



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TERAPÊUTICA DO MELXI[®] EM
MODELO ANIMAL DE DOENÇA INFLAMATÓRIA DO TRATO
RESPIRATÓRIO**

HUMBERTO GONÇALVES BERTÃO

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

**Co-Orientadoras: Prof^a Dr^a Maria Elizabeth Cavalcante Chaves
Prof^a Dr^a Maria do Carmo Barros Pimentel**

Recife, 2007

HUMBERTO GONÇALVES BERTÃO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TERAPÊUTICA DO MELXI® EM
MODELO ANIMAL DE DOENÇA INFLAMATÓRIA DO TRATO
RESPIRATÓRIO**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de mestre em
Bioquímica pela Universidade Federal
de Pernambuco.

Aprovado por: _____

Data: ____/____/____

Recife, 2007

Bertão, Humberto Gonçalves.

Avaliação da atividade terapêutica do Melxi® em modelo animal de doença inflamatória do trato respiratório / Humberto Gonçalves Bertão. – Recife: O Autor, 2007.

71 folhas : il., fig. Dissertação (mestrado) – Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco. CCB, 2007.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Bromelina. 2. Proteômica. 3. Eletroforese Bidimensional. 4. Sistema Respiratório 5. Melxi® I. Título.

577.1 CDU (2.ed.)

UFPE

572 CDD (22.ed.)

CCB – 2007-070

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TERAPÊUTICA DO MELXI® EM
MODELO ANIMAL DE DOENÇA INFLAMATÓRIA DO TRATO
RESPIRATÓRIO**

Humberto Gonçalves Bertão
e-mail: humbertobertao@yahoo.com.br

Presidente: Prof. Dr^o. José Luiz de Lima Filho

Titular interno: Prof. Dr^o. Gandhi Rádis Baptista

Titular interno: Prof. Dr^o. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Titular externo: Profa. Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Suplente interno: Profa. Dr^a. Maria da Paz Carvalho da Silva

Suplente externo: Prof. Dr^o. Mario Ribeiro de Melo Junior

Ata da defesa de dissertação do Mestrando **Humberto Gonçalves Bertão**, realizada em 28 de fevereiro de 2007, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 09:15 minutos do dia 28 de fevereiro de 2007, foi aberto, na Sala de Aulas do LIKA/UFPE, o ato de defesa de dissertação do mestrando **Humberto Gonçalves Bertão**, aluno do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos, o Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, na impossibilidade da presença da Coordenadora do Curso supra citado, Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, fez a apresentação do aluno, de seu orientador, ele próprio, de suas Co-Orientadoras, Profa. Dra. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves, e Profa. Dra. Maria do Carmo de Barros Pimentel, ambas do Depto. de Bioquímica/UFPE, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: José Luiz de Lima Filho, na qualidade de Presidente, Gandhi Rádís Baptista, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, os três do Depto. de Bioquímica, e Danyelly Bruneska Gondim Martins, da Universo-PE/Pesquisadora do Centro de Tecnologia do Nordeste e do LIKA/UFPE. Após as apresentações, o Sr. Presidente convidou o aluno para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Avaliação da atividade terapêutica do Melxi em modelo animal de doença inflamatória do trato respiratório**", e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato disporia de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas seria de 30 (trinta) minutos. O aluno procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 40 (quarenta) minutos. Após a apresentação do mestrando, o Sr. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, a Prof. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins, em seguida para o Prof. Dr. Gandhi Rádís Baptista, e finalmente para o Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, os quais agradeceram o convite, fizeram alguns comentários e sugestões. Ao final de suas respectivas arguições, os referidos professores deram-se por satisfeitos. Em seguida, o Sr. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar o candidato. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do LIKA/UFPE. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovado com Distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 28 de fevereiro de 2007.

Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, Sr. Presidente da Banca Examinadora
Danyelly Bruneska Gondim Martins, Co-Orientadora
Maria Elizabeth Cavalcante Chaves, Co-Orientadora
Maria do Carmo de Barros Pimentel, Co-Orientadora
José Luiz de Lima Filho, Presidente

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, ***Geraldo Gonçalves Bertão e Maria Laise Guedes Bertão*** ,
pessoas maravilhosas, que nunca mediram esforços para
deixar a herança mais importante em minha vida,
a Educação.

AGRADECIMENTOS

A deus por me guiar por toda essa caminhada e por me fazer forte diante de todos os obstáculos encontrados;

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) por apresentar excelentes instalações para o desenvolvimento da tese;

*Ao meu orientador **Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho**, por nunca duvidar da capacidade de seus orientados, e por sempre me acolher de braços abertos;*

*A **Profa. Dra. Maria Elizabeth Cavalcanti Chaves**, pela fundamental contribuição na confecção desse trabalho me orientando e transmitindo conhecimento e experiência profissional;*

*A **Profa. Dra. Maria do Carmo Barros Pimentel** pela orientação, ajuda e incentivo;*

Ao colaborador do projeto Aurelino Cândido pelo auxílio no desenvolvimento da tese, o meu sincero abraço;

Ao Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo Junior pela amizade, paciência, análise e interpretação dos resultados Histopatológicos, meus sinceros agradecimentos.

A Maria Helena Madruga Lima Ribeiro por participar, manusear e acompanhar os procedimentos dos animais no biotério;

A Carmelita Cavalcanti pelo apoio dado a tese no processamento do material para histopatologia;

A Rafael Padilha por acompanhar e manusear o espectroscópio de Massa: Maldi-Tof, dando-nos conhecimento para sua utilização.

Aos amigos do setor da Patologia Jorge Luiz de Araújo Filho, Luciano de Albuquerque Melo e Marcos Cezar Feitosa pelo auxílio na confecção das lâminas e digitalização das imagens.

As minhas irmãs Fernanda Simone Guedes e Gerise Guedes Bertão, pelo amor e companheirismo sempre doados a mim;

A minha namorada Adriana Karla Bahié Alves, companheira durante toda a realização desse trabalho, sempre incentivadora e carinhosa. E assim como toda a sua família.

AOS AMIGOS (AS):

*Pela amizade e conselhos sempre bem vindos durante todo meu caminhar acadêmico, em especial à **Adriana Andrade, Natália Lima Cavalcanti e Conceição Gomes** pela enorme contribuição para o desenvolvimento desse trabalho.*

A todos os colegas do setor de Bioquímica pelo auxílio e colaboração em todos os momentos que precisei.

AOS QUE FAZEM O LIKA:

Moisés Melo, Ilma Maria, Conceição Chimenes, Isabel Oliveira, Vera Santana, Cleide e Paulo Freitas – Vocês são de grande importância para que o ambiente de trabalho esteja sempre organizado, facilitando assim nosso labor no LIKA. Obrigado;

AO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA:

A todos os professores do Departamento que participaram do curso de atualização em Bioquímica e que compõem o programa de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco.

*A **Miron Oliveira, Djalma Santos e Neide Fernandes** pela grandiosa contribuição durante todo período do mestrado à frente da secretaria do curso.*

E a todos àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus verdadeiros agradecimentos.

RESUMO

O Melxi[®] é um fitoterápico confeccionado com o mel de abelha e o extrato de abacaxi (*Ananas comosus* L.). O mel apresenta ações anti-sépticas e bactericidas, sendo constituído de 78% de carboidratos, 1,5% de proteínas e 0,18% de sais minerais, além de 5,72% de vitaminas e outros elementos. O extrato bruto do abacaxi contém uma mistura complexa de proteinases, denominada de bromelina, além de outras enzimas e inibidores de proteases como também sacarose, frutose e glicose. A eficácia terapêutica da bromelina tem sido relatada em diversas publicações, sendo uma das mais importantes à ação mucolítica e fluidificante sobre secreções de vias aéreas. Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito do xarope Melxi[®] sobre o tecido pulmonar e do lavado broncoalveolar em modelo animal de doença inflamatória do trato respiratório. Ratos machos *Wistar* foram divididos em quatro grupos, sendo: Grupo I = Controle não sensibilizado; Grupo II = Controle sensibilizado; Grupo III = sensibilizado tratado com salina e Grupo IV = sensibilizado tratado com Melxi[®]. Os animais dos Grupos II, III e IV foram pré-sensibilizados com 2 injeções intraperitoneais (IP) de 200 µl de solução de ovoalbumina (OVA) a 1% (p/v) em intervalos de 10 dias, seguido de sensibilização com 4 aplicações intranasais de 50 µl da (OVA) obedecendo ao mesmo intervalo de tempo. Após a sensibilização o Grupo IV recebeu 2 ml do xarope Melxi[®], por gavagem orogástrica, 3 vezes ao dia, enquanto o Grupo III recebeu 2 ml de NaCl a 0,9% (p/v) nas mesmas condições, durante 7 dias. Todos os animais foram anestesiados com solução de pentobarbital. O pulmão e o lavado bronco-alveolar foram coletados e processados para eletroforese bidimensional (2D). Parte do pulmão foi removido e fixado em formalina a 10%, corados pela hematoxilina/eosina(HE), pelo alcian blue(AB) e pelo ácido periódico de Schiff(PAS), para análise histopatológica. Os tecidos pulmonares do Grupo IV corados pelo PAS apresentaram uma redução nos depósitos intracelulares de glicosaminoglicanos quando comparados com animais do Grupo II. As imagens obtidas dos géis de eletroforese 2-D foram analisadas pelo software 2D Plantinum da Amersham Biociences. Os perfis eletroforéticos das proteínas nos lavados bronco-alveolares dos diferentes grupos estudados demonstraram pequenas alterações, apenas a nível das proteínas de baixo peso molecular na região de pH alcalino da focalização isoeletrica (IEF). Enquanto nos tecidos pulmonares, os quatro grupos apresentaram-se bastante semelhantes. Os resultados obtidos sugerem que tenha havido uma diminuição na produção de muco pelas células do epitélio brônquico nos animais tratados pelo Melxi[®], entretanto, estas alterações não parecem ter influenciado o perfil protéico pulmonar dos animais tratados quando comparados com os controles.

Palavras-chave: 1.Bromelina 2. Proteômica 3. Eletroforese Bidimensional 4. Sistema Respiratório 5. Melxi[®]

ABSTRACT

Melxi[®] is a phytotherapeutic product made from bee honey and pineapple extract (*Ananas comosus* L.). Honey has anti-septic and bactericidal properties, and consists of 78% carbohydrates, 1.5% proteins and 0.18% mineral salts, besides 5.72% vitamins and other elements. The raw extract of pineapple contains a complex mixture of proteases, called bromelain, in addition to other enzymes and protease inhibitors, as well as saccharose, fructose and glucose. The therapeutic efficacy of bromelain has been described in various publications, one of the most important effects being its mucolytic and fluidifying action on airway secretions. The aim of this work was to study the effect of Melxi[®] syrup, a phytotherapeutic product, on lung tissue and broncoalveolar lavage samples in an animal model of inflammation of the respiratory tract. Male *Wistar* rats were divided into four groups: Group I = Control not sensitized; Group II = Control sensitized; Group III = sensitized and treated with saline; and Group IV = sensitized and treated with Melxi[®]. The animals in Groups II, III and IV were pre-sensitized with 2 intraperitoneal injections (IP) of 200 µl of 1%(w/v) ovalbumin (OVA) at intervals of 10 days, followed by sensitization with 4 intranasal applications of 50 µl of OVA solution according to the same time interval. After sensitization, Group IV received 2 ml of Melxi[®] syrup by orogastric gavage, 3 times a day, while Group III received 2 ml 0.9% (w/v) NaCl under the same conditions, for 7 days. All the animals were anesthetized with pentobarbital. The lungs and broncoalveolar lavage fluid were collected and processed for 2-dimensional (2D) electrophoresis. Part of the lung was removed and fixed in 10% formalin, stained with hematoxylin/eosin, alcian blue and periodic acid Schiff, for histopathological analysis. The lung tissue of Group IV stained with PAS showed reduced amounts of intracellular deposits of glycosaminoglycans when compared with animals in Group II. The images obtained from 2-D electrophoresis gels were analyzed using the 2D Platinum software from Amersham Biosciences. The electrophoretic profiles of the proteins in broncoalveolar specimens of the different groups studied demonstrated small alterations, only in the amounts of proteins of low molecular mass in the alkaline pH region after isoelectric focusing (IEF). Meanwhile, the lung tissue specimens of the four groups were very similar. The results obtained suggest that there was a diminution in mucus production by bronchial epithelium cells in animals treated with Melxi[®], but that these alterations did not appear to have influenced the lung protein profile of treated animals compared to controls.

Key-Words: 1. Bromelain 2. Proteomic 3. Two dimensional electrophoresis 4. Siste Respiratory 5. Melxi[®]

LISTA DE FIGURAS

Figuras da revisão da literatura

Figura 1. Representação esquemática das porções distais do parênquima pulmonar. Os brônquios respiratórios desembocam no ducto alveolar que abre-se em direção a diversos alvéolos. A geração de alvéolos permite a amplificação da área de troca gasosa nos pulmões. (fonte: www.nlm.nih.gov).

Figura 2. Esquema da estrutura de revestimento das vias aéreas e alvéolos.

Figura 3. Esquema comparativo entre brônquios normais e brônquios inflamados (bronquite). (fonte: www.nlm.nih.gov).

Figura 4. Representação esquemática de eletroforese bidimensional 2-D e proteômica.

Figuras do artigo

Figura 1. Eletroforese bidimensional (A) e gel analítico (B) de pulmão de rato sensibilizado com ovoalbumina (Grupo II-1a, 1b); sensibilizado com ovalbumina tratados com salina (Grupo III-2a, 2b); sensibilizado com ovalbumina tratados com 2 ml do xarope mel de abelha + abacaxi (Grupo IV-3a, 3b). Condições da eletroforese bidimensional: 1º dimensão (IEF) pH 3-10; 2º dimensão SDS-PAGE 10% corado com Comassie brilliant blue.

Figura 2. Eletroforese bidimensional (A) e gel analítico (B) do lavado bronco-alveolar de rato sensibilizado com ovoalbumina (Grupo II-1a, 1b); sensibilizado com ovalbumina tratados com salina (Grupo III-2a, 2b); sensibilizado com ovalbumina tratados com 2 ml do xarope mel de abelha + abacaxi (Grupo IV-3a, 3b). Condições da eletroforese bidimensional: 1º dimensão (IEF) pH 3-10; 2º dimensão SDS-PAGE 10% corado com Comassie brilliant blue.

Figura 3. Fotomicrografia de pulmão de ratos sem e com sensibilização pela ovalbumina. (a) Animais sem sensibilização, células do epitélio brônquico com depósitos intracelulares de glicosaminoglicanos (seta). Coloração PAS e Alcian Blue (400x); (b) Animais sensibilizados com ovalbumina mostrando o epitélio brônquico com uma redução nos depósitos intracelulares de glicosaminoglicanos (setas). Coloração PAS (magnificação 400x).

Figura 4 - Fotomicrografias de pulmão de rato sensibilizados com ovoalbuminae tratados com Melxi[®] exibindo uma redução dos depósitos intracelulares de glicosaminoglicanos pelas células do epitélio brônquico, acompanhado de um desgaste celular. Coloração PAS (magnificação 200x e 400x respectivamente).

LISTA DE ABREVIATURAS

iii

AB - Alcian blue

ADP - Adenosina difosfato

CHAPS – {3-[(3cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate}

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica

DTT - Dithiothreitol

EC - número sistemático

HE - Hematoxilina-Eosina

IN - Intranasal

kDa – Kilodalton (unidade de peso molecular)

LBA - Lavado broncoalveolar

mA - Miliampére

MALT - Sistema Imunológico Associado das Mucosas

MARCKS- Substrato da proteína cinase-C rico em alanina

mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro

MUC - Mucina

NaCl - Ácido clorídrico

OVA - Ovoalbumina

PAS - Ácido Periódico de Schiff (Periodic Acid Schiff)

pH - potencial hidrogeniônico

pI - ponto isoelétrico

SDS PAGE - Gel de poliacrilamida desnaturante

TCA - Ácido tricloroacético

TNF - Fator de necrose tumora

SUMÁRIO

iv

	Pág
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
1. REVISÃO DA LITERATURA	12
1.1 Sistema Respiratório	12
1.1.1 Visão Geral	12
1.1.2 Mecanismo de defesa das vias aéreas	15
1.1.3 Mecanismo de agressão	16
1.1.4 Ações de drogas sobre os pulmões	17
1.2 Bioquímica do muco	18
1.3 Mecanismo de ação dos agentes mucolíticos	19
1.4 Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>) - enzimas proteolíticas	21
1.5 Usos terapêuticos da bromelina	22
1.6 Mel	24
1.7 Proteômica: considerações gerais	26
2. JUSTIFICATIVAS	31
3. OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
5. ARTIGO	40
Introdução	41
Materiais e Métodos	43
Animais	43
Sensibilização dos animais com ovoalbumina	43
Tratamento com o xarope	43
Análise Histopatológica	44
Preparo das amostras para eletroforese bidimensional	44
Eletroforese Bidimensional	44
Visualização das proteínas e análise das Imagens	45
Resultados e Discussão	46
Referências bibliográficas	50
Anexos	53
6. CONCLUSÕES GERAIS	57
ANEXOS	58
1 - Aprovação do Comitê de ética	59
2- Trabalhos desenvolvidos durante o mestrado	60
3 - Normas e instruções para publicação do artigo	66

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Sistema Respiratório

1.1.1 Visão geral

O sistema respiratório pode ser subdividido numa porção condutora e em outra respiratória. A porção condutora é formada pela nasofaringe, laringe, traquéia, brônquios e bronquíolos enquanto a porção respiratória é formada pelos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e alvéolos (Junqueira & Carneiro, 2004).

