



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**RAFAEL FERNANDES DE QUEIROZ NETO**



*Cissampelos sympodialis* Eichler. Cavalcanti, et al., 2013

**Atividade anti-inflamatória e antioxidante do extrato da *Cissampelos sympodialis*  
na inflamação pulmonar induzida pela fumaça do cigarro em camundongos**

**MOSSORÓ–RN**

**2019**

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma prática milenar derivada das experiências do cotidiano que tiveram alguma aplicabilidade no tratamento das mais diversas moléstias em homens ou animais e foram assim transmitidas por meio das gerações, perpetuando-se na cultura popular (ARAÚJO; LEMOS, 2015).

Algumas dessas plantas despertam interesse progressivo por parte da comunidade científica devido às atividades biológicas presentes em seus compostos orgânicos. Neles são encontradas substâncias com potencial terapêutico, tais como flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos, lignanas, entre outros, objetos de incessantes estudos, com o intuito de comprovar suas ações farmacológicas, sugerindo aplicações em situações que comprometem o estado de saúde (ARAÚJO et al., 2008).

É o caso da *Cissampelos sympodialis* Eichl., uma espécie da flora brasileira, pertencente a família Menispermaceae, que é encontrada desde o Ceará até o norte de Minas Gerais, ocorrendo principalmente em áreas de clima semi-árido. Essa espécie é conhecida popularmente como “milona”, “jarrinha”, “orelha-de-onça” e “abuteira”, cujas folhas e raízes são empregadas na medicina popular no tratamento de doenças do aparelho respiratório, reumatismo e artrites (PORTO, 2008; CAVALCANTI et al., 2013; DE SALES et al., 2018).

Estudos imunofarmacológicos com folhas de *C. sympodialis* demonstraram ação imunomoduladora, anti-inflamatória e broncodilatadora, com destaque para a warifteína, um dos principais alcaloides presentes no extrato da *C. sympodialis*, que atua inibindo a produção de leucotrienos, fosfodiesterase e estimulando a interleucina-10, demonstrando seu grande potencial para o tratamento da asma, uma doença inflamatória crônica caracterizada por obstrução ao fluxo aéreo, geralmente reversível com o uso de broncodilatadores (VIEIRA et al., 2018), característica essa que a diferencia clinicamente da Doença Pulmonar Obstrutiva crônica (DPOC).

Causada principalmente pelo tabagismo a fisiopatologia da DPOC se caracteriza pela redução do fluxo de ar através das vias aéreas, não totalmente reversível, com alargamento anormal e significativo dos espaços alveolares, remodelamento do parênquima pulmonar e uma resposta inflamatória crônica com períodos de exacerbação. Essas alterações manifestam-se clinicamente por meio de dispneia, tosse crônica, produção de muco e sibilância (GOLD, 2017; MOURATO, 2018)

A DPOC é um grave problema de saúde pública, e uma das principais causas de morbimortalidade no mundo, o que torna relevante a investigação da atividade biológica do extrato da *Cissampelos sympodialis* na inflamação pulmonar induzida pela fumaça do cigarro, como potencial agente farmacológico que no futuro, pode apresentar uma aplicabilidade profilática e/ou terapêutica no tratamento de doenças do sistema respiratório associadas ao tabagismo como o enfisema pulmonar.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Caracterizar a atividade anti-inflamatória e antioxidante do extrato da *Cissampelos sympodialis* na inflamação pulmonar induzida por fumaça de cigarro em camundongos.

### **2.2. Objetivos específicos**

Investigar a eficácia do extrato da *Cissampelos sympodialis* no remodelamento pulmonar em pulmões de camundongos expostos à fumaça do cigarro;

Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato da *Cissampelos sympodialis* na inflamação pulmonar aguda e crônica induzida pela exposição à fumaça do cigarro;

Caracterizar a atividade do extrato da *Cissampelos sympodialis* como modulador do desequilíbrio redox em pulmões de camundongos expostos a fumaça do cigarro;

Identificar as possíveis vias através das quais o extrato da *Cissampelos sympodialis* apresenta seus efeitos biológicos na inflamação pulmonar aguda e crônica induzidas pela fumaça do cigarro.

## **3. HIPOTHESES**

**3.1.** O extrato da *Cissampelos sympodialis* possui atividade anti-inflamatória sobre pulmões de camundongos inflamados pela exposição à fumaça do cigarro.

