms of mast cell activation: a new look in allergy. **Curr Mol Med**, v. 12, p. 1329–1339, 2012.

HELLINGS, P. W. et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. **The American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p. 42–50, 2003.

HELLINGS, P.W.; FOKKENS W. J. Allergic rhinitis and its impact on otorhinolaryngology. **Allergy**, v: 61, p. 656–664, 2006.

HONG-TAO, L. et al. Intranasal administration of CpG oligodeoxynucleotides reduces lower airway inflammation in a murine model of combined allergic rhinitis and asthma syndrome. **Inter Immunophar**, v. 28, p. 390–398, 2015.

JIAXING, X. et al. Intratracheal Challenge Murine Model of Asthma: Can Bronchial Inflammation Affect the Nose? **Allergy Asthma Immunol Res.** v. 7, p. 76-82, January 2015.

JUNG, J. H. et al. The effect of Korean red ginseng on allergic inflammation in a murine model of allergic rhinitis. **Journal of Ginseng Research.** v. 37, p. 167-175, 2013.

LAMBRECHT, B. N. Allergen uptake and presentation by dendritic cells. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 1, p. 51–59, 2001.

LINNEBERG, A. et al. The link between allergic rhinitis and allergic asthma: a prospective population based study. The Copenhagen Allergy Study. **Allergy**, v. 57, p. 1048–1052, 2002.

LOHIA, S.; SCHLOSSER, R. J.; SOLER, Z. M. Impact of intranasal corticosteroids on asthma outcomes in allergic rhinitis: a meta-analysis. **Allergy** v. 68 p. 569–579, 2013.

LOPEZ, S. et al. Immediate and dual response to nasal challenge with *Dermatophagoides pteronyssinus* in local allergic rhinitis. **Clin Exp Allergy**, v. 40, p. 1007-1014, 2010.

MANDHANE, S. N.; SHAH, J. H.; THENNATI R. Allergic rhinitis: An uptade disease, present treatments and future prospects. **Inter Immunopharmacol**, p.1646-1662, 2011.

MATSUNO, O. et al. Links between bronchial asthma and allergic rhinitis in the Oita Prefecture, Japan. **J Asthma**, v. 43, p. 165–172, 2006.

MEHMET, Y. et al. Effects of propolis in an experimental rat model of allergic rhinitis. **American Journal of Otolaryngology – head and neck medicine and surgery**, v. 37, p. 287 – 293, 2016.

NEWCOMB, D. C. et al. Human TH17 cells express a functional IL-13 receptor and IL-13 attenuates IL-17A production, **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 4, p. 1006–1013, 2011.

NING, Z. et al. Anti-inflammatory effect of curcumin on mast cell-mediated allergic responses in ovalbumin-induced allergic rhinitis mouse. **Cellular Immunology** v. 298, p. 88–95, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. **Doenças respiratórias crônicas**. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=581> Acessado em 06 de maio de 2017.

PASSALI, G. C. et al. The natural course of allergic rhinitis: a 32-year follow-up study, **Acta Otolaryngol**, v. 133, p. 1188–1195, 2013.

PRENNER, B. M.; SCHENKEL E. Allergic rhinitis: treatment based on patient profiles, **Am. J. Med.** v.119, p. 230–237, 2006.

SAKINE, I.S. et al. Intraperitoneal mesenchymal stem cell administration ameliorates allergic rhinitis in the murine model. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 10, 4166–4169, 2016.

SIN, B.; TOGIAS, A. Pathophysiology of allergic and nonallergic rhinitis. **Proc Am Thorac Soc.** v.8, p. 106-114, 2011.

SKONER, D. P. Allergic rhinitis. definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 108, p. 2–8, 2001.

SOUSA, L. P. et al. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappa B-independent manner. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 5, p. 895-904, 2010.

SRIVASTAVA, A. Antioxidant and anti-inflammatory activities of polyphenolics from Southeastern U.S. range blackberry cultivars. **J Agric Food Chem** v. 58, p. 6102–6109, 2010.

STELMACH, R.; CUKIER, A. Treating allergic rhinitis and asthma: different sides of the same fence, *Expert Opin. Pharmacother.* v. 7, p. 1245–1249, 2006.

URMILA, M. et al. Anti-allergic Effect of Intranasal Administration of Type-A Procyanidin Polyphenols Based Standardized Extract of Cinnamon Bark in Ovalbumin Sensitized BALB/c Mice. **Phyto Res Phytother**, v. 29, p. 423–433, 2015.