Ele atua na interação entre os meios externo e interno do indivíduo, uma vez que ocorre troca gasosa entre o ar e o sangue. Em uma área de troca de aproximadamente 100 m² (indivíduo adulto), ocorre absorção de O₂ e sua ligação à hemoglobina, efetuando-se ainda a liberação da maior parte do gás carbônico (CO₂) produzido pelo organismo. Nesta área de troca são realizadas importantes reações fundamentais para o metabolismo de hormônios, como a conversão de angiotensina I a II, e a inativação de xenobióticos. Todos esses processos são possíveis graças a especialização celular e histoarquitetural do sistema respiratório, que propicia:

- A filtração do ar inspirado;
- A manutenção da estabilidade mecânica de centenas de milhões de alvéolos;
- O fluxo de fluidos e gases através da barreira alvéolo-capilar;
- Uma adequada distribuição de todo o débito cardíaco proveniente das câmaras cardíacas direitas ao longo do parênquima alveolar, de forma a permitir uma eficiente relação entre ventilação e perfusão.

A arquitetura das vias aéreas de condução é fundamental para suas funções de condicionamento do ar inspirado. A disposição de bifurcações em série, propiciada pelo padrão de divisões dicotômicas sucessivas, faz com que um número significativo das partículas inaladas e transportadas pelo fluxo inspiratório para o interior dos pulmões possa chocar-se com as paredes das vias aéreas e, conseqüentemente, ser retido antes de atingir o território de troca gasosa (Junqueira & Carneiro, 2004).

Uma vez que as vias aéreas estão em íntimo contato com o meio externo e sujeito a agressões do meio exterior, pressupõe-se que devam, possuir mecanismos de remoção de agentes agressores nelas retidos. A composição celular das vias aéreas possui um repertório suficientemente vasto para contribuir com a defesa pulmonar (Boers et al. 1999; Chaplin, 2003).

A traquéia se ramifica e origina os dois brônquios, que após um pequeno percurso entram no pulmão onde se dividem sucessivamente. Quando os brônquios alcançam uma pequena dimensão, a ponto de não se observar em corte, estes passam a ser considerados bronquíolos. A diminuição no calibre destes condutos também é acompanhada por uma transformação nas características histológicas, que a princípio são semelhantes a aquelas observadas na traquéia (Carroll et al., 1993).

A estrutura dos brônquios modifica-se progressivamente nos diferentes níveis do trato respiratório, sendo que as vias aéreas vão tornando-se cada vez mais delicadas à medida que se caminha para o interior dos pulmões. Esta adaptação progressiva visa permitir o processo de troca gasosa, diminuindo a interface que se interpõe entre o meio interno e o ar inspirado. Os bronquíolos respiratórios marcam a transição entre o compartimento de vias aéreas comprometido com o condicionamento do ar e o território de trocas gasosas. Antes de atingir o final desse sistema tubular (ductos alveolares e átrio alveolar), os bronquíolos respiratórios apresentam cerca de 2 a 3 divisões – bronquíolos respiratórios secundários e terciários, respectivamente (**figura 1**) (Roggen et al., 2006).

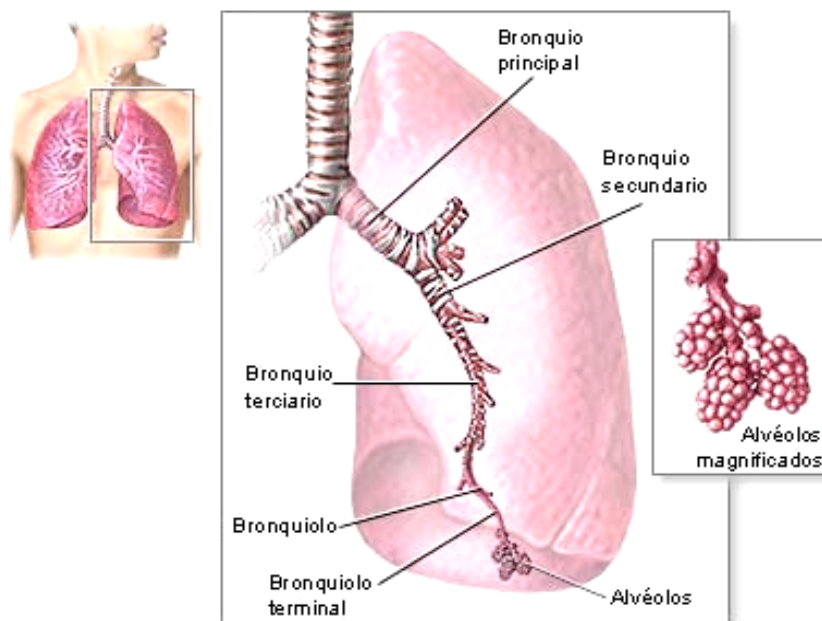


Figura 1. Representação esquemática das porções distais do parênquima pulmonar. Os brônquios respiratórios desembocam no ducto alveolar que se abre em direção a diversos alvéolos. A geração de alvéolos permite a amplificação da área de troca gasosa nos pulmões. (fonte: www.nlm.nih.gov).

O epitélio de revestimento das vias aéreas modifica-se ao longo dos seus diferentes segmentos. A figura 2 mostra um esquema representativo simplificado da estrutura celular das vias aéreas.

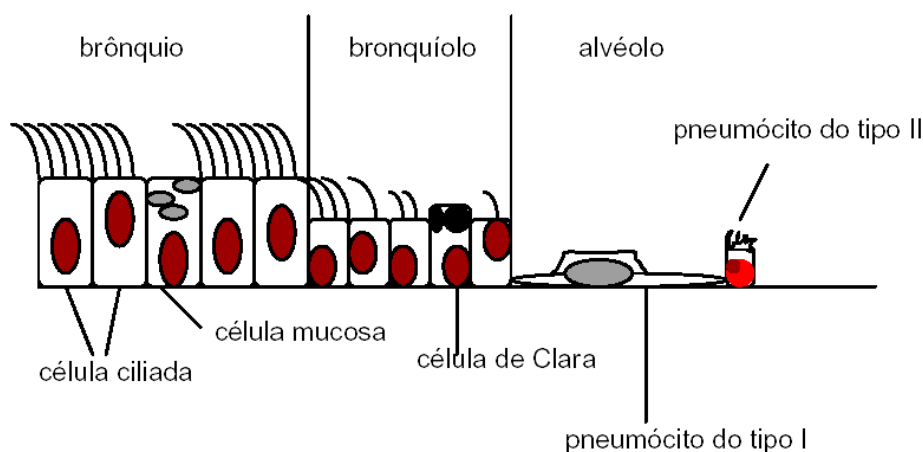


Figura 2. Esquema da estrutura de revestimento das vias aéreas e alvéolos.

Nos brônquios, o epitélio é pseudo-estratificado colunar ciliado, com células secretoras de muco. Nos bronquíolos, existe uma diminuição da espessura do epitélio e dos cílios, com menor número de cílios por célula, aparecendo ainda um tipo especial de célula secretora – a célula de Clara (Goblet Cell). Atribui-se a esta célula duas funções principais:

- A produção da substância surfactante dos bronquíolos;
- A inativação de xenobióticos, por meio de reações de oxidação dos mesmos (dependentes do citocromo P450).

Os alvéolos são revestidos por 2 tipos de células denominadas pneumócitos tipos I e II. Compete ao pneumócito I revestir a maior superfície alveolar com a menor espessura possível, sendo células de diferenciação terminal, ou seja, incapazes de se dividirem. Os pneumócitos II funcionam como as células de reserva do epitélio alveolar, além de possuir a função de produção do surfactante alveolar. A implicação disto é que, em condições de agressão ao epitélio alveolar, deve ocorrer uma transdiferenciação celular de pneumócitos II para I, com prejuízo da produção do surfactante e, conseqüentemente, risco de instabilidade mecânica dos alvéolos (Saldiva et al., 2000).

A presença de células ciliadas ao lado de células produtoras de muco deve-se à necessidade de um mecanismo de remoção das partículas inaladas e depositadas sobre as vias aéreas: o aparelho mucociliar.

Ao longo do seu trajeto, a árvore brônquica sofre um processo de segmentação, dicotomizando-se progressivamente, de forma a se constituir no sistema inicial de defesa ao reter o material particulado inalado – impactação inercial. Este mecanismo filtra grande parte das partículas inaladas com diâmetro entre 5 e 10 micrômetros. Para as partículas menores, os mecanismos mais importantes que podem concorrer para sua deposição são a sedimentação gravitacional e os movimentos denominados “brownianos” (Junqueira & Carneiro 2004).

1.1.2 Mecanismo de defesa das vias aéreas

O conjunto das células descritas anteriormente exerce uma ação coordenada de defesa das vias aéreas, os assim chamados mecanismos de defesa pulmonar. Dentre eles, os principais são:

- Tosse: reflexo mediado pela estimulação de receptores de irritação dispostos preferencialmente nas vias aéreas proximais;
- Broncoconstrição: secundária à estimulação das terminações nervosas presentes nas vias aéreas através de mecanismos reflexos vagais ou pela secreção de mediadores inflamatórios;
- Secreção de muco e outras substâncias citoprotetoras: como lisozima, lactoferrina e anti-oxidantes, produzidas pelas células secretoras existentes ao longo do trato respiratório;
- Transporte mucociliar: batimento ordenado do epitélio ciliar que propela as secreções respiratórias em direção à orofaringe;
- Resposta imunitária: ação do sistema linfóide associado às vias aéreas, análogo ao existente no sistema digestivo;
- Ativação de células inflamatórias: presentes na secreção que recobre as vias aéreas, provenientes do recrutamento local (diapedese transepitelial) ou trazidas do compartimento alveolar pelo transporte mucociliar.

Cada um desses mecanismos representa um sistema de defesa fisiológico, cuidadosamente selecionado ao longo da escala evolutiva e muito eficiente para, isolada ou conjuntamente, efetivar a manutenção da homeostasia dos pulmões (Saldiva et al., 2000).

A lógica do sistema é impedir o acesso de agentes patológicos externos ao microambiente alveolar, dada a grande interação deste último com o meio interno. A eficiência do modelo é grande, como demonstrado pelo fato de obter-se ar estéril, umidificado e aquecido após cinco ou seis gerações de vias aéreas. Como os primeiros alvéolos surgem, em média, após 16 gerações a partir da traquéia, pode-se caracterizar o sistema respiratório como possuidor de uma grande reserva funcional de defesa (Roggen et al., 2006).

No entanto, quando existem disfunções desses mecanismos ou, alternativamente, extrema solicitação dos mesmos por agentes agressores, formam-se condições para o desenvolvimento de doenças respiratórias (Upham, 2003).

1.1.3 Mecanismos de agressão

Alguns fatores e situações podem alterar os mecanismos de defesa descritos propiciando o aparecimento de injúrias com conseqüentes doenças do aparelho respiratório (Saldiva et al., 2000):

- Distúrbios do transporte mucociliar e incremento da remoção de secreções pela tosse: são os marcadores clínicos mais importante tanto da bronquite crônica como de outras doenças inflamatórias crônicas das vias aéreas, tais como as que geram bronquiectasia (**figura 3**);
- Ativação excessiva da resposta broncoconstrictora: representa o evento mais característico da asma brônquica;
- Proliferação de células das vias aéreas em resposta a um estímulo patológico persistente.

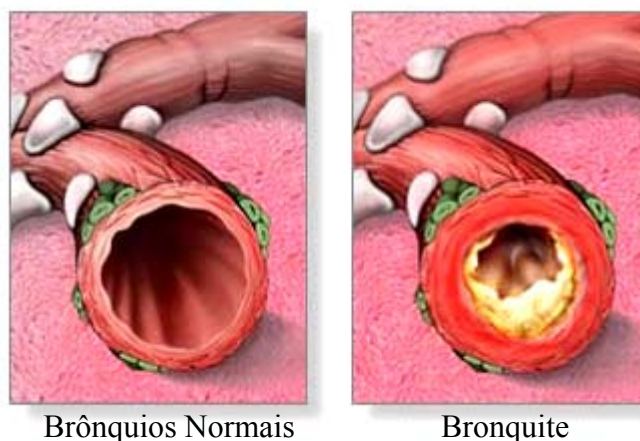


Figura 3. Esquema comparativo entre brônquios normais e brônquios inflamados (bronquite) (fonte: www.nlm.nih.gov).

1.1.4 Ações de drogas sobre os pulmões

O aparelho respiratório é possivelmente um dos mais sensíveis à ação das plantas medicinais. Todos os órgãos respiratórios recebem grandes benefícios com o emprego dos extratos vegetais. Sua ação não se limita a neutralizar os sintomas da enfermidade, mas exercem também uma ação limpadora do excesso das mucosidades depositadas no interior dos condutos respiratórios (Mello & Mello., 2005). Diariamente, cerca de mil litros de ar passam pelos pulmões e a maioria são ares contaminados das grandes cidades, contendo elementos tóxicos das fumaças dos carros e fábricas. Os brônquios dispõem de um mecanismo eficaz de limpeza. Porém, o excesso de toxinas faz com que esse mecanismo deixe de funcionar adequadamente, produzindo problemas respiratórios (Robbins et al., 2005).

Os defeitos congênitos do sistema imunológico, freqüentemente, manifestam-se por infecções recorrentes das vias respiratórias. Foram realizadas inúmeras tentativas para resolver o problema das infecções recorrentes das vias respiratórias, tais como vacinas com antígenos bacterianos em solução, as quais, ainda que tenham demonstrado sua eficácia clínica e imunológica, apresentam limitações de uso, pois as vias de administração intracutânea e intra-nasal não são aceitas por todos os pacientes. Além disto, estas vias de administração, ainda que promovam a imunidade, não estimulam especificamente o Sistema Imunológico Associado das Mucosas (MALT) (Robbins et al., 2005).

Por outro lado, os agentes imuno-estimulantes orais promovem o desenvolvimento da resistência às infecções, estimulando as respostas do organismo, tais como a fagocitose, a produção de anticorpos e a produção de células citotóxicas, sendo os produtos de origem bacteriana, provavelmente, os mais potentes imuno-estimulantes (Ackerman & Creswell, 2003).

Os problemas respiratórios incomodam muita gente, e quando chega o inverno, há a queda da imunidade, deixando estes órgãos ainda mais debilitados e suscetíveis, ocasionando com isso espirros, resfriados, corizas, tosses, asma, e a conseqüente disseminação de vírus, fungos e bactérias, aumentando a incidência de pneumonia, asma, bronquite, rinite e enfisema pulmonar (Chaplin, 2003).

1.2 Bioquímica do Muco

O muco é produzido pelas células caliciformes e pelas glândulas submucosas, consiste de uma substância complexa formada por água, glicoproteínas, transudato (soro), enzimas proteolíticas com seus inibidores, imunoglobulinas produzidas no local e lipídios. Outros constituintes importantes do muco das vias aéreas incluem proteínas, derivados do plasma, em especial a albumina, e produtos de células mortas tais como o DNA e a actina. A hipersecreção do muco é conseqüentemente um processo patológico complexo que envolve mecanismos que são responsáveis pela hiperplasia e a degranulação das células secretoras de muco, sendo remodelador microvascular e de escape, e quimiotático de células inflamatórias (Li et al., 2001).

O pH é normalmente neutro. A secreção de muco pelas células caliciformes é estimulada pelo reflexo vago e por irritação direta, com a presença de antígenos e substâncias irritantes que entram com a respiração e vão até a intimidade do pulmão através da árvore brônquica. O muco das vias aéreas consiste de um gel com propriedades viscoelásticas especiais auxiliando na propulsão realizada pelos cílios respiratórios (Lucas et al., 2000).

O muco é um componente importante da defesa do hospedeiro, mas representa uma causa importante da obstrução das vias aéreas quando secretado em excesso. A asma fatal, por exemplo, está associada quase sempre com a oclusão das vias aéreas pelo plugues do muco (Carroll et al., 1993).

Mucinas são os constituintes principais do muco das vias aéreas e contribui significativamente para a sua viscoelasticidade e propriedades adesivas (Rose & Gendler, 1997; Fahy et al., 1998).

Estruturalmente, as mucinas são moléculas complexas grandes, constituídas de uma espinha dorsal de peptídeos e numerosos oligossacarídeos em cadeias laterais que representam os produtos dos genes MUC e de genes do glicosiltransferases, respectivamente (Fahy, et al., 1998).