**3.2.** O extrato da *Cissampelos sympodialis* possui atividade antioxidante sobre os pulmões de camundongos inflamados pela exposição à fumaça do cigarro.

**3.3.** O extrato da *Cissampelos sympodialis* é capaz de modular a sinalização para o remodelamento pulmonar a inflamação causada pela fumaça do cigarro

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Material vegetal**

Para execução deste projeto, folhas de *C. sympodialis* serão coletadas no horto do Centro de Biotecnologia Universidade Federal da Paraíba. A identificação botânica será feita por comparação com a exsicata da espécie depositado no Herbário Prof Dr. Lauro Pires Xavier, em Agra 1456. As folhas serão secas a 40 ° C, em estufa e, posteriormente, pulverizadas em um moinho de facas e armazenadas protegidas da luz e da umidade.

### **4.2. Preparo do extrato**

Cinquenta gramas de folhas em pó serão extraídas com 100 ml de etanol: água (80:20, v / v) por maceração por 24 h. O extrato será filtrado e o filtrado será evaporado até à secura sob pressão reduzida a 40° C com um evaporador rotativo.

### **4.3. Animais**

Serão utilizados 84 camundongos machos (C57BL/6) com oito semanas de idade, pesando entre 18-22 g. Os animais terão livre acesso à água e comida em um ambiente controlado entre 18 e 22°C e um ciclo claro/escuro (12/12 h). A pesquisa será conduzida conforme as normas de bem-estar animal vigentes de acordo com o CONCEA e com as normas de experimentação animal Lei 11.794, sendo previamente aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEUA).

### **4.4. Desenho experimental**

Os procedimentos relativos à obtenção dos extratos vegetais serão realizados na Universidade Federal da Paraíba, enquanto aqueles relativos à avaliação do papel da *Cissampelos sympodialis* na inflamação pulmonar aguda (IPA) e na inflamação pulmonar crônica (enfisema pulmonar) induzidas por fumaça de cigarro, serão desenvolvidos no Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LABMORFA) do Departamento de Ciências Animais.

#### 4.4.1. Estudo I - Modelo agudo

Para avaliar o efeito da *Cissampelos sympodialis* sobre a IPA, os animais serão expostos a uma mistura de ar-fumaça de doze cigarros/dia durante cinco dias, e tratados com *Cissampelos sympodialis* via inalatória nas doses de 1, 10 ou 100mg/mL (VIEIRA, 2013).

Para tanto, os animais serão agrupados da seguinte forma (n = 7 por grupo):

- a) **Controle:** exposto apenas ao ar ambiente e tratado com solução salina durante 5 dias;
- b) **IFC:** exposto à fumaça do cigarro durante 5 dias e tratado com solução salina durante 5 dias;
- c) **IFC+1mg:** exposto à fumaça do cigarro durante 5 dias e tratado com *Cissampelos sympodialis* (1 mg/mL) durante 5 dias;
- d) **IFC+10mg:** exposto à fumaça do cigarro durante 5 dias e tratado com *Cissampelos sympodialis* (10 mg/mL) durante 5 dias;
- e) **IFC+100mg:** exposto à fumaça do cigarro durante 5 dias e tratado com *Cissampelos sympodialis* (100 mg/mL) durante 5 dias;

#### 4.4.2. Estudo II - Modelo crônico – Enfisema pulmonar

Com o objetivo de avaliar o efeito da *Cissampelos sympodialis* no enfisema pulmonar, inicialmente os animais serão expostos a uma mistura de ar-fumaça de doze cigarros/dia durante 60 dias e somente após o estabelecimento do enfisema pulmonar os animais serão tratados com *Cissampelos sympodialis* via inalatória nas doses de 10 ou 100mg/mL durante 60 dias adicionais.