VON-MUTIUS, E.; MARTINEZ F. D. Natural history, development, and prevention of allergic disease in childhood. IN: ADKINSON, N. F. Jr. et al. eds. **Middleton's allergy: principles and practice** (4th ed). St Louis: Mosby, p. 1169–74, 2003.

WANG, M. et al. Immunomodulatory effects of IL-23 and IL-17 in a mouse model of allergic rhinitis. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 43, p.956–966, 2013.

WANG, Y.-H.; Y.-J. LIU. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 6, p. 697–702, 2008.

WILLEMS, L.I.; IJZERMAN, A. P. Small molecule antagonists for chemokine CCR3 receptors. **Med Res Rev**, v. 30, p. 778–817, 2009.

YI-ZHENG. et al. Alleviation of murine allergic rhinitis by C19, a C-terminal peptide of chemokine-like factor 1 (CKLF1). **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 2188–2193, 2011.

YOKO, H. et al. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. **J Allergy Clin Immunol**, v.130, p. 184-194, 2012.

YONG-SEOK, I.M. et al. Antiallergic effect of Gami-hyunggyeyeongyotang on ovalbumin-induced allergic rhinitis in mouse and human mast cells. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 79, p. 185-194, 2016.

ZUHDI, A. M. et al. Muc-5/5ac mucin messenger RNA and protein expression is a marker of goblet cell metaplasia in murine airways. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 22, p. 253–260, 2000.

ANEXO 1



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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO PROJETO DE PESQUISA

I. DADOS DO PROJETO		
1. Título do projeto: Avaliação da Atividade Antialérgica da Warifteína, um Alcaloide de <i>Cissampelos sympodioides</i> Eichl (Menispermaceae)		
2. Pesquisador responsável: Márcia Regina Piuvezam		
3. Centro (Sigla): CCS	4. Departamento: Departamento de Fisiologia e Patologia	
5. Número de protocolo: 114/2015	6. Data de submissão: 02/07/2015	7. Data da relatoria: 09/03/2016
8. Apresentação do projeto: O presente projeto propõe avaliar o tratamento intranasal com o alcaloide warifteína extraído de <i>Cissampelos sympodioides</i> Eichl. (Menispermaceae) em modelo experimental de rinite alérgica, considerando a associação à asma. Para desenvolvimento do modelo de rinite alérgica camundongos fêmeas da linhagem isogênica BALB/c serão distribuídos nos grupos basal, ovalbumina (ova), dexametasona e warifteína. Estes, serão sensibilizados e desafiados com ova e tratados com a substância em um protocolo de 57 dias. Ao final do protocolo, será coletado o fluido do lavado da nasofaringe e avaliado o efeito do tratamento intranasal com o alcaloide warifteína, em modelo experimental de rinite, analisando a produção de citocinas dos perfis Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), indutoras da rinite alérgica e pelos cortes histológicos da cabeça dos animais, avaliar o perfil celular presente no nariz dos animais com rinite e tratados com a warifteína.		
9. Substituição de metodologia:	<input type="checkbox"/> SIM	<input checked="" type="checkbox"/> NÃO
9.1 Comentários: (Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia para redução do número de animais)		
II. INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS		
1. Espécie: Camundongos BALB/c fêmeas	2. Número amostral: 32 animais	
3. Justificativa do número amostral:	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Inadequado
3.1 Comentários: A justificativa do tamanho amostral atende as recomendações desta Comissão.		
4. Acomodação e manutenção:	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Inadequado
4.1 Comentários:		

--

5. Manipulação dos animais: Adequado Inadequado

4.1 Comentários:

--

6. Analgesia dos animais (se aplicável): Adequado Inadequado

6.1 Comentários:

Não se aplica.

7. Anestesia dos animais (se aplicável): Adequado Inadequado

7.1 Comentários:

Vide 8. Eutanásia dos animais.

8. Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequado Inadequado

8.1 Comentários:

A eutanásia será realizada por sobredosagem de solução anestésica xilasina (8,33%) e cetamina (25%), sendo assim 30 mg/kg de xilasina e 300 mg/kg de cetamina aplicada via intramuscular nos animais.

III. SITUAÇÃO DO PROJETO

Aprovado *Com pendência* *Negado*

1. Considerações sobre o parecer:

Com base nestes argumentos, o parecer é favorável à aprovação e execução do projeto, salvo melhor juízo deste conselho.

João Pessoa, 09 de março de 2016.
Comissão de Ética no Uso de Animais.