A hipersecreção de mucina ocorre em diversas doenças respiratórias, incluindo a asma, a bronquite crônica e a fibrose cística, e é um fator de risco para mortalidade nestes grupos pacientes. Atualmente, não há nenhuma terapia disponível para tratar a hipersecreção do muco (Singer et al., 2004). Foi demonstrado recentemente que o substrato da proteína cinase-C rico em alanina (MARCKS), é um alvo para a fosforilação pela proteína cinase C, sendo essencial para a secreção do muco em células epiteliais brônquicas humanas em cultura (Li et al., 2001).

Essa hipersecreção do muco é freqüentemente observada na inflamação das vias aéreas sendo a principal causa de obstrução das vias aéreas (Li et al., 2001; Singer et al., 2004). Muitos estudos mostraram que os mediadores da inflamação, tais como a histamina, as prostaglandinas, os leucotrienos, o fator ativador de plaquetas, e a proteína catiônica eosinofílica podem estimular a secreção do muco (Sperber et al., 1991; Gollub et al., 1992; Larivée et al., 1994; Baraniuk & Kaliner, 1990). No contraste, somente um único estudo que examina uma única citocina [fator de necrose tumoral (TNF)] forneceu a evidência que os mediadores inflamatórios estimulam também a síntese do muco (Levine et al., 1995).

Resultados encontrados por (Longphre et al., 1999) em células epiteliais cultivadas do sistema respiratório demonstraram que as amostras do líquido asmático estimularam a síntese da mucina (MUC5AC), mais potencialmente do que o líquido não asmático.

1.3 Mecanismo de ação dos agentes mucolíticos

Existem medicamentos que tem o objetivo de alterar as propriedades das secreções das vias aéreas. Na teoria estes facilitam o afastamento do muco superficial melhorando a função ciliar das vias aéreas. Estes são conhecidos como medicamentos mucoativos, eles permitem o aumento do teor líquido e assim melhoram o transporte mucociliar, além de aumentarem o

volume da expectoração diária. Esses remédios são indicados para os pacientes com doença obstrutiva pulmonar crônica (DPOC) e asmáticos (Rubin, 2006).

O aparelho respiratório possui alguns mecanismos que desempenham uma função de defesa e limpeza da árvore respiratória, tais como o reflexo da tosse e o sistema mucociliar (Fontan et al., 2002).

A tosse e o reflexo de broncoconstrição, manifestações comuns de doença respiratória (O'Connell, 2002), podem ser gerados por estimulação mecânica das vias aéreas, inalantes irritantes ou liberação local de mediadores agindo nos receptores de adaptação rápida e nas terminações nervosas presentes na laringe e mucosa traqueobrônquica (Widdicombe, 2002).

O transporte mucociliar, outro mecanismo de defesa pulmonar, serve para remover partículas inaladas da mucosa traqueobrônquica. O sistema mucociliar é responsável pela movimentação de fluidos (muco), os quais são produzidos pelas células caliciformes e pelas glândulas brônquicas (Górniak, 2002). Teoricamente o mecanismo pelo qual há a interação do transporte mucociliar, está diretamente relacionado com as alterações na quantidade e qualidade das secreções epiteliais (fluido periciliar e muco) e alterações na integridade anatômica e funcional dos cílios (Wanner, 1986).

Os agentes mucolíticos atuam na hidratação do muco, na diminuição das interações iônicas, como agentes redutores das ligações dissulfeto, ação proteolítica, na quebra dos filamentos de DNA, como despolimerizantes da actina, e na quebra das interações, tipo pontes de hidrogênio (King & Rubin, 2002).

As doenças relacionadas com o aparelho respiratório são de alta incidência, onde o emprego adequado de substâncias na terapia instituída é o ponto chave para o êxito do tratamento e para o bem estar do paciente. Para o tratamento das doenças respiratórias, utilizam-se diversos fármacos, principalmente antitussígenos, expectorantes, antiasmáticos e tensoativos pulmonares, nem sempre com eficácia comprovada (Korolkovas, 1999).

King & Rubin (2002) demonstraram que a bromelina apresenta a capacidade de diminuir a viscosidade de secreções mucosas respiratórias, tanto através de sua atividade proteolítica, quanto através de sua atividade tiol-redutase, promovendo a quebra das pontes dissulfeto inter e intracadeias, diminuindo as ligações responsáveis pela formação da malha de mucina, atividade similar à N-acetilcisteína.

A N-acetilcisteína pode diminuir a viscosidade do muco, mas não há evidências de que qualquer mucolítico traga algum benefício na asma aguda grave, exceto talvez quando o

paciente tenha uma grande quantidade de muco e esteja em ventilação pulmonar mecânica (Pantaleo et al., 2002).

1.4 Abacaxi (*Ananas comosus*) – Enzimas proteolíticas

O Brasil é um grande produtor de abacaxi, sendo conhecidas cinco espécies de *Ananas* e uma de *Pseudoananas*. Dentro da espécie *Ananas comosus* estão incluídos todos os cultivos de interesse agrícola, onde os principais cultivados no Brasil são o Pérola e o Smooth Cayenne (Santos, 1995).

Apenas 65% da porção total do abacaxi é utilizado, enquanto que o restante, composto pela casca, caule, folha, coroa e talos, é considerado resíduo agrícola, e não vem sendo aproveitado de forma adequada, resultando em perdas econômicas. Alguns trabalhos demonstram que estes resíduos apresentam altos teores de proteínas, carboidratos e enzimas proteolíticas, que possibilitam a sua utilização industrial como matéria-prima para a obtenção de bromelina, amido, fibras, álcool etílico e rações animais (Freiman et al., 1999; Rabelo et al., 2004).

O conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família *Bromeliaceae* (abacaxi) recebe o nome de bromelina. As enzimas proteolíticas encontradas nos talos recebem o nome de bromelina do talo e tem o número sistemático EC 3.4.22.4, e as encontradas no fruto são chamadas de bromelina do fruto ou somente bromelina e seu número sistemático é EC 3.4.22.5. A bromelina é uma glicoproteína, tendo um resíduo oligossacarídeo por molécula, que está covalentemente ligado à cadeia peptídica (Rabelo et al., 2004).

A bromelina do talo é uma enzima sulfidrílica, e este grupamento é essencial para a sua atividade proteolítica. A bromelina do fruto é uma proteína ácida, e seu ponto isoelétrico foi determinado por focalização isoelétrica como pH 4,6 e mudanças conformacionais irreversíveis ocorrem em valores de pH maiores que 10,3. Foi verificado por Rowan e colaboradores (1990) que a bromelina do fruto tem uma atividade proteolítica maior que a bromelina do talo em diversos substratos protéicos, e sua atividade é máxima em pH 8,0 e a temperatura de 70°C. A bromelina do talo apresentou atividade máxima a 60°C e pH 7,0.

A enzima não está presente nos primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, porém, seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, onde tem um pequeno decréscimo. Essa é uma das vantagens da utilização das proteases do abacaxi em comparação com outras proteases vegetais. Apesar da diminuição da atividade proteolítica

durante a maturação, o abacaxi é o único fruto que possui concentrações relativamente altas de proteases no estado maduro. No mamão e no figo, tanto a papaína como a ficina, somente são encontradas em altos níveis quando o fruto está verde; com o completo amadurecimento, a concentração de proteases praticamente desaparece.

As preparações de bromelina são impuras, e geralmente as principais enzimas contaminantes são outras enzimas proteolíticas e enzimas não proteolíticas, tais como: fosfatases, peroxidases, celulasas e outras glicosidases. Suh e colaboradores (1992) purificaram as bromelinas do fruto e do talo até a homogeneidade (18 e 46 vezes de aumento de pureza, respectivamente) por cromatografia de gel-filtração e determinou os pesos moleculares em 32.5 e 37 KDa respectivamente, com rendimento de 23% em atividade. Murachi (1976), purificou a bromelina do talo de abacaxi por cromatografia de gel-filtração, e determinou que o peso molecular da fração pura era de 28 KDa por SDS PAGE. Rowan *et al.* (1990), descreve a presença de quatro proteases principais presentes em abacaxis (*Ananas comosus*): bromelina do fruto, bromelina do talo, ananaína e comosaína.

1.5 Usos terapêuticos da bromelina

A bromelina é uma endopeptidase que não necessita de sistema precursor para desempenhar suas atividades farmacológicas e terapêutica. A bromelina apresenta efeitos antiinflamatórios em diferentes modelos animais e doenças inflamatórias em humanos, incluindo alteração na ativação e migração de leucócitos (Hale *et al.*, 2002; Hale *et al.*, 2006), e diminuição da secreção por células imunes de mediadores inflamatórios (Mynott *et al.*, 1999; Mynott *et al.*, 2002). Foi notado na pleurisia induzida por carragenina que 10 mg/kg de bromelina por administração intravenosa demonstrou atividade antiinflamatória similar a 0,3 mg/kg i.p. de dexametazona (Majima *et al.*, 1996; Ogino *et al.*, 1996; Majima *et al.*, 1997). Na aterosclerose em enxerto alogênico em ratos (Gaciong *et al.*, 1996) e em doenças reumatológicas humanas o uso da bromelina teve efeito similar ou maior de que os antiinflamatórios não hormonais (AINH) (Masson, 1995; Witterborg, 2000; Brown, 2000).

Diversos trabalhos mostram que o uso da bromelina aumenta a absorção de antibióticos como penicilina, amoxicilina e tetraciclina, através da administração oral, intramuscular e subcutânea, obtendo-se níveis plasmáticos mais elevados dos antibióticos e

menores índices de complicações (Renzini & Varengo, 1972; Tinozzi & Venegoni, 1978; Friesen *et al.*, 1987).

Heinecke e colaboradores (1972) cita que indivíduos com contagem de plaquetas elevada, fazendo uso da bromelina, diminuíram a agregação plaquetária induzida por ADP. Maurer (2001) relata que a bromelina demonstrou *in vitro* capacidade em ativar o plasminogênio à plasmina, o qual cliva a fibrina porém a bromelina não demonstrou eficiência em dissolver agregados de fibrina já formados.

A bromelina foi utilizada na inibição do desenvolvimento tumoral em pacientes portadores de câncer melhorando a sobrevida e reduzindo os efeitos colaterais, bem como, apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de diversas linhagens tumorais *in vitro* (Garbin *et al.*, 1994; Grabowska *et al.*, 1997) e inibição da invasibilidade tumoral e metástases de melanoma e tumor de mama em modelos animais (Batkin *et al.*, 1988; Grabowska *et al.*, 1997). A bromelina também foi usada no tratamento de tecidos necrosados obtendo bons resultados em queimaduras experimentais em ratos quando comparado ao uso das collagenases (Klaue *et al.*, 1979).

Um dos principais usos da bromelina é como agente mucolítico e fluidificante das secreções brônquicas e das vias aéreas superiores e foi demonstrado que a bromelina apresenta a capacidade de diminuir a viscosidade de secreções mucosas respiratórias, tanto através de sua atividade proteolítica, quanto através de sua atividade tiol-redutase, promovendo a quebra das pontes dissulfeto inter e intracadeias de mucina, diminuindo as ligações responsáveis pela formação da malha de mucina, atividade similar à N-acetilcisteína (King & Rubin, 2002). Alguns experimentos mostram a ação fluidificante da bromelina, sobre as secreções brônquicas (Silva & Franco, 2000), a ativação de macrófagos e células “natural killer” (Engwerda *et al.*, 2001a), além de modular a resposta imune de células T e B *in vitro* e *in vivo* (Engwerda *et al.*, 2001b).

Além disso, o *Ananas comosus* contém os cátions divalentes magnésio, manganês, zinco, ferro e cálcio, que atuam como cofatores nas funções das referidas enzimas. As enzimas proteolíticas são aplicadas em formulações tópicas com a finalidade de reduzir a espessura da camada córnea da pele por hidrolisar, em pontos específicos, a queratina cutânea. É um peeling mais suave e seguro, comparado aos tradicionais peelings químicos, e mais eficaz que os métodos físicos comumente usados em formulações cosméticas (Racine, 2004).

1.6 Mel

O mel é um elemento viscoso, adocicado e apresenta aroma agradável, e segundo alguns relatos, ele é apreciado desde a Grécia antiga (Dustmann, 1993). Sua qualidade nutricional (vitaminas, minerais, valor energético elevado), suas propriedades medicinais e suas propriedades sensoriais têm atraído milhares de consumidores (Zumalai & Lucat, 1989). A matéria-prima para produção do mel pelas abelhas é o néctar ou a excreção de afídios ou o exsudato de plantas ou mesmo frutas.

O néctar é a matéria-prima para a produção de méis florais que são os mais apreciados e alcançam os maiores preços no mercado. O mel floral pode ser monofloral, quando o néctar é coletado de uma única espécie vegetal; polifloral, se mais de uma espécie de planta contribui com o néctar; silvestre, que se caracteriza por ser um mel polifloral produzido em vegetação primária e, portanto, espécies nativas contribuem com o néctar. O mel extrafloral não é produzido a partir do néctar e, sim, de exsudato de plantas ou de restos de frutas ou outra fonte de matéria-prima (Costa, 1999).

Como o mel é resultado da desidratação e transformação do néctar, a quantidade de mel que pode ser obtida de uma determinada planta varia com os fatores que influenciam a produção e a concentração do néctar e, ainda, com as concentrações e proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da área e com o número de dias em que as flores estão secretando o néctar. A composição do mel depende, basicamente, da composição do néctar de cada espécie vegetal produtora, conferindo-lhe características específicas enquanto que as condições climáticas e o manejo do apicultor têm influência menor (Crane, 1990)

Atualmente, o mel de abelha é um alimento muito popular, tanto como suplemento alimentar como coadjuvante terapêutico. Entre suas inúmeras propriedades terapêuticas destacam-se as ações bactericidas, anti-sépticas, vasodilatadoras, diuréticas, digestivas, vermífugas e, recentemente, novas pesquisas têm demonstrado que atua também como antioxidante, pela absorção de radicais livres de oxigênio (Cutler et al., 2001).

Dentre os açúcares existentes no mel, os monossacarídeos constituem a maior parte, variando de 85% a 95% da sua composição, sendo eles os açúcares simples, frutose e glicose (Horn et al., 1996).

Alguns relatos descrevem que outros monossacarídeos são encontrados, porém, em pequenas quantidades e relacionado com a origem floral do mel: xilose, ribose, arabinose, manose, galactose (Swallow & Low, 1990; Astwood Lee & Manley-Harris, 1998).

Varias propriedades medicinais são atribuídas ao mel pela medicina popular e que vêm sendo comprovadas por inúmeros trabalhos científicos, sua atividade antimicrobiana talvez seja seu principal efeito medicinal, sendo que não apenas um fator, mas vários fatores e suas interações são os responsáveis por tal atividade (Sato & Miyata, 2000).

Propriedades antissépticas também são atribuídas ao mel, fazendo com que ele seja utilizado como agente coadjuvante na área terapêutica em diversos tratamentos profiláticos (Stonoga & Freitas, 1991).

Os responsáveis por essa habilidade antimicrobiana são os fatores físicos, como sua alta osmolaridade e acidez, e os fatores químicos relacionados com a presença de substâncias inibidoras, como o peróxido de hidrogênio, e substâncias voláteis, como os flavonóides e ácidos fenólicos (Molan, 1992; Wahdan, 1998). Também é relatada sua ação antifúngica (Efem, 1993), cicatrizante (Gupta et al., 1993) e promotora da epitelização das extremidades de feridas (Efem, 1993).

Após inúmeros estudos os parâmetros físico-químicos para méis brasileiros estão bem definidos (Ministério de Agricultura, 1997). Em 100 gramas de mel (com 328 calorias) você encontra 17,2% de água, 0,4 a 0,8% de proteínas (aminoácidos), 81,3% de açúcares, sendo eles, 38,19% frutose, 31,28% glucose, 5,0% sacarose, 6,83% maltose e outros dissacarídeos, como também amido e outros polissacarídeos. A eles se agregam vitaminas (principalmente vitamina C), sais minerais, oligoelementos, substâncias bactericidas, como segue: sódio, potássio, cálcio, manganês, ferro, cobre, fósforo, enxofre e outras substâncias em ínfimas quantidades, mas com efeitos certos a favor do organismo. No mel estão presentes também outras vitaminas importantes, como: tiamina (Vit. B1), riboflavina (Vit. B2), piridoxina (Vit. B6), ácido pantotênico, ácido nicotínico (Vit. PP), ácido fólico (Campos, 1987; Oddo et al., 1996).

Porém muitas das características pelas quais o mel é apreciado, como o seu aroma e sabor, são determinadas por substâncias presentes em diminutas concentrações (Bastos et al., 2002). É um alimento de fácil digestão, sendo assimilado diretamente, constituindo uma fonte de energia. Importante como alimento, para o equilíbrio do processo biológico do corpo humano, porque o mel contém em proporções equilibradas: fermentos, vitaminas, minerais, ácidos e aminoácidos, semelhantes a hormônios, substâncias bactericidas e aromáticas.