Para este fim, os animais serão divididos cinco grupos (n = 7 por grupo):

- a) **Controle:** exposto apenas ao ar ambiente e tratado com solução salina durante 60 dias;
- b) **IFCR:** exposto à fumaça do cigarro durante 60 dias e tratado com solução salina;

- c) **IFCR+C. *Sympodialis***: exposto à fumaça do cigarro durante 60 dias e tratado com *Cissampelos sympodialis* (dose a ser estabelecida pelo estudo agudo - IPA) durante 60 dias;
- d) **IFCR+Dexa**: exposto à fumaça do cigarro durante 60 dias e tratado com *dexametasona* (0,1 mg/mL) via inalatória durante 60 dias;
- e) **IFCR+NAC (600 mg/mL)**: exposto à fumaça do cigarro durante 60 dias e tratado com *N-acetilcisteína* (600 mg/mL) via oral durante 60 dias;

Para avaliar a permanência do enfisema mesmo após 120 dias, dois grupos em paralelo serão avaliados quanto aos aspectos morfológicos e estereológicos.

- f) **IFCR 60d**: exposto à fumaça do cigarro durante 60 dias e sacrificado no dia 61, sem passar por nenhuma forma de tratamento;
- g) **IFCR 120d**: exposto à fumaça do cigarro durante 60 dias e sacrificado no dia 121, sem passar por nenhuma forma de tratamento;

#### **4.5. Exposição à fumaça do cigarro**

A exposição à fumaça de cigarro seguirá o modelo descrito por Valença e Porto (2008). Para tanto, os animais serão colocados em uma câmara de inalação (40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura), que será alocada dentro de uma capela de exaustão.

Os grupos serão expostos à mistura de ar-fumaça de cigarros comerciais (10 mg alcatrão, 0,8 mg de nicotina e 10 mg de monóxido de carbono) (MENEGALI et al., 2009; VALENÇA E PORTO, 2008) por dia de acordo com os protocolos descritos nos itens 4.4.1 e 4.4.2.

Para isso, um cigarro será encaixado na ponta de uma seringa plástica de 60 mL e, após aceso o êmbolo da seringa será puxado e a fumaça será tragada para o interior da seringa estabelecendo o jato de fumaça. Na sequência a fumaça contida na seringa será injetada na câmara de inalação através de um orifício. Os animais serão mantidos nessa condição de ar de fumo durante seis minutos/cigarro. Após esse tempo, a câmara será aberta pela remoção da sua parte superior e a fumaça será expelida pela ação de um exaustor. Assim permanecerão por um período de um minuto.

Esta exposição à fumaça do cigarro será repetida três vezes/dia, sendo quatro cigarros no período da manhã, quatro cigarros ao meio-dia e quatro cigarros ao fim da tarde, totalizando doze cigarros/dia para cada grupo, com no máximo 72 minutos de exposição à fumaça por dia.

#### **4.6. Tratamento**

O tratamento dos animais com *Cissampelos sympodialis* será baseado no modelo descrito por Diógenes-Bastos e colaboradores (2011). No Estudo I, imediatamente após a última exposição diária à fumaça de cigarro os animais receberão o tratamento com *Cissampelos sympodialis* nas doses de 1, 10 ou 100mg/mL durante 15 minutos por via inalatória. Os grupos Controle e IFC receberão tratamento apenas com solução salina e veículo pelo mesmo tempo e mesma via de administração.

Visando obter efeito reparador da *Cissampelos sympodialis* no enfisema pulmonar, no Estudo II o tratamento acontecerá após o estabelecimento do enfisema (após 60 dias de exposição à fumaça de cigarro). Assim, o tratamento será iniciado no dia 61 e seguirá até o dia 120, perfazendo 60 dias de tratamento com *Cissampelos sympodialis* com a dose que apresentar melhores respostas no estudo agudo. Nessa fase os grupos Controle e IFCR também receberão tratamento apenas com solução salina e veículo pelo mesmo tempo e mesma via de administração. Já o controle positivo será feito com um grupo que receberá dexametasona e outro que receberá N-acetil-cisteína.

Para inalação da *Cissampelos sympodialis* em ambos os estudos, os animais serão alocados no interior de uma caixa de acrílico (20 cm de comprimento, 20 cm de largura e 15 cm de altura) com uma tampa removível na parte superior. Esta caixa, em duas laterais apresenta dois orifícios, um para acoplar o nebulizador (Respira Max® inalador ultra-sônico NS, Industria de Aparelhos Médicos, Ltda, SP) e o outro para servir de escape para minimizar a reinalação do ar expirado.

#### **4.7. Procedimentos experimentais**

Vinte e quatro horas após o tempo estabelecido para cada modelo (5 dias para o *Estudo I* e 120 dias para o *Estudo II*) os animais serão eutanasiados para coleta do material biológico.