Atualmente alguns países, como a França e a Itália já vêm objetivando a produção de mel com propostas terapêuticas específicas, como nos tratamentos de úlceras e problemas respiratórios (Yaniv & Rudich, 1996).

Nos últimos anos tem sido disseminada a noção de que o consumo de alimentos naturais é excelente para curar e prevenir algumas enfermidades e/ou restabelecer a saúde, porém muitas dessas divulgações não apresentam base científica (Sato & Miyata, 2000).

1.7 Proteômica: Considerações gerais

A partir da informação que vem sendo disponibilizada, em resultado da execução dos projetos de sequenciamento de genomas, surgiu, recentemente, uma nova abordagem experimental em biologia, conhecida por análise proteômica. Esta consiste no estudo das proteínas expressas a partir de um genoma, o denominado proteoma. A evolução desta abordagem experimental tem resultado no desenvolvimento, integração e automatização de uma variedade de técnicas e equipamentos que permitem separar, identificar, quantificar e caracterizar proteínas, bem como relacionar essa informação com a obtida por outras abordagens, através da bioinformática (Monti et al., 2005).

A obtenção da seqüência de nucleotídeos do genoma de um organismo, por si só, constitui apenas um primeiro passo que, no entanto, abre caminho à realização de muitos outros estudos. Através da inspeção da seqüência do genoma é possível obter informação sobre o nível de expressão de genes e proteínas, ou sobre características das proteínas expressas, tais como o seu tempo de meia vida, a sua localização sub-celular, eventuais modificações pós-tradução, interações proteína-proteína e proteína-DNA, a estrutura e a função biológica das proteínas (Berkelman & Stenstedt, 2002).

Um esforço significativo tem sido dirigido às técnicas envolvidas na proteômica quantitativa, de modo a viabilizar a sua exploração na elucidação de aspectos da regulação da expressão genética global. Esta análise complementa a monitorização de expressão genética global ao nível do mRNA (análise transcriptômica), a qual não permite apreciar aspectos de regulação que ocorrem pós-transcrição e pós-tradução (Stenstedt et al., 2002).

A proteômica é um conjunto de tecnologias extraordinariamente úteis no estudo do conteúdo protéico dos sistemas biológicos. Sua revolução é permitir a análise de um grande número de proteínas ao mesmo tempo (Sheehan, 2006).

É imenso o campo da pesquisa científica que se abre com os estudos proteômicos. Com suas informações, pode-se, em princípio, estudar qualquer fenômeno que implique modificações no conteúdo protéico de uma célula ou tecido. Afinal, o proteoma é o

equivalente protéico do genoma, tem todas as proteínas expressas pela célula detentora deste genoma (Veenstra, 2006).

A tecnologia proteômica é dinâmica e consiste em técnicas já conhecidas pela química de proteínas tradicional às quais vêm sendo incorporados avanços tecnológicos, que seguem se inovando rapidamente. Isso proporciona eficiência cada vez maior, além de já permitir separar e identificar um número imenso de proteínas (proteomas) a partir de quantidades muito pequenas delas.

Para separação das proteínas e peptídeos, as técnicas mais utilizadas são a eletroforese bidimensional e a cromatografia multidimensional. Para a identificação deles, utilizam-se o microseqüenciamento automático de Edman e, principalmente, a espectrometria de massa (Mikesh et al., 2006).

A eletroforese bidimensional é a técnica que se aplica à separação de um grande número de proteínas ao mesmo tempo e com alto poder de resolução (**figura 4**). Utiliza basicamente duas propriedades: a carga elétrica da molécula e sua massa molecular. A combinação dessas duas propriedades físico-químicas permite separar milhares de proteínas de um modo relativamente simples (Lilley & Friedman, 2006).

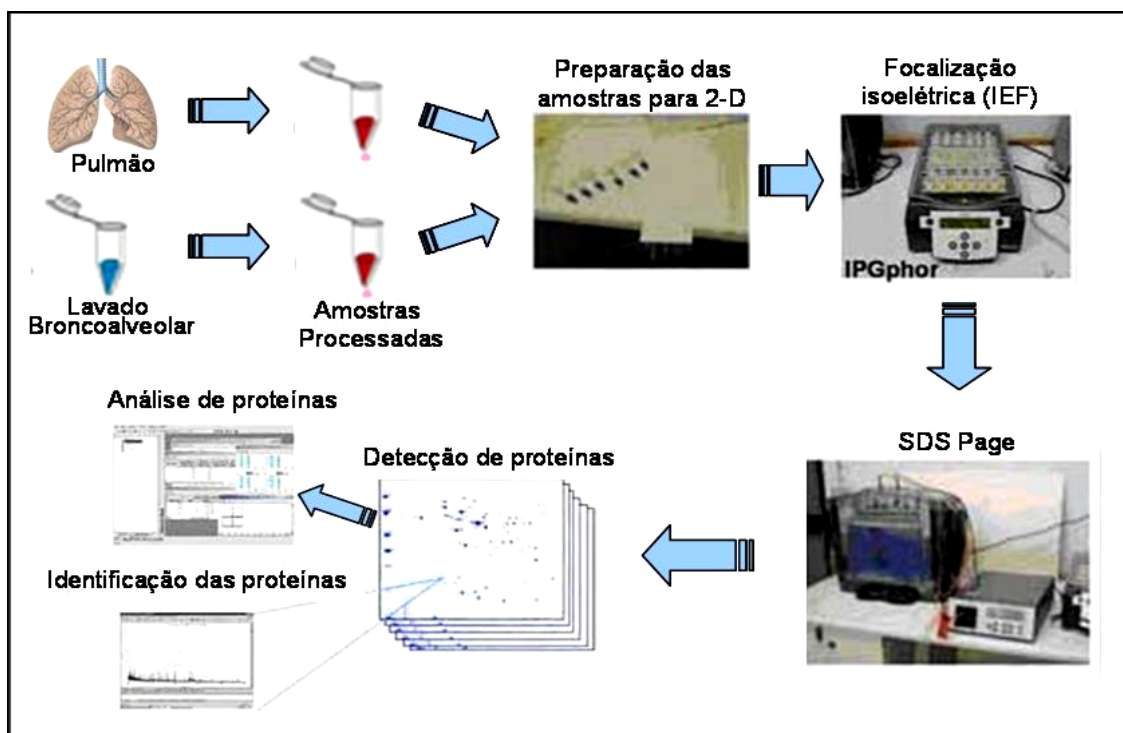


Figura 4. Representação esquemática do processo de preparação das amostras para realização das técnicas de eletroforese bidimensional 2-D e proteômica.

Após separar as proteínas, a possibilidade de identificá-las aumenta muito. Principalmente utilizando-se a espectrometria de massas, tecnologia altamente sensível que permite trabalhar com uma quantidade anteriormente, inimaginável com as técnicas convencionais (Vasilescu & Figeys, 2006).

A cromatografia multidimensional, por sua vez, permite separar as proteínas através de cromatografias em sequência, utilizando-se diferentes propriedades físico-químicas das moléculas. Desta forma, separa-se previamente as proteínas e, em seguida, parte-se para a identificação on-line, sem nenhum tipo de processamento ou manipulação (Dondos, 2006).

Os estudos do proteoma, a proteômica, têm-se desenvolvido principalmente através da separação das proteínas por electroforese de gel bidimensional. Na primeira dimensão, as proteínas são separadas por focalização isoeletrica, que distingue as proteínas em função da sua carga. Na segunda dimensão, as proteínas são separadas por peso molecular. O gel é corado com azul de Coomassie ou com Nitrato de prata para tornar as proteínas visíveis. “spots” são proteínas que migraram para locais específicos (Monti et al., 2005).

Na década de 70 foi publicada a primeira técnica de eletroforese bi-dimensional 2-D para separação de proteínas por focalização isoeletrica nativa, com gradientes de pH em gel (Kenrick & Margolis, 1970). Alguns anos depois, O’Farrel & Klose (1975) introduziram o método original de focalização isoeletrica, promovendo a separação na primeira dimensão através de gradientes de pH gerados por carreadores anfólitos (moléculas pequenas, solúveis e anfotéricas com uma alta capacidade de neutralização próxima ao seu ponto isoeletrico – pI), em géis de poliacrilamida distribuídos em tubos do tipo capilar de vidro (Berkelman & Stenstedt, 2002).

Numa das abordagens mais comuns em proteômica quantitativa, recorre-se à separação das proteínas presentes em amostras biológicas, por eletroforese bi-dimensional (2-D) em géis de poliacrilamida. A esta separação segue-se a comparação do conteúdo de cada uma das proteínas, produzidas em células ou tecidos que se encontram em diferentes estados fisiológicos. A identificação das proteínas cuja expressão sofreu uma alteração significativa permite obter pistas sobre o seu possível envolvimento no processo biológico em apreciação (Monti et al., 2005).

A análise das modificações das proteínas que ocorrem pós-tradução é também muito importante porque estas podem determinar o seu tráfego, a sua funcionalidade e o seu nível de atividade, sendo crucial para a compreensão das complexas redes de regulação subjacentes às respostas celulares a qualquer perturbação ambiental (Dondos, 2006).

Desde então, têm-se verificado melhoramentos substanciais na qualidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos, em consequência do desenvolvimento de equipamentos e reagentes específicos. Atualmente, a aplicação da eletroforese 2-D permite uma alta resolução das várias espécies protéicas presentes numa amostra biológica, de uma forma reprodutível (Veenstra, 2006).

Além da sua alta resolução e reprodutibilidade, a eletroforese 2-D permite também separar as várias formas protéicas que tenham sofrido modificações pós-tradução. A separação destas formas é possível visto que essas modificações conferem propriedades diferentes à proteína, em particular, um diferente pI ou peso molecular. Por exemplo, consegue-se distinguir as formas fosforilada e não-fosforilada das fosfo-proteínas porque este tipo de modificação pós-tradução implica uma alteração do seu pI e peso molecular. Pode-se avaliar a presença de proteínas fosforiladas num proteoma dividindo a amostra protéica em duas alíquotas, tratando-se uma delas com uma fosfatase, para remoção dos grupos fosfato. Por comparação dos mapas obtidos após separação por eletroforese bi-dimensional das amostras tratada e não tratada é possível identificar as proteínas que se encontram fosforiladas, uma vez que a perda do grupo fosfato resulta na sua migração para zonas mais básicas do gel, durante a focagem isoeletrica (Yamagata et al., 2002). Modificações do tipo acetilação, glicosilação ou hidrólise específica de determinados peptídeos, alteram o peso molecular da proteína modificada e, eventualmente, o seu pI, tornando assim possível a detecção dessas formas com base nos géis 2-D.

Em estudos de proteômica, a análise comparativa dos proteomas obtidos em duas (ou mais) situações em estudo, tem por objetivo identificar e quantificar as possíveis alterações ao nível da abundância relativa de cada espécie protéica separada nos géis 2-D. Desta forma, torna-se possível identificar as proteínas envolvidas na resposta celular à alteração imposta. Geralmente, é construído um mapa de referência do proteoma de células cultivadas na condição de referência. Este mapa é construído através da catalogação das várias espécies protéicas separadas em géis 2-D, após a sua identificação.

A análise da 2-D pode ser realizada utilizando-se softwares para análise de imagens 2-D, que permitem uma comparação quantitativa e qualitativa dos “spots” apresentados nos géis. Desde 1975, vários programas para análise de imagens têm sido desenvolvidos. O Swiss Instituto de Bioinformática (SIB) em colaboração com a GeneBio e Amersham Biosciences, tem desenvolvido e comercializado vários programas de análise de imagens 2-D como o ImageMast 2D Elite (versão 4) e o ImageMast 2D Platinum (versão 5), que permitem o

estudo de similaridades e diferenças entre imagens de 2-D, obtidas de amostras biológicas sob diferentes condições como sadios e doentes, tratados com drogas e sem tratamento, contribuindo para a identificação de marcadores terapêuticos moleculares, diagnóstico e prognóstico de doenças, dentre outras situações específicas (Cohen et al., 2002).

2. JUSTIFICATIVA

O Melxi® é um fitoterápico fabricado pelo laboratório HEBRON (Brasil), que associa o extrato bruto do abacaxi ao mel de abelha e é largamente utilizado no tratamento de doenças do trato respiratório. Por outro lado, o abacaxi apresenta um conjunto de proteases, denominada de bromelina, o qual vem sendo responsabilizado pela diminuição da viscosidade e da elasticidade do muco, exercendo assim um efeito mucolítico e fluidificante.

Embora o Melxi® venha sendo comercializado faz algum tempo, seu mecanismo de ação e possível ação mucolítica e fluidificante, ainda não foi esclarecido, sendo de fundamental importância conhecer tais efeitos sobre as vias respiratórias e também determinar quais os componentes do mel ou do abacaxi estariam envolvidos nas atividades acima citadas.

O estudo da ação “in vivo” do fitoterápico utilizando modelos animais com doenças respiratórias induzidas pela ovoalbumina parece promissor, pois permitirá a determinação do efeito terapêutico, farmacológico e bioquímico do xarope. O produto passará a ter base científica para sua comercialização e trará um grande benefício para a população em geral que poderá dispor de um medicamento natural para o seu consumo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito do xarope Melxi® sobre o tecido pulmonar e o líquido brônquio-alveolar de modelos animais de doença inflamatória do trato respiratório, tratados e não tratados pelo fitoterápico.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar por estudo histopatológico a morfologia do Pulmão dos animais com processo inflamatório induzido, comparado com animais saudáveis;
- Avaliar por estudo histopatológico a morfologia do Pulmão dos animais com processo inflamatório induzido, após tratamento com o Melxi e controles tratados com solução salina;
- Isolar as proteínas presentes no lavado brônquio-alveolar e no tecido pulmonar dos animais em estudo;
- Separar por eletroforese bidimensional (2D) as proteínas presentes no lavado brônquio-alveolar e no tecido pulmonar dos animais em estudo;
- Analisar as imagens dos géis com o emprego do Software ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare);
- Identificar as proteínas de interesse.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ackerman, A.L., Cresswell, P., 2003. Regulation of MHC class I transport in human dendritic cells and the dendritic-like cell line KG-1. *J. Immunol.* 170, 4178–4188.
- Astwood, K., Lee, B., Manley-Harris, M., 1998. Oligosaccharides in New Zealand honeydew honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4958–4962.
- Baraniuk, J.N., Kaliner, M.A., 1990. Neuropeptides and nasal secretions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 86, 620–627.
- Bastos, D.H.M., Franco, M.R.B., Da Silva, M.A.A.P., Janzanti, N.S., Marques, M.O.M., 2002. Composição de voláteis e perfil sensorial de méis de eucalipto e laranja produzidos nos Estados de São Paulo e de Minas Gerais-Ciênc. Tecnol. Aliment. 22(2), 122-129.
- Batkin, S., Taussig, S. J., Szekeres, J., 1988. Antimetastatic effect of bromelain with or without its proteolytic and anticoagulant activity. *Journal of Cancer Research on Clinical Oncology*. 114, 507-508.
- Berkelman, T., Stenstedt, T., 2002. 2-D Electrophoresis-Principles and Methods, Amersham Biosciences. 80, 6429-60.
- Boers, J.E., Ambergen, A.W., Thunnissen, F.B.J.M., 1999. Number and proliferation of Clara cells in normal human airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 1585–1591.
- Brown A.C., 2000. Lupus erythematosus and nutrition: a review of the literature. *Journal of Renal Nutrition*. 10, 170–83.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Portaria SIPA n. 367 de 04 de setembro de 1997. Normas higiênico-sanitárias e tecnológicas para mel, cera de abelhas e derivados.
- Campos, M., 1987. Contribuição para o estudo do mel, pólen, geléia real e própolis. *Boletim da Faculdade de Farmácia*. 11, 17-47.
- Carroll, N., Elliot, J., Morton. A., 1993. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis*. 147, 405–410.
- Chaplin, D.D., 2003. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 442–459.
- Cohen, A. M., Rumpel, K., Coombs, G. H., Wastling, J. M., 2002. Characterization of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomic of *Toxoplasma gondii*. *Int. J for Parasitol.* 32, 39-51.
- Costa, L.S.M., Albuquerque, M.L.S., Trugo, L.C., Quinteiro, L.M.C., BARTH, O. M. Ribeiro, M., De Maria, C.A.B., 1999. Determination of non-volatile compounds of different botanical origin Brazilian honeys. *Food Chemistry*. 65, 347-352.