##### **a) Lavado broncoalveolar**

No *Estudo I*, imediatamente após a eutanásia os animais terão a traqueia canulada em sua porção ventral e os pulmões serão lavados com 1,5 mL de solução salina (3 x 0,5 mL) para coleta do lavado broncoalveolar (BAL). Ao final desse procedimento para todos os grupos os microtubos de centrifugação contendo o BAL serão centrifugados a 600 g durante 10 minutos e o sobrenadante será coletado e

estocado em freezer (-20 °C) para posterior análise, enquanto a fração celular sedimentada será utilizada para dosagem de ROS.

#### **b) Processamento tecidual**

Após a coleta do BAL ou não (quando se trata do Estudo II) o tórax do animal será aberto por uma incisão ventral no sentido crânio-caudal e o ventrículo cardíaco direito será perfundido com solução salina visando à remoção de sangue contido nos vasos sanguíneos pulmonares. Na sequência, o pulmão esquerdo será removido e imediatamente transferido para solução fixadora de paraformaldeído 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 a 4 °C, por até 72 horas para análise histológica.

O pulmão direito será removido e armazenado em tubos devidamente identificados e mantidos em gelo picado e em seguida será homogeneizado (homogeneizador Nova técnica mod. NT136, Piracicaba, Brasil). Para tal, parte desse fragmento será colocado em um *potter* contendo 1mL de tampão fosfato de potássio (KPE) com pH ajustado para 7,5. O homogeneizado será então centrifugado a 600 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante será coletado e o volume final ajustado para 1,5 mL com tampão KPE. Tais amostras serão armazenadas em freezer – 80° C para realização dos ensaios bioquímicos posteriormente. O outro fragmento do pulmão direito seguirá os mesmos padrões de homogeneização, entretanto, homogeneizado com tampão de lise (PBS com coquetel de inibidor de protease livre de EDTA (Sigma-Aldrich S8830) e Triton X100) para utilização nos ensaios de ELISA ou Western blotting.

#### **c) Dosagem de proteína**

A dosagem de proteína será realizada em amostras de homogeneizados pulmonares e no lavado broncoalveolar através do Método de Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras serão adicionadas à placa de 96 poços em duplicata e homogeneizada em solução de Bradford para reagir com o corante azul de brilhante de coomassie presente nessa solução e que se ligam às proteínas em meio ácido, gerando coloração azulada. Para dosagem serão utilizados 10 µL de BAL de cada amostra e 1µL de homogeneizado. Em paralelo, uma curva padrão será produzida, utilizando diferentes concentrações de albumina tendo como ponto mais concentrado 1 mg/mL. Essa reação gera coloração azulada e será lida em leitor de Elisa a 595 nm. Os valores serão expressos em mg/mL.

**d) Espécies reativas de oxigênio (ROS)**

Será utilizado um método que se baseia na reação do sal azul de nitro-tetrazólio (NBT) com as espécies reativas de oxigênio. Após centrifugação do BAL e coletado o sobrenadante, as células do centrifugado serão ressuspensas em 100 µL de KPE e em seguida será adicionado 100 µL de NBT (0,1%) antes de incubá-las a 37 °C em estufa por 1h. Em seguida o pellet será lavado por 3 vezes em PBS e ressuspendido em solução de KOH 2M contendo DMSO (dimetilsulfóxido). Essa mistura será plaqueada em duplicata na placa de 96 poços e lida em leitor de Elisa a 630 nm. O resultado será expresso em µg de formazan/volume de células.

**e) Atividade da superóxido dismutase (SOD)**

Homogeneizados pulmonares serão utilizados nesse ensaio baseando-se na metodologia descrita por Bannister e Calabrese (1987). A atividade enzimática da SOD será estimada por inibição da auto-oxidação da adrenalina. Para tanto, 1,2 ou 4µL da amostra serão homogeneizadas em tampão glicina (50 mM, pH 10,2) e em seguida 2 µL de catalase (2,4 mg/mL) serão adicionados seguido de 4 µL de epinefrina (2 µM; com HCl), perfazendo um volume final para 200 µL. A mistura será homogeneizada em placa de 96 poços em monocata e lida a 480 nm durante 180 segundos com intervalos de 10 segundos. A atividade enzimática da SOD será expressa em U/mg de proteína.

**f) Atividade da catalase (CAT)**

A atividade da catalase será mensurada em homogeneizados pulmonares segundo o método descrito por Aebi (1984). Para realização do ensaio, 3µL de amostra do homogeneizado pulmonar será adicionado a placa de 96 poços de baixa absorvância em monocata. Em seguida serão adicionados 97 µL de um Mix (tampão fosfato 0,1 M e pH 7,3 com peróxido de hidrogênio 30%) e homogeneizados. A mistura será imediatamente lida a 240 nm durante 60 segundos com intervalo de 30 segundos. A atividade enzimática da CAT será expressa em U/mg de proteína.

**g) Atividade mieloperoxidase (MPO)**

A atividade da MPO também será mensurada em homogeneizado pulmonar. Para tanto, 100 µL da amostra será centrifugada com 900 µL de hexadeciltrimetilamonio bromídrico (HTAB) 0,5% a 11.000 g por 15 minutos. Em seguida, 75 µL do sobrenadante será incubado com 5µL de 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina

(TMB) 20 mM durante 5 minutos a 37 °C. Posteriormente, essa mistura será incubada com 50 µL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30% por 10 minutos também a 37 °C, seguido de adição de 125 µL de acetato de sódio (NaOAc) 0,5 M, pH 5,0. Então, o produto da reação será lido em leitor de Elisa a 630 nm. Os níveis de MPO serão expressos em U/mg de proteína.

#### **h) Atividade da glutathiona reduzida (GSH)**

Níveis de glutathiona reduzida (GSH) serão dosados pela sua reação com o ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenoico) (DTNB), na qual a taxa de produção de TNB é proporcional à concentração inicial de GSH na amostra.

Para essa análise alíquotas de homogeneizado pulmonar imediatamente após serem homogeneizadas em KPE serão tratadas com ácido sulfassalicílico na proporção de 1:1 e centrifugadas a 2.000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, 10 µL do sobrenadante serão homogeneizados com 75 µL de tampão fosfato de potássio, seguido da adição de 6µL de DTNB, 6 µL de glutathiona redutase e 6 µL de nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato (NADPH), em placa de 96 poços. Essa mistura terá imediata leitura da absorbância que será mensurada a 412 nm durante 120 segundos com intervalos de 30 segundos.

#### **i) Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Esse ensaio avalia o dano oxidativo através da geração de malondialdeído (MDA) usando o método descrito por Draper e colaboradores (1990). Homogeneizados pulmonares serão desproteinizados pela adição de 200 µL de ácido tricloracético 10% por amostra e centrifugado a 2.200 g durante 10 minutos. Em seguida, 200 µL do sobrenadante serão homogeneizados com 200 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%.

A mistura será aquecida durante 10 minutos a 100°C e em seguida resfriada em temperatura ambiente por 15 minutos. Após resfriadas, as amostras serão plaqueadas em placas de 96 poços em duplicata. Uma curva padrão será confeccionada utilizando TMP (0,625 a 100 µM) como padrão. O resultado da reação gera uma solução de cor rósea e lida a 532 nm em leitor de Elisa. O resultado será expresso em nMol/mg de proteína.

#### **j) Dosagem de citocinas**

A dosagem de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, KC e TGF- $\beta$ 1 será realizada pelo método de ELISA utilizando o BAL ou o homogeneizado pulmonar. O ensaio seguirá instruções

do fabricante (PeproTech, Rocky Hill, New Jersey, USA). As placas serão pré-tratadas com adição do anticorpo de captura (100 µl) diluído em PBS e deixadas em temperatura ambiente “*overnight*”. No dia seguinte, após três lavagens com tampão de lavagem (PBS+tween 20 0,05%) será realizado o bloqueio pela adição de 100 µl de PBS + BSA (albumina sérica bovina) 1% por 1h. Em seguida, mais três lavagens serão realizadas e então 100 µl de cada amostra de BAL ou homogeneizado pulmonar serão adicionadas aos poços em duplicata e assim permanecerão por 2 horas. Em seguida, mais três lavagens serão realizadas e então adicionado o anticorpo de detecção (100 µl) por mais 2h. Após esse tempo, três lavagens serão realizadas e será adicionado a avidina peroxidase (Sigma Aldrich, 1 mg/mL) a qual ficará incubada por 30 minutos, seguido de três lavagens. Após essa etapa o-fenilenodiaminadihidroclorato (OPD) será diluído em tampão citrato (1:9) e adicionado 100 µl por poço. Após a adição do OPD se aguarda até que a reação ocorra e uma cor amarelada seja observada nos poços. Após aproximadamente 30 minutos a reação será parada pela adição de 100 µl de ácido sulfúrico (1N). Uma curva padrão com a proteína investigada será realizada com sete pontos de concentrações diferentes. Após a reação enzimática ser interrompida a placa será lida a 690 nm em leitor de microplacas. Os valores serão expressos em pg/mL ou em pg/mg de proteína.