- Crane, E., 1990. Bees, honey and pollen as indicators of metals environment. *Bee World*. 65 (1), 47-49.
- Cutler, D., Barbier, A., Pestell, K., 2001. Radical honey. *Trends Pharmacology Science*. 22 (9), 449.
- Dondos, A., 2006. Applicability of the modified universal calibration of gel permeation chromatography on proteins (Article). *Journal of Chromatography Acta*. 1127(1-2), 183-186.
- Dustmann, J.H., 1993. Honey, quality and its control. *American Bee Journal*, 133, 648-651.
- Efem, S.E.E., 1993. Recent advances in the management of Fournier's gangrene: preliminary observations. *Surgery*. 113, 200-204.
- Engwerda, C.R., Andrew, D., Ladhams, A., Mynott, T.L., 2001b. Bromelain Modulates T Cell and B Cell Immune Responses in Vitro and in Vivo. *Cellular Immunology*. 210, 66-75.
- Engwerda, C.R., Andrew, D., Murphy, M., Mynott, T.L., 2001a. Bromelain Activates Murine Macrophages and Natural Killer Cells in Vitro. *Cellular Immunology*. 210, 5-10.
- Fahy, J.V., Middleton, E., Reed, C.E., Ellis, E.F., et al., 1998. Airway mucus and the mucociliary system. In: eds. *Allergy principles and practice*. 5th ed. St. Louis, MO: Mosby, 520-531.
- Fontan, A.G.A., Lavorini, F., Pistolesi, M., 2002. Water aerosols and cough. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 15, 205-211.
- Freiman, L.O., SABAA, S.A.U.O., 1999. Determination of total protein and aminoacid composition of bromelain extracted from pineapple plant residues (*Ananas comosus*, (L.) Merril). *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 19, no. 2.
- Friesen, A., Schilling, A., Gofstetter, A., Adam, D., 1987. Tetracyclin-konzentration im Prostata-Sekret. *Z. Antimikrobian Antineoplastik Chirurgie*. 2, 61-65.
- Gaciong, Z., Paczek, L., Bojakowski, K., Socha, K., Wisniewski, M., Heidland, A., 1996. Beneficial effect of proteases on allograft arteriosclerosis in a rat aortic model. *Ephrology Dial Transplant*. 11, 987-989.
- Garbin, F., Harrach, T., Eckert, K., Maurer, H.R., 1994. Bromelain proteinase augments human lymphocyte-mediated growth inhibition of various tumor cells in vitro. *International Journal of Oncology*. 5, 197-203.
- Gollub, E.G., Goswami, S.K., Sperber, K., Marom, Z., 1992. Isolation and characterization of a macrophage-derived high molecular weight protein involved in the regulation of mucus-like glycoconjugate secretion. *J. Allergy Clin. Immunol.* 89, 696-702.
- Górniak S.L., 2002. Medicamentos com ação no sistema respiratório. In: Spinosa H.S., Górniak S.L. & Bernardi M.M. (Eds). *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.158-166.

- Grabowska, E., Eckert, K., Fichtner, I., Schulze-Forster, K., Maurer, H.R., 1997. Bromelain proteases suppress growth, invasion and lung metastasis of mouse melanoma cells. *International Journal of Oncology*. 11, 243-248.
- Gupta, S.K., Sinch, H., Varshney, A.C., Prakash, P., Singh, S.P., 1993. Biochemical alterations during wound healing under influence of natural honey and ampicillin in buffaloes. *Indian Veterinary Journal*. 70, 45-7.
- Hale, L.P., Fitzhugh, D.J., Staats, H.F., 2006. Oral immunogenicity of the plant proteinase bromelain. *International Immunopharmacology*. In Press, Uncorrected Proof, Available online.
- Hale, L.P., Grrer, P.K., Sempowski, G.D., 2002. Bromelain Treatment Alters Leukocyte Expression of Cell Surface Molecules Involved in Cellular Adhesion and Activation. *Clinical Immunology*. 104, 183-190.
- Heinecke, R.M., Wal, L., Yokoyama, M., 1972. Effect of bromelain on human platelet aggregation. *Experimental*. 28, 844-845.
- Horn, H., Durán, J.E.T., Cortopassi-Laurino, M., Issa, M.R.C., Toledo, V.A.A. de, Bastos, E., Soares, A.E.E., 1996. Méis brasileiros: resultados de análise físico-químicas e palinológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11, Teresina, 1996. Anais. Teresina: CBA, p. 403-429.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2004. *Histologia Básica*, Guanabara-Koogan, 10a Edição, 540p.
- Kenrick, K.G., Margolis, J., 1970. Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique. *Anal. Biochemistry*. 33, 204-7.
- King, M., RUBIN, B.K., 2002. Pharmacological approaches to discovery and development of new mucolytic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54, 1475-1490.
- Klaue, P., Dilbert, G., Hinkle, G., 1979. Tiexperimentelle Untersuchngen zur enzymatischen Lokalbehandlung subdermaler Verbrennungen mit Bromelain. *Therapiewoche*. 29, 796-799.
- Korolkovas, A., 1999. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. São Paulo: Guanabara Koogan SA, p-721.
- Larivée, P., et al., 1994. Platelet-activating factor induces airway mucin release via activation of protein kinase C: evidence for translocation of protein kinase C to membranes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 11, 199-205.
- Layton, G.T., Harris, S.J., Bland, F.A., Lee, S.R., Fearn, S., Kaleta, J., Wood, M.L., Bond, A., Ward, G. 2001. Therapeutic effects of cysteine protease inhibition in allergic lung inflammation: inhibition of allergen-specific T lymphocyte migration. *Inflamm Res*. 50(8), 400-8.
- Levine, S.J., et al., 1995. Tumor necrosis factor- α induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 12, 196-204.

- Li, Y., Singer, M., Martin, L.D., Spizz, G., Adler K.B., 2001. MARCKS protein is key molecule regulating mucin secretion by human airway epithelial cell in vitro. *J. Biol. Chem.* 276, 40982- 40990.
- Lilley, K.S., Friedman, D.B. 2006. Difference gel electrophoresis DIGE. *Drug Discovery Today: Technologies*. In Press, Corrected Proof, Available online 19 October.
- Longphre, M., Li, D., Gallup, M., Drori, E., Ordoñez, C.L., Redman, T., Wenzel, S., Bice, D.E., Fahy, J.V., Basbaum, C., 1999. Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *J Clin Invest*, November. 104, Number 10, 1375-1382.
- Lucas, P., Rous, G., Pena, V.S., Ruiz, C.A.J., Pulido, M.S., Rubio, T.M., Pieras, E.S., Sanglas, J.E., 2000. Normativa sobre la rehabilitación respiratoria *Arch Bronconeumol.* 36, 257-274.
- Majima, M., Kawashima, N., Hiroshi, I., Katori, M., 1997. Effects of an orally active non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR173657, on plasma exudation in rat carrageenin-induced pleurisy. *British Journal of Pharmacology.* 121, 723–730.
- Majima, M., Nishiyama, K., Iguchi, Y., Yao, K., Ogino, M., Ohno, T., 1996. Determination of bradykinin-(1–5) in inflammatory exudate by a new ELISA as a reliable indicator of bradykinin generation. *Inflammatory Research.* 45, 416– 423.
- Masson, M., 1995. Bromelain in blunt injuries of the locomotor system. A study of observed applications in general practice. *Fortschrer Medicine.* 113, 303– 306.
- Maurer, H.R., 2001. Bromelain: Biochemistry, Pharmacology and Medical Use. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 58, 1234-1245.
- Mello, F.B., Mello, J.R.B., 2005. Antitussive and expectorant effects of two phytotherapies in the brazilian market. *Acta Scientiae Veterinariae.* 33(2), 161-167.
- Mikesh, L.M., Ueberheide, B., Chi, A., Coon, J.J., Syka, J.E.P., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., 2006. The Utility of ETD Mass Spectrometry in Proteomic Analysis Proteins and Proteomics Posttranslational Modifications in Proteomics Special Issue (Review article). *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins & Proteomics*, In Press, Accepted Manuscript, Available online 13 October.
- Molan, P.C., 1992. The antibacterial activity of honey. The nature of the antibacterial activity. *Bee World.* 73(1), 5-28.
- Monti, M., Orru, S., Pagnozzi, D., Pucci, P., 2005. Interaction Proteomics *Bioscience Reports.* 25, 1540-005-2847.
- Murachi, T., 1976. Bromelain enzymes. In: LORAND, L. *Methods in enzymology.* New York, Academic Press. XLV, 475-485.

- Mynott, T.L., Crossett, B., Prathalingam, S. R., 2002. Proteolytic inhibition of Salmonella enterica serovar typhimurium-induced activation of the mitogen-activated protein kinases ERK and JNK in cultured human intestinal cells. *Infection Immunology*. 70, 86– 95.
- Mynott, T.L., Ladhams, A., Scarmato, P., Engwerda, C. R., 1999. Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinase-2 in T cells. *Journal of Immunology*. 163, 2568– 2575.
- Ng, N., Lam, D., Paulus, P., Batzer, G., Horner, A.A. 2006. House dust extracts have both TH2 adjuvant and tolerogenic activities. *J Allergy Clin Immunol*. 117(5), 1074-81.
- O’Connell, F., 2002. Central pathways for cough in man – unanswered questions. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 15, 295-301.
- O’farrell, P.H., Klose, H., 1975. High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal Biology Chemistry*. 250, 4007-4021.
- Oddo, L.P., Piana, L., Sabatini, A.G., Conoscere il miele guida all'analisi sensoriale. 2 ed. Bolonha :Avenue Media ,1996.
- Ogino, M., Majima, M., Kawamura, M., Hatanaka, K., Saito, M.; Harada, Y., 1996. Increased migration of neutrophils to granulocyte-colony stimulating factor in rat carrageenin-induced pleurisy: roles of complement, bradykinin, and inducible cyclooxygenase-2. *Inflammation Research*. 45, 335–46.
- Pantaleo, T., Bongiani, F., Mutolo, D., 2002. Central nervous mechanisms of cough. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*.15, 227-233.
- Rabelo, A.P.B., Tambourgi, E.B., Pessoa-Jr, A., 2004. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO–PPO–PEO block copolymers. *Journal of Chromatography*. 807, 61–68.
- Racine, L.M., 2004. *Enzimas em formulações tópicas: bromelina e papaína*.
- Renzini, G., Varengo, M., 1972. Die Resorption von Tetrazyklin in Gegenwart von Bromelain bei oraler Applikation. *Arzneimittel-Forscher*. 2, 410-412.
- Robins, S.L., Cotran, R.S., Kumar, V., 2005. Bases Patológicas das Doenças. 7a Edição; Ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 338p.
- Roggen, E.L., Lindstedt, M., Borrebaeck, C., Verheyen, G.R., 2006. Interactions between dendritic cells and epithelial cells in allergic disease. *Toxicol. Lett*. 162, 71–82.
- Rose, M.C., Gendler, S.J., 1997. Airway mucin genes and gene products. In: Rogers DF, Lethem DI, eds. *Airway mucus: basic mechanisms and clinical perspectives*. Boston, MA: Birkhauser Verlag.
- Rowan, A.D., Buttle, D.J., Barret, A.J., 1990. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemical journal*. 266(3), 869-75.

- Rubin, B.K., 2006. The pharmacologic approach to airway clearance: Mucoactive agents. *Pediatric Respiratory Reviews*. 7S, S215–S219.
- Saito, H., Morikawa, H., Howie, K., Crawford, L., Baatjes, A.J., Denburg, E., Cyr, M.M., Denburg, J.A. 2004. Effects of a cysteinyl leukotriene receptor antagonist on eosinophil recruitment in experimental allergic rhinitis. *Immunology*. 113(2), 246-52.
- Saldiva, P.H.N.S., Mauad, T., Capelozzi, V., Dolhnikoff, M., Bernardi, F.D.C. 2000. In: Brasileiro Filho G editor. *Bogliolo Patologia*. Rio de Janeiro. Brasil: Guanabara Koogan. P. 298-344.
- Santos, S. A. Efeito do tempo na composição físico-química, química e na atividade da bromelina do caule do abacaxizeiro *ananás comosus* (L.) Merr.CV. Pérola armazenado em condições com ou sem refrigeração. Lavras: ESAL, 1995. 47p. (Dissertação – Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- Sato, T., Miyata, G., 2000. The nutraceutical benefit, Part III: Honey. *Nutrition* 16, 468-469.
- Sheehan, D., 2006. Detection of redox-based modification in two-dimensional electrophoresis proteomic separations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 349, 455–462.
- Silva, M.E., Franco, T.T., 2000. Liquid-liquid extraction of biomolecules in downstream processing - A review paper. *Braz. J. Chem. Eng.*, Mar, 17(1), 1-17.
- Singer, M., Martin, L.D., Vargaftig, B.B., Park, J., Gruber, A.D., Li, Y., Adler, K.B., 2004. A MARCKS-related peptide blocks mucus hypersecretion in a mouse model of asthma. *Nat Med*. 10(2), 193-6.
- Sperber, K., Goswami, S.K., Gollub, E., Mayer, L., Marom, Z. 1991. Mucus secretagogue production by a human macrophage hybridoma. *J.Allergy Clin. Immunol*. 87, 490–498.
- Stenstedt, T.B., Bjellqvist, B., Laird, N., McDowell, M., Olsson, I., Westermeier, R., 2002. *Electrophoresis - Principles and methods*. 80, 6429-60.
- Stonoga, V.I., Freitas, R.J.S.D., 1991. Conteúdo de água e açúcares em mel de abelhas. *Bd. Ceppa*, Curitiba. 9(1), 9-16.
- Suh, H.J., Lee, H., Cho, H.Y., Yang, H.C., 1992. *Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple*. *Journal of the Korean Agricultural Chemical Society*. 35(4), 300-7.
- Swallow, K.W., Low, N.H., 1990. Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high performance liquid chromatography. *Journal of Agric and. Food Chemistry*, 38, 1828 – 1832.
- Tinozzi, S., Venegoni, A., 1978. Effect of bromelain on serum and tissue levels of amoxacylin. *Drug Experimental Clinical Research*. 1, 39-44.

- Upham, J.W., 2003. The role of dendritic cells in immune regulation and allergic airway inflammation. *Respirology* 8, 140–148.
- Vasilescu,, J., Figeys, D., 2006. Mapping protein–protein interactions by mass spectrometry (Review Article). *Current Opinion in Biotechnology*. 17(4), 394-399.
- Veenstra, T.D. 2006. Global and targeted quantitative proteomics for biomarker discovery (Review article). *Journal of Chromatography B*, In Press, Corrected Proof, Available online 4 October.
- Wahdan, H., 1998. Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection*. 26, 26.
- Wanner, A., 1986. Effect of ibatropium bromide on airway mucociliary function. *The American Journal of Medicine*. 81, 23-27.
- Widdicombe, J., 2002. Neuroregulation of cough: implications for drug therapy. *Current Opinion in Pharmacology*. 2, 256-263.
- Wittenbourg, A., Bock, P.R., Hanisch, J., Saller, R., Schneider, B., 2000. Comparative epidemiological study in patients with rheumatic diseases illustrated in a example of a treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs versus an oral enzyme combination preparation. *Arzneimittel-Forschung*, 50, 728–738.
- Xie, Q.M., Deng, J.F., Deng, Y.M., Shao, C.S., Zhang, H., Ke, C.K. 2006. Effects of cryptoporus polysaccharide on rat allergic rhinitis associated with inhibiting eotaxin mRNA expression. *J Ethnopharmacol*. 107(3), 424-30.
- Yamagata, A., Kristensen, D.B., Takeda, Y., Miyamoto, Y., Okada, K., Inamatsu, M., Yoshizato, K., 2002. Mapping of phosphorylated proteins on two-dimensional polyacrylamide gels using protein phosphatase. *Proteomics*. 2(9), 1267-76.
- Yaniv, Z., Rudich, M., 1996. *Bee Products*. Plenum Press, New York. 232.
- Zumlai, A., Lulat, A., 1989. Honey, a remedy rediscovered. *Journal of Royal Society Medicine*, 83, 384-385.

5. ARTIGO*

THERAPEUTIC EFFECTS OF PINEAPPLE (ANANAS COMOSUS) AND HONEY ON ALLERGEN-INDUCED ALLERGIC AIRWAY INFLAMMATION IN RAT MODEL

HUMBERTO GONÇALVES BERTÃO^{1,2}

CARMELITA BEZERRA DE LIMA CAVALCANTI¹

MARIA DO CARMO BARROS PIMENTEL^{1,2}

MARIA ELIZABETH CAVALCANTE CHAVES^{1,2}

JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO^{1,2}

1. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); 2. Departamento de Bioquímica – CCB/UFPE.