#### **k) Western blot**

Para análise da expressão de proteínas específicas, alíquotas de homogeneizado pulmonar serão desnaturadas em tampão de amostra (50 mM Tris-HCl pH 6.8, SDS (1%), 2-mercaptoetanol (5%), glicerol (10%) e bromofenol azul (0,001%) e aquecidas a 100°C por 5 minutos.

As amostras contendo 50 µg de proteínas totais serão submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e as proteínas separadas serão transferidas para membrana de PVDF através de eletrotransferência. Marcadores rainbow passarão pelo mesmo procedimento com a finalidade de identificação dos respectivos pesos moleculares das proteínas em estudo. Após a transferência, as membranas serão bloqueadas com albumina sérica bovina (BSA) 5% diluída em TBS por 1h, seguida da incubação com o anticorpo primário anti-MMP-12 (rabbit policlonal, Santa Cruz, 1:200), MMP-9 (rabbit policlonal, Santa Cruz, 1:200), anti-elastina, anti-elastase neutrofílica (goat policlonal, Santa Cruz, 1:200), anti-TIMP-1 (rabbit policlonal, Santa Cruz, 1:200), anti-NF-κB p65 (rabbit policlonal, Santa Cruz, 1:200) e anti-Nrf2 (rabbit policlonal,

Santa Cruz, 1:200) “*overnight*”. Em seguida, após sucessivas lavagens da membrana com TBS-Tween 1% (TBS-T) as membranas serão incubadas por 1 h com o anticorpo secundário anti-goat (Santa Cruz, 1:2000) ou anti-rabbit (Santa Cruz, 1:1000). Em seguida lavagens sucessivas serão realizadas novamente e então as membranas serão tratadas com ECL (Santa Cruz - Biotechnology). Para a detecção do substrato quimiluminescente, o sistema de capturas de imagens ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) será utilizado. As bandas serão analisadas por densitometria utilizando o software de imagens Image J (National Institutes of Health) e os resultados serão expressos em unidade arbitrária (u.a). A equalização será realizada pela  $\beta$ -actina de cada amostra.

#### **l) Morfologia e morfometria**

Após a remoção do sangue dos pulmões pela perfusão cardíaca e remoção dos pulmões da cavidade torácica, o pulmão esquerdo será removido e armazenado em solução fixadora de paraformaldeído 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 a 4 °C, por até 72 horas. Em seguida, os fragmentos serão processados segundo a técnica histológica para inclusão em parafina. Cortes histológicos com 5 $\mu$ m de espessura serão corados com hematoxilina-eosina (HeE) (LILLIE E FULMER, 1976) ou Picrossírius (JUNQUEIRA et al., 1979).

Já para a técnica de coloração com Picrossírius, após o banho em água destilada, as lâminas serão imersas em solução de hematoxilina (hematoxilina 1g, iodato de sódio 0,2g, alúmen de amônia 50g, ácido cítrico 1g e hidrato de cloral 50g), seguidas de banho em água destilada. Posteriormente, será adicionado em HCl 0,01N por 2 minutos e em seguida na solução de Picrossírius por 1h. Após esse procedimento de desidratação em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 95% e 100%). Após essa etapa as lâminas serão imersas em dois banhos seguidos de xileno e em seguida montadas para posterior análise.

#### **m) Morfometria e estereologia**

A quantificação do enfisema pulmonar será realizada através da morfometria dos espaços aéreos e determinada através da medida do diâmetro alveolar médio (Lm), em micrômetros, em dez fotomicrografias aleatórias capturadas por microscópio de luz com a objetiva de 40x (WEIBEL, 1963).



bibliográfica												
Análise de dados	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Redação da tese	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>Cronograma de Atividades</b>	<b>Ano 2023</b>											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x					
Redação da tese	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Submissão de Artigo							x	x	x	x		
Defesa												x

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105,p, 121-26, 1984.

ARAÚJO, J. L.; LEMOS, J. R. Estudo etnobotânico sobre plantas medicinais na comunidade de Curral Velho, Luís Correia, Piauí, Brasil. **Revista Biotemas**, v. 28, n. 2, p. 125–136, 2015. <http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2015v28n2p125>.

ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 72–80, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.032>.

BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods of Biochemical Analysis**, v.32, p. 279-312, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.

CAVALCANTI, A. C.; MELO, I. C. A. R.; MEDEIROS, A. F. D.; NEVES, M. V. M.; PEREIRA, A. N.; OLIVEIRA, E. J. Studies with *Cissampelos sympodialis*: the search towards the scientific validation of a traditional Brazilian medicine used for the treatment of asthma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 527-541, 2013.

DE SALES, I. R. P.; FORMIGA, R. D. O.; MACHADO, F. D. F.; NASCIMENTO, R. F.; PESSOA, M. M. B.; BARROS, M. E. F. X.; ... e Júnior, R. F. D. A. Cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory mechanism related to antiulcer activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl. in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 222, p. 190-200, 2018.

DIÓGENES-BASTOS, V. P.; GOMES, A. S.; LIMA, F. J.B., BRITO, T. S.; SOARES, P. M. G.; PINHO, J. P. M.; SILVA, C. S.; SANTOS, A. A.; SOUZA, M. H. L. P.; MAGALHÃES, P. J. C. Inhaled 1,8-cineole reduces inflammatory parameters in airways of ovalbumin-challenge guinea pigs. **Basic e Clinical Pharmacology e Toxicology**, v. 108, p. 34-9, 2011.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. **Methods in enzymology**, v.186, p. 421-431, 1990.

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: 2017 report [Internet]. c2017 [citado 2018 jun 11]. Disponível em: <https://goldcopd.org/gold-2017-global-strategy-diagnosismanagement-prevention-copd/>

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining pluspolarization microscopy: a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, p. 447-55, 1979.

LILLIE, R. D.; FULLMER, H. M. **Histopathologic Technic and Practical Histochemistry**. McGraw-Hill, 1976

MENEGALI, B. T.; NESI, R. T.; SOUZA, P. S.; SILVA, L, A.; SILVEIRA, P.C.; VALENÇA, S. S.; PINHO, R. A. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. **Pulmonary Pharmacology e Therapeutics**. v. 22, p. 567-73, 2009.

MOURATO, C.; BUDZAK, K.; ARAÚJO, P.; BARROS, R. Importância das diferenças na resposta ao broncodilatador entre a asma e a DPOC. *Salutis Scientia*, v.10, n.1, p. 23-31, 2018.

PORTO, N. M.; BASÍLIO, I. J. L. D.; AGRA, M. F. Pharmacobotanical study of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl.,(Menispermaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 102-107, 2008.

RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C., ABD EL-SALAM, M.; BASTOS, J. K. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 253-268, 2018.

SILVA, C. G.; MARINHO, M. G. V.; LUCENA, M. F. A.; COSTA, J. G. M. Ethnobotanical survey of medicinal plants in the caatinga area in the community of sítionazaré, milagres, ceará, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 133-142, 2015.

VALENÇA, S. S.; PORTO, L. C. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**.v.34, p. 787-95, 2008.

VIEIRA, G. C.; DE LIMA, J. F.; DE FIGUEIREDO, R. C.; MASCARENHAS, S. R.; BEZERRA-SANTOS, C. R., PIUVEZAM, M. R. Inhaled *Cissampelos sympodialis* Down-Regulates Airway Allergic Reaction by Reducing Lung CD3+ T Cells. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 6, p. 916-925, 2013.

VIEIRA, G. C.; GADELHA, F. A.; PEREIRA, R. F.; FERREIRA, L. K.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BOZZA, P. T.; PIUVEZAM, M. R. Warifteine, an alkaloid of *Cissampelos sympodialis*, modulates allergic profile in a chronic allergic rhinitis model. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 1, p. 50-56, 2018.

WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 12, p. 131-37, 1963.