Corresponding author: - Jose Luiz de Lima Filho: Laboratorio de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Av. Prof. Moraes Rêgo s/n, Campus Universitario - 50732-901, Recife, PE, Brazil. Tel: +55 81 21012504; FAX+ 55 81 21268485. E-mail: joseluiz60@gmail.com

* To be submitted to *Respiratory Physiology & Neurobiology*

ABSTRACT

Bee honey presents anti-septic and bactericidal properties, while raw extract of pineapple (*Ananas comosus* L.) contains a complex mixture of proteases, called bromelain, that has important effects mucolytic and fluidifying on airway secretions. The aim of this work was to study the effect of pineapple and honey, a phytotherapeutic product, on lung tissue and broncoalveolar lavage samples in an animal model of inflammation of the respiratory tract. Male *Wistar* rats were pre-sensitized with of ovalbumin (OVA). After sensitization, the rats were treated with 2ml of syrup or 2ml 0,9% NaCl solution (control). The lungs were biopsed and broncoalveolar lavage fluid were collected and processed for dimensional electrophoresis and histopathological analysis respectively. The lung tissue of treated group showed reduced amounts of intracellular deposits of glycosaminoglycans when compared with animals in sensitized group. The electrophoretic profiles of the proteins in broncoalveolar specimens of the different groups studied demonstrated small alterations, only in the amounts of proteins of low molecular mass in the alkaline pH region after isoelectric focusing (IEF). Meanwhile, the lung tissue specimens of the groups were very similar. The results obtained suggest that there was a decrease in mucus production by bronchial epithelium cells in animals treated with syrup, but these alterations did not appear to have influenced the lung protein profile of treated animals compared to controls.

Introduction

The World Health Organization (WHO), through its Health for All 2000 program, has been encouraged the development and utilization of phytotherapeutic products. The proposal was well accepted in Brazil because of a lack of a national phytopharmaceutical industry, where only 23% of the population has access to commercialized popular medicines, despite the tradition of the low-income population to utilize medicinal products of plant origin.

HEBRON S.A. in Caruaru-PE, Brazil has developed a medicinal syrup using a combination of bee honey and raw extract of *Ananas comosus* (pineapple), which has been utilized as a mucolytic and fluidifying agent for managing secretions from bronchial tubes and upper airways.

Bee honey used as a therapeutic coadjuvant, as well as being a very popular food. The sugars in honey consist of mainly monosaccharides, varying from 85% to 95% of the total, where fructose and glucose are the main one (Horn et al., 1996). Some reports describe that other monosaccharides are also present, however, in small amounts which are related to the floral origin of the honey, including xylose, ribose, arabinose, mannose and galactose (Swallow & Low, 1990; Astwood Lee & Manley-Harris, 1998).

Various medicinal properties are attributed to honey in popular medicine, and numerous scientific works have shown evidence of its antimicrobial activity, perhaps its principal medicinal effect. This biological activity appears to be due to not just one component but several, whose interactions are responsible for such activity (Sato et al., 2000). Antiseptic properties have also been attributed to honey, such that it is utilized as a coadjuvant agent in various prophylactic treatments (Stonoga & Freitas, 1991). The latter antimicrobial property is due to physical factors, namely its high osmolarity and acidity, and to chemical factors, related to the presence of inhibitory substances including hydrogen peroxide and of volatile substances such as flavonoids and phenolic acids (Molan, 1992; Wahdan, 1998).

Other biological effects reported for bee honey are antifungal (Efem et al., 1993), wound-healing (Gupta et al., 1993) and promotion of epithelial tissue growth at the periphery of wounds (Efem, 1988). New studies have demonstrated that it acts also as an antioxidant by binding free oxygen radicals (Cutler et al., 2001).

Brazil is one the world's leading producers of pineapple, holding the first place in South America and ranking third in the world. *Ananas comosus* is the best known the species of cultivated pineapple, with *Perola* and "Smooth cayenne" being the cultivars of greatest agricultural interest and the most cultivated (Morgado, 2004).

The fruit is the most commercialized part of pineapple, however this fraction represents only 65% of the total plant. Meanwhile the rest, the stem, leaves, husk and crown, is considered agricultural waste, and because of that represents a great economic loss (Borges et al., 2004).

The pineapple is the best-known member of the family *Bromeliaceae*, from which is obtained a protein extract called bromelain. Bromelain is a complex natural mixture typically derived from the stem, fruit and leaves of the pineapple, containing a large amount of proteolytic enzymes. Rowan and coworkers (1990) showed that bromelain from the fruit (E.C. 3.4.22.33) has greater proteolytic activity than stem bromelain (E.C. 3.4.22.32). The commercial product available and the nutritional preparations of bromelain contain predominantly bromelain from the stem. Although bromelain from the fruit has greater proteolytic activity, that from the stem shows better stability with respect to spontaneous inactivation (Hale *et. al*, 2005). Bromelain has been widely commercialized throughout the world as a nutritional supplement to promote digestion, as an anti-inflammatory medicine for horses (Hale, 2004) and to increase the absorption of antibiotics (Friesen *et al.*, 1987).

Some experiments have shown that bromelain has a fluidifying action on bronchial secretions (Silva *et. al.*, 2000), is able to activate macrophages and natural killer cells (Engwerda et al., 2001a), and also to modulate the immune response of T and B cells *in vitro* and *in vivo* (Engwerda et al., 2001b).

The aim of this work was to study the effect of medicinal syrup prepared from bee honey and pineapple extract on lung tissue and bronchoalveolar lavage samples in an animal model for inflammation of the respiratory tract.

Materials and Methods

Animals - Male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia), 2 months old and weighing approximately 200g, were obtained from the Animal House of the Department of Nutrition of the Universidade Federal de Pernambuco. The animals were kept in metabolic cages with milk, autoclaved diet, acidified water and rat chow *ad libitum* (LABINA[®], Purina do Brasil S.A., Recife-PE, Brazil). A 12-h light/dark period and temperature of 26°C were provided. The animals were divided into four groups: Group I = Control, not sensitized (2 animals); Group II = Control, sensitized (2 animals); Group III = sensitized and treated with saline (6 animals) and Group IV = sensitized and treated with the syrup (6 animals). The experimental protocol was submitted to and approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Universidade Federal de Pernambuco according to Decree 01/06 (**Addendum 1**).

Sensitization with ovalbumin - Animals of Groups II, III and IV were pre-sensitized with 2 intraperitoneal injections (200 µl) of 1%(w/v) ovalbumin (OVA) with an interval of 10 days. Starting on the 20th day after the beginning of the experiments, the animals were sensitized with 3 intranasal applications (50 µl) of OVA solution every 10 days according to Inman et al. (1999).

Treatment with the syrup - After sensitization, animals in Group IV received by orogastric gavage 2ml of the medicinal syrup with bee honey and crude extract of pineapple 3 times a day, and those in Group III 2 ml of saline (0.9% (w/v) NaCl) under the same conditions. Every two days after the beginning of the treatment, two animals from each of the two above groups were sacrificed. Initially, animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of 5 mg of sodium pentobarbital and sacrificed by cervical dislocation. Bronco-alveolar lavage was performed with 5 ml of saline. Lungs were removed surgically, and one part was stored at -80°C and the other part placed in buffered 10% (v/v) formalin. Animals in Groups I and II were sacrificed on the day on which treatment was begun in Groups III and IV.

Histopathological analysis - Lung fragments in 10% formalin were submitted to routine histology and embedded in paraffin. Sections of 4 µm thickness were mounted on albuminized slides and stained with hematoxylin/eosin (HE) (Lison, 1960; Michalany, 1980), alcian blue (AB) at pH 2.5 and periodic acid Schiff reagent (PAS), (Hayashi, T. 2004), and evaluated of light microscope.

Preparation of samples for 2-dimensional electrophoresis – A total of 200 mg of lung tissue were ground in mortar with liquid nitrogen and extracted with a solution containing 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA), 0.3% (w/v) dithiothreitol (DTT) in acetone. Sample was kept at -20°C overnight. On the next day, the sample was sonicated (Vibracell Branson-Mod. CV17, São Paulo, Brazil) at 40w and 50 MHz for 3 cycles of 10-min intervals on an ice bath. After centrifugation at 10,000 x g, at 4°C for 20 min, the precipitate was washed with chilled acetone 3 times, dried in a dessicator and solubilized in 9M urea with 2% (w/v) CHAPS{3-[(3cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate}. The proteins from broncoalveolar lavage samples were precipitated with 20% trichloroacetic acid with 0.3% DTT in acetone at a proportion of 1:1 and centrifuged at 10,000 x g, at 4°C for 20 min. The precipitate was washed 3 times with chilled acetone, dried and resuspended in 9M urea with 2% CHAPS. Protein concentration was determined by the Lowry method (1951).

Two-dimensional electrophoresis – Samples, each containing 200 µg of protein from broncoalveolar lavage (BAL) fluid or lung tissue, were solubilized in 125µl reconstitution solution {9M urea, 2% CHAPS, 1% DTT, 2% (v/v) IPG (immobilized pH gradient buffer) and 0.002% (w/v) bromophenol blue}. Immobiline Drystrips (Amersham Biosciences, Sweden) of 7 cm, pH 3-10, were rehydrated overnight at 26°C.

Isoelectric focusing was performed with the Multiphor II system (Amersham Biosciences, Sweden) according to the manual 2-D Electrophoresis Using Immobilized pH Gradients – Principles and Methods (Amersham Biosciences, Sweden). At the end of focusing, the strips were stored at -80°C until the following day, thawed and equilibrated with DTT (10 mg/ml) and iodoacetamide (25mg/ml), 15 min each incubation at room temperature. In the second dimension, proteins were separated by 10% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) at a constant current of 20 mA, using a vertical system (Atto, Tokyo, Japan).

Visualization of proteins and image analysis – Proteins in gels were stained with solution of Coomassie Brilliant Blue (0.06% CBB G-250 in 40% (v/v) methanol and 7 % acetic acid) and then destained in 40% methanol--7% acetic acid). Gel images were digitized and analyzed using the program Image Master™ (2D Platinum software from Amersham Biosciences, Sweden).

Results and Discussion

The hypersecretion of mucus in the respiratory tract and the metaplasia of mucus-producing cells in the epithelium of airways are found in obstructive pulmonary disorders associated with inflammation of the lung (Yanagihara, K. et al. 2001; Aikawa, T.S., et al. 1992; Larivee, P. et al. 1994). A large number of mediators have been described as stimulators of mucus secretion, including histamine, prostaglandins, leukotrienes, platelet activating factor and eosinophilic cationic protein (Lundgren J.D. et al. 1991; Wanner, A. M et al. 1996). In this work, mucus secretion was induced by sensitization with ovalbumin. Previously, various investigators have used this sensitization method to study asthma, allergic rhinitis and the use of drugs in the treatment of pulmonary inflammation (Ng, N et al., 2006; Saito, H. et al. 2004; Xie, Layton, G.T. et al., 2001; Q. M. et al., 1996).

Proteomic analysis has been a very useful tool in the study of alterations in the expression of proteins due to trauma, inflammatory stages, response to treatment and particularly inflammatory diseases of the respiratory tract, such as asthma, rhinitis and bronchitis, in addition to the discovery of biomarkers, pharmacological targets for therapy and factors involved in the inflammatory response (Candiano, G. et al. 2007; Magi, B. et al. 2006; de Torre, C. et al. 2006; Ghosh et al., 2006; Ghafouri, B. 2006). Proteomic studies require a multidisciplinary approach, with a convergence of techniques and methods increasingly more refined, which allow the identification and quantification of small amounts of proteins in the femtomole range. This is particularly facilitated by the use of 2-dimensional electrophoresis, in which complex mixtures of proteins can be resolved and analyzed by image programs, and the target proteins identified by mass spectrometry (MS), together with the utilization of information that can be obtained from protein databanks.

Figure 1-A shows the 2-dimensional electrophoretic profile of proteins extracted from lungs of rats sensitized with ovalbumin (1a), sensitized and saline treated (2a) and sensitized and syrup treated (3a). Comparison of the three gels demonstrated a great similarity in pulmonary proteins expressed by the control and treated (saline and syrup) animals. Some proteins did appear to differ slightly in quantity expressed in relation to the total proteins. The distribution of the majority of pulmonary proteins with a molecular mass above 29 kDa occurred in the pH range of 4.5 to 8.0, while small proteins had their isoelectric points (pI) in the pH range of 7.5 to 10.

Analytical gels obtained by image analysis using the program Image Master™ 2D Platinum (Figure 1-B), assures the reproducibility of 2-dimensional electrophoresis of lung tissue carried out in duplicate by the pairing of spots (Figures 1b, 2b and 3b).

The results of 2-dimensional electrophoresis of the broncoalveolar lavage samples in the three groups studied (Figure 2-A), showed some similarities in the electrophoretic profile of the proteins with a molecular mass over 20 kDa, in the pH region of 4 to 7.5. The groups treated with saline (Group III) and syrup (Group IV) showed a very alkaline protein range (pH 7.5 to 10), bands over 66 kDa, with the same molecular mass, which were not observed in the broncoalveolar lavage of animals sensitized with ovalbumin but not given any treatment (Group II). MS data, which are not yet published and are currently being evaluated, revealed changes in proteins of low molecular mass, possibly linked with the immune response. Candiano et al. (2007) suggested that the surface of the epithelium functions as a barrier against injury to the tissue, where it can modulate the secretion of proteins in certain pathological conditions.

Recently, Singer et al. (2004) observed that the secretion of mucus by epithelial cells from human lung requires a protein called MARCKS (myristoylated, alanine-rich C-kinase substrate), which has a molecular mass between 80 and 86 KDa and which is a target for phosphorylation by protein kinase C. In this study, authors found mucin granules inside epithelial cells of mice sensitized with OVA. Mucin is a glycoprotein component of mucus whose hypersecretion is a risk factor in various respiratory diseases.

The results of 2-dimensional electrophoresis show that samples from broncoalveolar lavage of all the groups studied had the same electrophoretic profile of their constituent proteins with a molecular mass above 20 kDa. The proteins situated in the molecular mass range of 14 to 20 kDa with alkaline isoelectric points of pH 7.5 to 10 were found to increase in concentration in Groups II and IV, while such proteins were not detected in group III. The aim of further studies is to identify these proteins by mass spectrometry using databanks available on the internet.

The gels from broncoalveolar lavage revealed that there is an increase in the concentration of proteins in the pH range of 4 to 7.5 with a molecular mass above 66 kDa. These proteins could be products released by secretory cells of the bronchial epithelium (glycosaminoglycans).

The respiratory system is possibly one the most sensitive to the action of medicinal plants. All the respiratory organs receive great benefits from the use of plant extracts. Their

action is not limited to alleviating disease symptoms; plant extracts also help remove excess mucus deposited inside respiratory passages (Mello et al., 2005).

The normal epithelium of respiratory passages in adults is complex and still not well understood. However, it is known that various stimuli increase the number of mucus-secreting cells at locations that normally exist (hyperplasia) or cause metaplasia. Glandular hypertrophy, hyperplasia of mucus-secreting cells of the bronchial tubes and metaplasia in the bronchioles are prominent characteristics of chronic obstructive disease (Williams et al., 2006).

Metaplasia of mucosal cells and hypersecretion of mucus are characteristics of various pulmonary diseases, including asthma, chronic bronchitis, allergy and cystic fibrosis (Boat et al., 1994).

The stimuli that increase the number of mucus-secreting cells include allergic sensitization, bacterial products, chemical irritants, chemokines, cytokines, growth factors, oxidants, proteases, and viral infection (Rose et al., 2006; Holtzman et al., 2006).

The histopathological results demonstrate that significant alterations occurred in the intracellular deposits of glycosaminoglycans bronchial epithelium cells in animals sensitized and treated with bee honey and crude extract of pineapple (**Figure 3**).

The animals sensitized with ovalbumin - OVA (group II) and sensitized and treated with saline (Group III) showed the same cellular behavior (tissue architecture). These groups when compared with the control group (Group I), had decreased amounts of intracellular deposits of mucopolysaccharides (glycosaminoglycans) in bronchial epithelium cells.

The results obtained were unexpected, because the animals in Groups II and III should have shown increased production of mucopolysaccharides due to sensitization with ovalbumin (OVA) and saline treatment, respectively, but the animals in Group I were not submitted to bronchoalveolar lavage (BAL).

Since these animals were not submitted to BAL, they retained their normal content of intracellular deposits. However, since these epithelial cells are exocrine cells, the groups submitted to BAL lost part of their intracellular mucopolysaccharide content, explaining the unexpected observations.

In comparing the animals in Groups II and III that were sensitized with those in Group IV that were sensitized and treated with bee honey and crude extract of pineapple, the latter group showed reduced amounts of intracellular deposits of glycosaminoglycans. This finding was considered to be associated with the action of the phytotherapeutic product, since all

these groups had been submitted to BAL and the reduction observed was not of extracellular mucus but intracellular deposits.

The animals in Group IV, compared to those in Groups II and III, had bronchial epithelium cells with altered morphology, showing a significant reduction in the amount of intracellular deposits of glycosaminoglycans, accompanied by cell destruction (**Figure 4**).

The cellular changes found in Group IV suggest that the phytotherapeutic product is toxic to the cells of bronchial epithelium, or that some component in the product causes a change in cell metabolism that leads to inhibition of enzymes involved in mucin synthesis.

King & Rubin (2002) demonstrated that bromelain has the capacity to diminish the viscosity of secretions from respiratory mucosae, through its proteolytic activity and also its thiol-reductase activity which breaks inter- and intra-strand disulfide bridges thereby decreasing the bonds responsible for the formation of the mucin mesh, an activity similar to that of N-acetylcysteine.

Referências Bibliográficas

- Aikawa, T.S., Shimura, S., Hidetada, M.E., Takishima, T., 1992. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airway of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest* 101, 916–921.
- Astwood, K., Lee, B., Manley-Harris, M., 1998. Oligosaccharides in New Zealand honeydew honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 4958 – 4962.
- Boat, T.F., Cheng, P.W., Leigh, M.W. 1994. Biochemistry of mucus. *In* Airway Secretion: Physiological Bases for the Control of Mucus Hypersecretion. S. Shimura and T. Takishima, editors. Marcel Dekker, New York. 217–282
- Borges, C.D., Chim, J.F., Leitão, A.M., Pereira, E., Luviélmo, M.M., 2004. Produção de suco de abacaxi obtido a partir dos resíduos da indústria conserveira. *B CEPPA* 22(1), 25-34.
- Candiano, G., Bruschi, M., Pedemonte, N., Musante, L., Ravazzolo, R., Liberatori, S., Bini, L., Galletta, L.J., Zegarra-Moran, O., 2007. Proteomic analysis of the airway surface liquid: modulation by proinflammatory cytokines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 292(1), L185.
- Cutler, D., Barbier, A., Pestell, K., 2001. Radical honey. *Trends Pharmacology Science*. 22(9), 449.
- de Torre, C., Ying, S.X., Munson, P.J., Meduri, G.U., Suffredini, A.F., 2006. Proteomic analysis of inflammatory biomarkers in bronchoalveolar lavage. *Proteomics*. 6(13), 3949-57.
- Efem, S.E.E., 1993. Recent advances in the management of Fournier's gangrene: preliminary observations. *Surgery*, 113, 200-204.
- Engwerda, C.R., Andrew, D., Ladhams, A., Mynott, T.L., 2001b. Bromelain Modulates T Cell and B Cell Immune Responses in Vitro and in Vivo. *Cellular Immunology* 210, 66–75.
- Engwerda, C.R., Andrew, D., Murphy, M., Mynott, T.L., 2001a. Bromelain Activates Murine Macrophages and Natural Killer Cells in Vitro. *Cellular Immunology*. 210, 5–10.
- Friesen, A., Schilling, A., Gofstetter, A., Adam, D., 1987. Tetracyclin-konzentration im Prostata-Sekret. *Z. Antimikrobian Antineoplastik Chirurgie*, 2, 61-65.
- Ghosh, S., Janocha, A.J., Aronica, M.A., Swaidani, S., Comhair, S.A., Xu, W., Zheng, L., Kaveti, S., Kinter, M., Hazen, S.L., Erzurum, S.C., 2006. Nitrotyrosine proteome survey in asthma identifies oxidative mechanism of catalase inactivation. *J Immunol*. 176(9), 5587-97.
- Gupta, S.K., Sinch, H., Varshney, A.C., Prakash, P., Singh, S.P., 1993. Biochemical alterations during wound healing under influence of natural honey and ampicillin in buffaloes. *Indian Veterinary Journal*. 70, 45-7.
- Hale, L.P., Greer, P.K., Trinh, C.T. James, C.L., 2005. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *International immunopharmacology*. 5, 783-793.

- Hale, L.P., 2004. Proteolytic activity and immunogenicity of oral bromelain within the gastrointestinal tract of mice. *International Immunopharmacology*. 4, 255-264.
- Hayashi, T., Ishii, A., Nakai, S., 2004. Ultrastructure of goblet-cell metaplasia from clara cell in the allergic asthmatic inflammation in a mouse model of asthma in vivo. *Virchows Arch*. 444, 66-73.
- Holtzman M.J., Battaile J.T., Patel A.C. 2006. Immunogenetic programs for viral induction of mucous cell metaplasia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 35, 29–39.
- Horn, H., Durán, J.E.T., Cortopassi-Laurino, M., Issa, M.R.C., Toledo, V.A.A., Bastos, E., Soares, A.E.E., 1996. Méis brasileiros: resultados de análise físico-químicas e palinológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11. Teresina, Anais. Teresina: CBA, p. 403-429.
- Inman, M.D., Ellis R., Wattie, J., Denburg, J.A., O’Byrne, P.M., 1999. Allergen-Induced Increase in Airway Responsiveness, Airway Eosinophilia, and Bone-Marrow Eosinophil Progenitors in Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 21, 473–479.
- King, M., Rubin, B.K., 2002. Pharmacological approaches to discovery and development of new mucolytic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54, 1475-1490.
- Larivee, P., Levine, S.J., Rieves, R.D., Shelhamer, J.H., 1994. Airway inflammation and mucus hypersecretion. In *Airway Secretion: Physiological Bases for the Control of Mucus Hypersecretion*. S. Shimura and T. Takishima, editors. Marcel Dekker, New York. 469–511.
- Layton, G.T., Harris, S.J., Bland, F.A., Lee, S.R., Fearn, S., Kaleta, J., Wood, M.L., Bond, A., Ward, G. 2001. Therapeutic effects of cysteine protease inhibition in allergic lung inflammation: inhibition of allergen-specific T lymphocyte migration. *Inflamm Res*. 50(8), 400-8.
- Lison, L., 1960. *Histochimie et cytochimie animales*. Paris, Gauthiers – Villars. 842.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Anal. Biochem*. 193, 265-275.
- Lundgren, J.D., Davey, R.T., Lundgren, B., Mullol, J., Marom, Z., Logun, C., Baraniuk, J., Kaliner, M.A., Shelhamer, J.H., 1991. Eosinophil cationic protein stimulates and major basic protein inhibits airway mucus secretion. *J. Allergy Clin. Immunol*. 87, 689–698.
- Magi, B., Bargagli, E., Bini, L., Rottoli, P., 2006. Proteome analysis of bronchoalveolar lavage in lung diseases. *Proteomics*. 6(23), 6354-69.
- Mello, F.B., MELLO, J.R.B., 2005. Antitussive and expectorant effects of two phytotherapies in the brazilian market. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33(2), 161-167.
- Michallany, J., 1990. *Técnica Histológica em Anatomia Patológica*. 2º ed. São Paulo, Gráfica e Editora Michalany. 277.

- Molan, P.C., 1992. The antibacterial activity of honey. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, 73(1), 5-28.
- Morgado, I.F., Aquino, C.N.P., Terra, D.C.T., 2004. Economic aspects of the pineapple culture: seasonally of prices in Rio de Janeiro state. *Rev. Bras. Frutic.* 26(1), 44-47.
- Ng, N., Lam, D., Paulus, P., Batzer, G., Horner, A.A. 2006. House dust extracts have both TH2 adjuvant and tolerogenic activities. *J Allergy Clin Immunol.* 117(5), 1074-81
- Rose M.C., Voynow J.A. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev.* 86, 245–278.
- Rowan, A.D., Buttle, D.J., Barret, A. J., 1990. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochemical journal.* 266, n.3, 869-75.
- Saito, H., Morikawa, H., Howie, K., Crawford, L., Baatjes, A.J., Denburg, E., Cyr, M.M., Denburg, J.A. 2004. Effects of a cysteinyl leukotriene receptor antagonist on eosinophil recruitment in experimental allergic rhinitis. *Immunology.* 113(2), 246-52.
- Sato, T., Miyata, G., 2000. The nutraceutical benefit, Part III: Honey. *Nutrition* 16, 468-469.
- Silva, J.A.N.; Santos, R.C.; Almeida, D.K.A. 2000a. Ação proteolítica da bromelina na liquefação da secreção brônquica. XLI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Recife, PE, Brasil, FM225, p.270.
- Singer, M., Martin, L.D., Vargafting, B.B., Park, J., Gruber, A.D., Li, Y., Adler, K.B., 2004. A MARCS-related peptide blocks muçus hypersecretion in a mouse model of asthma. *Nature Medicine* 10(2), 193-196.
- Stonoga, V.I., Freitas, R.J.S.D., 1991. Conteúdo de água e açúcares em mel de abelhas. *Bd. Ceppa*, Curitiba. 9(1), 9-16.
- Swallow, K. W., Low, N. H., 1990. Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high performance liquid chromatography. *Journal of Agric and. Food Chemistry.* 38, 1828 – 1832.
- Wahdan, H., 1998. Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection.* 26 - 26.
- Wanner, A., Salathe, M., O’Riordan, T., 1996. Mucociliary clearance in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 1868–1902.
- Williams, OW, Sharafkhaneh A, Kim V, Dickey BF, Evans CM. 2006. Airway mucus: from production to secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 34, 527–536.
- Xie, Q.M., Deng, J.F., Deng, Y.M., Shao, C.S., Zhang, H., Ke, C.K. 2006. Effects of cryptoporus polysaccharide on rat allergic rhinitis associated with inhibiting eotaxin mRNA expression. *J Ethnopharmacol.* 107(3), 424-30.
- Yanagihara, K., Seki, M., Cheng, P.W., 2001. Lipopolysaccharide Induces Mucus Cell Metaplasia in Mouse Lung *Am. J Resp. Cell Mol. Biol.* 24, 66-73.

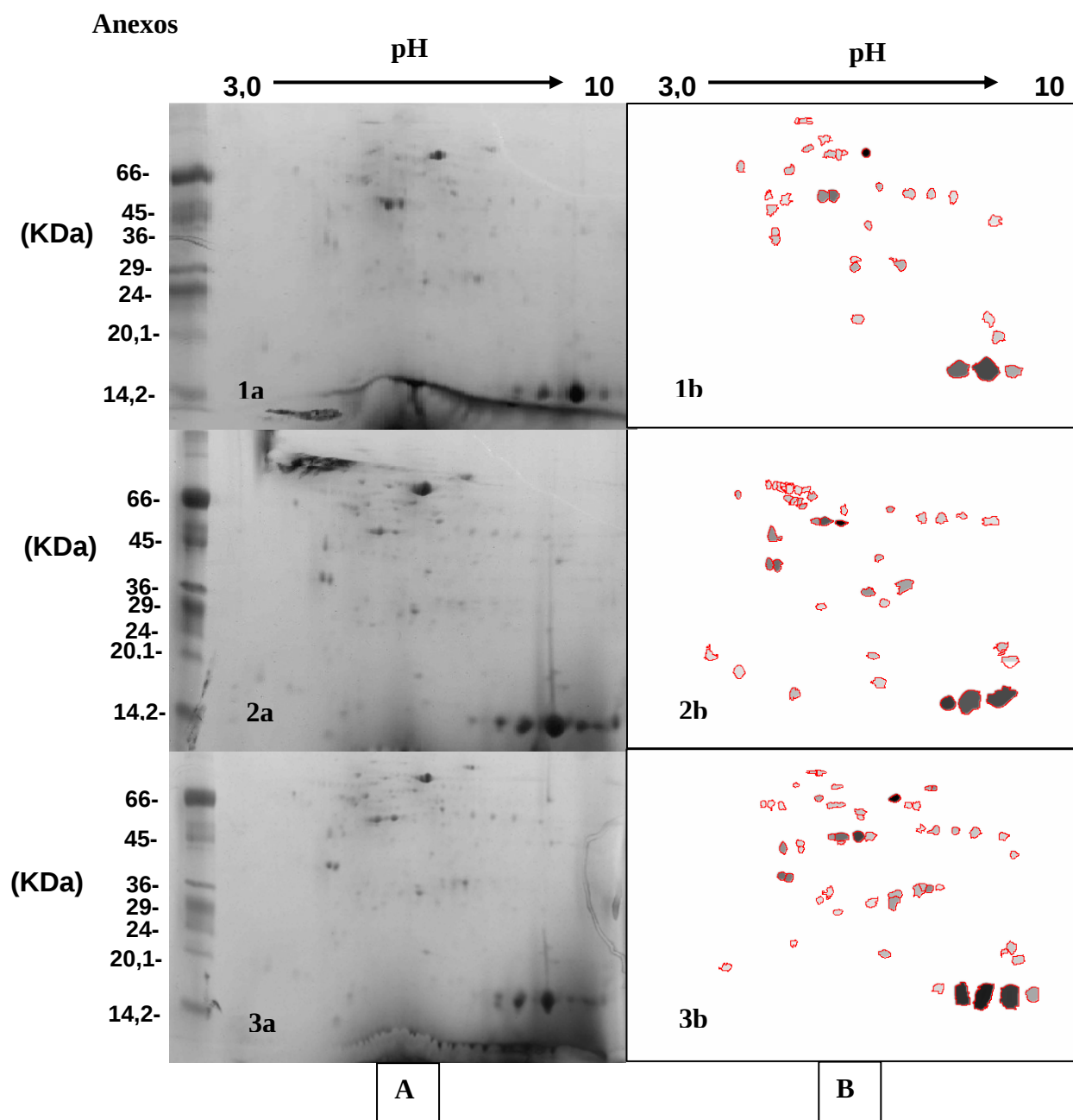


Figura 1. Eletroforese bidimensional (A) e gel analítico (B) de pulmão de rato sensibilizado com ovoalbumina (Grupo II-1a, 1b); sensibilizado com ovalbumina tratados com salina (Grupo III-2a, 2b); sensibilizado com ovalbumina tratados com 2 ml do xarope mel de abelha + abacaxi (Grupo IV-3a, 3b). Condições da eletroforese bidimensional: 1º dimensão (IEF) pH 3-10; 2º dimensão SDS-PAGE 10% corado com Comassie brilhant blue.

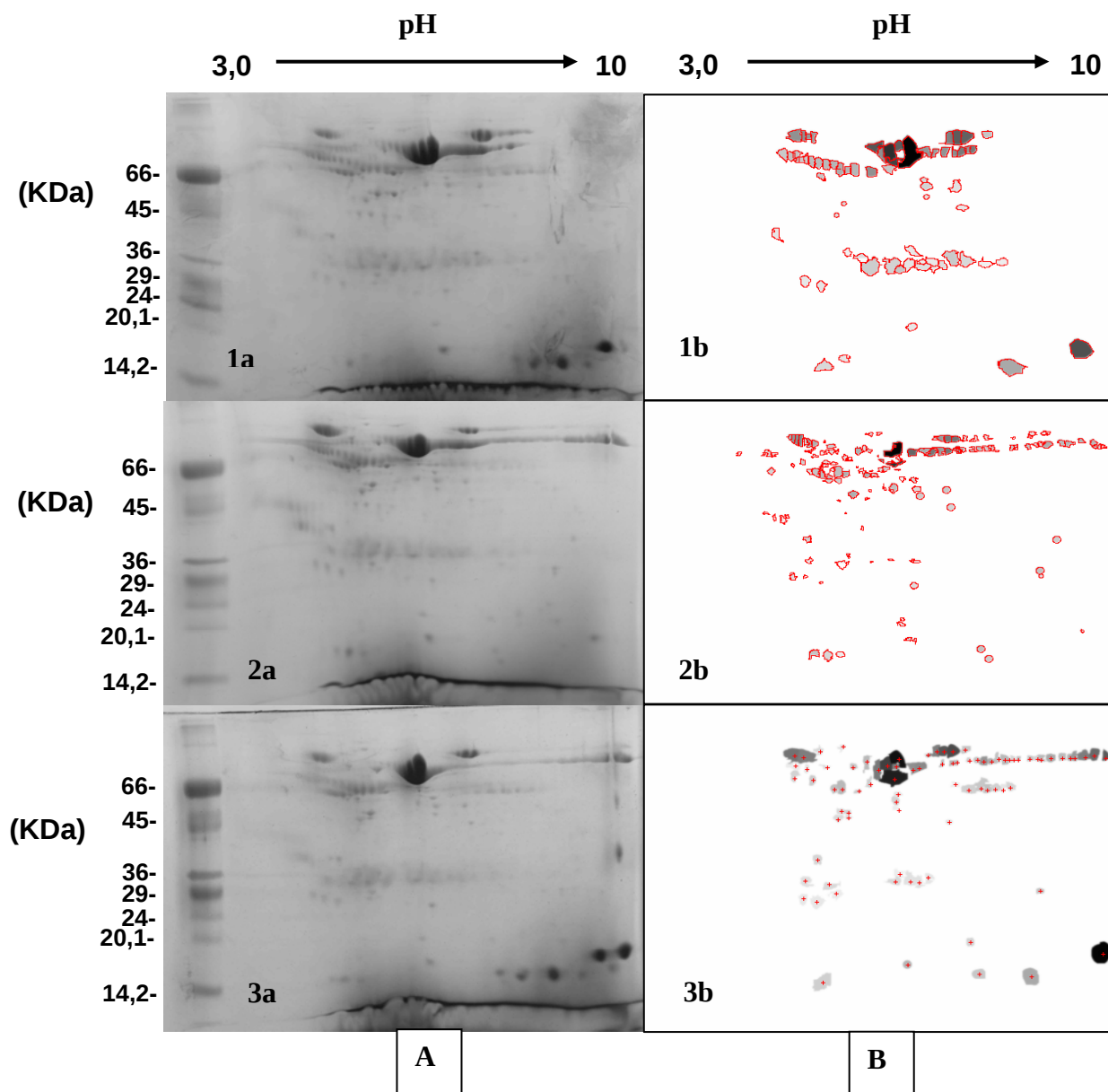


Figura 2. Eletroforese bidimensional (A) e gel analítico (B) do lavado bronco-alveolar de rato sensibilizado com ovoalbumina (Grupo II-1a, 1b); sensibilizado com ovoalbumina tratados com salina (Grupo III-2a, 2b); sensibilizado com ovoalbumina tratados com 2 ml do xarope mel de abelha + abacaxi (Grupo IV-3a, 3b). Condições da eletroforese bidimensional: 1º dimensão (IEF) pH 3-10; 2º dimensão SDS-PAGE 10% corado com Comassie brilliant blue.

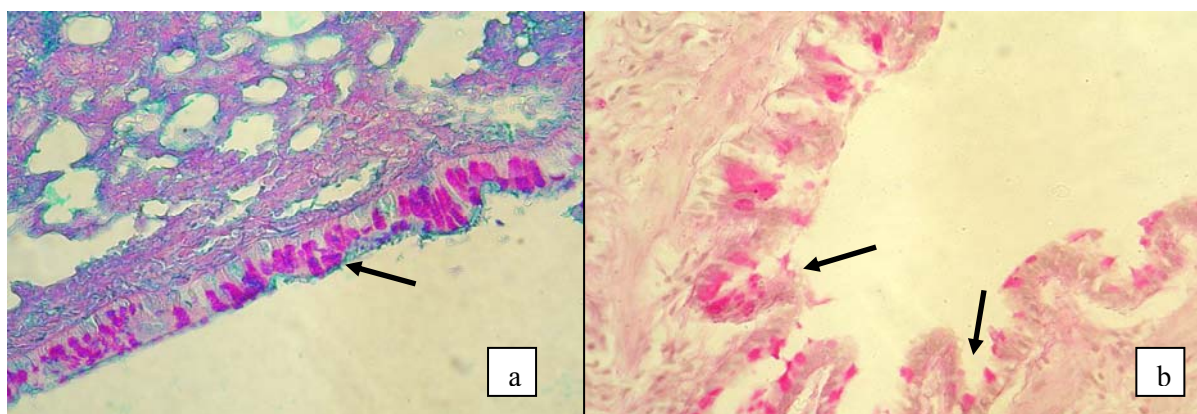


Figura 3 – Fotomicrografia de pulmão de ratos sem e com sensibilização pela ovalbumina. (a) Animais sem sensibilização, células do epitélio brônquico com depósitos intracelulares de glicosaminoglicanos (seta). Coloração PAS e Alcian Blue (400x); (b) Animais sensibilizados com ovalbumina mostrando o epitélio brônquico com uma redução nos depósitos intracelulares de glicosaminoglicanos (setas). Coloração PAS (magnificação 400x).

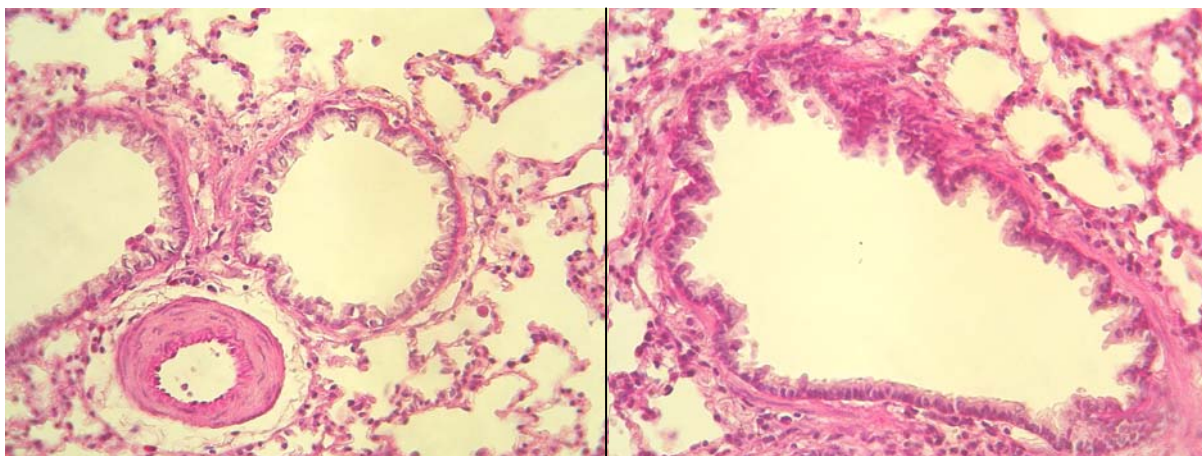


Figura 4 – Fotomicrografias de pulmão de rato sensibilizados com ovoalbumina e tratados com Melxi[®] exibindo uma redução dos depósitos intracelulares de glicosaminoglicanos pelas células do epitélio brônquico, acompanhado de um desgaste celular. Coloração PAS (magnificação 200x e 400x respectivamente).

6. CONCLUSÕES GERAIS

- Os depósitos de glicosaminoglicanos apresentaram-se reduzidos nos pulmões dos animais sensibilizados com ovalbumina (Grupo II), quando comparados com os animais controles não sensibilizados (Grupo I), que não foram submetidos a lavagem bronco-alveolar.
- Os animais tratados com o Melxi® (Grupo IV) apresentaram diminuição dos depósitos intracelulares dos glicosaminoglicanos acompanhada de desgaste celular do epitélio brônquico, quando comparados com os tratados com a salina (Grupo III);
- Os animais sensibilizados (Grupo II) e os sensibilizados e tratados com salina (Grupo III) apresentaram a mesma arquitetura tecidual pulmonar;
- As eletroforeses bidimensionais dos pulmões sensibilizados (Grupo II), e sensibilizados e tratados com salina (Grupos III) e com Melxi® (Grupo IV) apresentaram perfis bastante semelhantes, porém com aparente alteração nas concentrações de algumas proteínas;
- As eletroforeses bidimensionais dos lavados bronco-alveolares dos animais sensibilizados e tratados com salina (Grupos III) e com Melxi® (Grupo IV) apresentaram proteínas numa mesma faixa de pH alcalino, com massa molecular acima de 66 KDa, o que não foi visualizado nos animais sensibilizados (Grupo II);
- O “software” Image Master™ 2D Platinum (Amersham Bioscience) utilizado se mostrou eficiente na identificação das proteínas do pulmão e do lavado bronco-alveolar com pareamento real dos “spots” dos géis em duplicata.

ANEXOS

1. Aprovação no comitê de ética

2. Descrição do método para determinação de proteínas totais - Método de Lowry (1951)

3. Trabalhos desenvolvidos durante o mestrado

4. Normas e instruções para publicação na revista Respiratory Physiology & Neurobiology;

Anexo 1. Aprovação no comitê de ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
telefone: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 01/06

Recife, 09 de janeiro de 2006

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da UFPE
Para: Maria Isaura Pereira de Oliveira
LIKA - UFPE

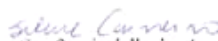
Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEa-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEa sobre o projeto de pesquisa intitulado "**Atividade Antioxidante *in vivo* do xarope Melxi**".

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEa-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais utilizados.

Atenciosamente,


Silene Carneiro do Nascimento
Presidente CEEa



CCB: Integrar para desenvolver

Anexo 2. Trabalhos desenvolvidos durante o mestrado

Humberto Gonçalves Bertão, Mario Ribeiro de Melo-Junior, Jorge Luiz Silva Araújo-Filho. **Estudo retrospectivo da incidência de meningite meningocócica no estado de Pernambuco no período 2001 a 2003.** X Congresso Nacional de Biomedicina, Goiânia-GO, 2006.

Bertão, H. G.; Pereira, A. S. A.; Cavalcanti, N.L.; Lima-Ribeiro, M. H. M.; Cavalcanti, C. L. B.; Lima-Filho, J. L.; Chaves, M. E. C. **Histopathological analysis of inflammatory disease in the respiratory system of rats treated with the fitoterapic melxi®.** VIII Reunião Regional Nordeste da SBBq, Natal-RN, 6 a 8 de dezembro de 2006.

Pereira, A.S.A.; Bertão, H.G.; Cavalcanti, N.L.; Lima-Filho, J. L.; Chaves, M.E.C. **Biochemical parameters and protein profile of rats treated with different doses of the fitoterapic melxi®.** VIII Reunião Regional Nordeste da SBBq, Natal-RN, 6 a 8 de dezembro de 2006.

Bertão, H.G.; Pereira, A.S.A.; Cavalcanti, N.L.; Lima-Filho, J.L.; Lima-Ribeiro, M.H.M.; Chaves, M.E.C. **Proteomic analysis of inflammatory disease in the respiratory system of rats treated with the fitoterapic melxi®.** 36^a Reunião Anual da SBBq, Salvador-BA, 21 a 25 de maio de 2007.*

* Resumo submetido a 36^a reunião anual da SBBq para avaliação.

ESTUDO RETROSPECTIVO DA INCIDÊNCIA DE MENINGITE MENINGOCÓCICA NO ESTADO DE PERNAMBUCO NO PERÍODO 2001 A 2003

Humberto Gonçalves Bertão¹; Mario Ribeiro de Melo-Junior^{1,2}; Marcos Cezar F. de Paula Machado¹; Renato dos Anjos Souza¹; Jorge Luiz Silva Araújo-Filho¹.

1. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE;
2. Associação Caruaruense de Ensino Superior – ASCES.

Dentre as meningites bacterianas, destaca-se a meningite meningocócica, causada pela bactéria *Neisseria meningitidis*, comumente conhecida como meningococo. As consequências desta infecção, causadas por essa bactéria, variam em um grande espectro clínico, desde o estado de portador crônico em nasofaringe ou bacteremia isolada, até casos de evolução fulminante, com alta letalidade. Com base nestes dados, o presente estudo objetivou avaliar ocorrência dos casos confirmados da doença meningocócica no estado de Pernambuco nos anos entre 2001 e 2003. Foi realizado um estudo retrospectivo dos casos confirmados de meningite meningocócica através da análise das fichas de investigação epidemiológica do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN). A pesquisa enfocou dados epidemiológicos e microbiológicos da doença como idade, origem do paciente e sorogrupo da bactéria em estudo. Os resultados obtidos indicam que entre 2001 e 2003, foram confirmados 1323 casos de meningite bacteriana, entretanto, em 610 casos (46,10 %) não foi especificada a bactéria causadora. Naqueles casos em que a bactéria foi especificada obteve-se, 538 casos (75,45 %) foram de meningite meningocócica, 99 casos (13,88 %) de meningite pneumocócica, 65 casos (9,11 %) de meningite tuberculosa e 11 casos (1,54 %) de meningite por hemófilo. De acordo com a relação de casos ocorridos e óbitos notificados, observamos que existe uma prevalência destes casos dentro das faixas etárias que vão de 01 a 14 anos, tendo como maiores ocorrências de óbito a faixa que entre 1 a 4 anos. Pode-se concluir mais de 70% dos óbitos ocorreram em crianças, o que é relevante para a situação epidemiológica da doença e deve ser preocupação para os serviços de saúde responsáveis por diagnóstico e tratamento de agravos que estabelecem o índice de morbimortalidade infantil.

HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF INFLAMMATORY DISEASE IN THE RESPIRATORY SYSTEM OF RATS TREATED WITH THE FITOTERAPIC MELXI®

Bertão, H. G.^{1,2}; Pereira, A. S. A.^{1,2}; Cavalcanti, N.L.¹; Lima-Ribeiro, M. H. M.¹; Cavalcanti, C. L. B.¹; Lima-Filho, J. L.^{1,2}; Chaves, M. E. C.^{1,2}

1. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA); 2. Departamento de Bioquímica - UFPE

Melxi® is a fitoterapic containing bee honey associated with crude extract of the pineapple, which presents mucolytic and fluidificant properties, mainly due to the presence bromelain. This project evaluated the effect of the Melxi® in the lung of murinic models through the histopathologic study of the respiratory system. *Wistar* rats were presensitized with two intraperitoneal injections of 1% ovoalbumin (w/v), followed by sensitization with four intranasal applications of the same ovoalbumin solution, in intervals of 10 days. After this time, three animals were sacrificed (controls) and the others rats were divided in two groups: treated (Melxi® 3 times/day) and untreated (0.9% NaCl, 3 times/day). The treatments were done during seven days. The animals were sacrificed, the lungs removed and processed to optic microscopy. Controls and untreated animals presented an increase of the cellularity and of the macrophages in the interalveolar spaces, when compared with treated animals. The reduction in the cellularity and the increase of the alveolar spaces in the rats receiving the Melxi®, suggest a reestablishes of the lung morphophysiologic conditions.

Supported by: CAPES

Key words: Bromelain, Fitoterapic, Melxi, Mucolitic.

BIOCHEMICAL PARAMETERS AND PROTEIN PROFILE OF RATS TREATED WITH DIFFERENT DOSES OF THE FITOTERAPIC MELXI®.

Pereira, A.S.A^{1,2}; Bertão, H.G.^{1,2}; Cavalcanti, N.L.¹; Lima-Filho, J. L.^{1,2}; Chaves, M.E.C^{1,2}

1.Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA); 2. Departamento de Bioquímica, UFPE.

The use of fitoterapic products formulated from natural resources has being used as an alternative form of treatment in some diseases. The Melxi®, a fitoterapic constituted by the crude extract of pineapple and bee honey, contains a protein complex called bromelain. The present study evaluated the effect of different doses of Melxi® on the biochemical parameters and the protein profile of rats treated with the fitoterapic, comparing them with the animals controls. *Wistar* rats were divided in 5 groups. The control group received for orogastric gavage NaCl 0.9%, treated groups received increasing doses of Melxi®. After 7 days, the animals were sacrificed, the blood was collected, centrifugated and the serum used in the biochemical assays for the evaluation of hepatic and renal functions. Results demonstrated that the total protein concentration presented similarity in the 5 analyzed groups. In the treated animals with Melxi® occurred increase of the fraction α -2 and γ -globulin, while was observed a reduction of the fraction α -1. The concentrations of creatinine and potassium were lightly diminished, occurring still a reduction of ALT and AST. The data obtained demonstrated that the use of the Melxi in the conditions of this study did not present toxic effect on liver and kidney functions, although having presented small biochemical variations.

Supported by: CAPES

Key words: Bromelain, Fitoterapic, Melxi, Liver, Kidney.

PROTEOMIC ANALYSIS OF INFLAMMATORY DISEASE IN THE RESPIRATORY SYSTEM OF RATS TREATED WITH THE FITOTERAPIC MELXI®

Bertão, H.G.^{1,2}; Pereira, A.S.A.^{1,2}; Cavalcanti, N.L.¹; Lima-Filho, J.L.^{1,2}; Lima-Ribeiro, M.H.M.¹; Chaves, M.E.C.^{1,2}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA); ²Departamento de Bioquímica–UFPE.

The use of fitoterapics formulated from natural resources present in our native flora has been stimulated in Brazil. The Melxi® is a fitoterapic that associates bee honey with the pineapple crude extract, presenting mucolytic and fluidificant activities. The crude extract of pineapple contains bromelain, a mixture of proteinases derived from the leaves, fruit and stem. Since the Antiquity the honey has been used as antiseptic and bactericide. It is produced by bees (*Apis mellifera*), having as components, 78% of carbohydrates, 0,5% of proteins, 0,2% de lipids, vitamins and minerals. This work evaluated the effect of the Melxi® in the lung and in the bronchoalveolar secretion of rats sensitized with ovalbumin. Two dimension electrophoresis (2D) was used for the investigation of the presence of proteins linked to the inflammatory process. The obtained images were assayed through Image Master 2D Platinum Software. Samples profile from rat lungs showed very similar results. The majority of the spots were concentrated in a molecular weight range between 45-60 kD and pH 4.5-7.5. The bronchoalveolar lavage presented major quantity of proteins above 65 kD. In the groups sensitized with ovoalbumin and sensitized with ovoalbumin and treated with Melxi® were seen proteins with molecular weight 20-14kD, such proteins were not found in the group receiving saline after the sensitization.

Supported by: CAPES

Key words: Bromelain, Fitoterapic, Melxi, 2-D electrophoresis

Anexo 3. Normas e instruções para publicação na revista Respiratory Physiology & Neurobiology

Guide for Authors



Respiratory Physiology & Neurobiology publishes original articles and invited reviews concerning physiology and pathophysiology of respiration in its broadest sense. Although a special focus is on topics in neurobiology, high quality papers in respiratory molecular and cellular biology are also welcome, as are high quality papers in traditional areas, such as mechanics of breathing; gas exchange in lungs, gills, skin, and tissues; acid-base balance; respiration at rest and exercise; respiration in normal and unusual conditions, like high or low pressure or changes of temperature, low ambient oxygen; embryonic and adult respiration; comparative respiratory physiology. Papers on clinical aspects, articles on original methods, as well as theoretical papers are also considered as long as they foster the understanding of respiratory physiology and pathophysiology. Submission of a manuscript for publication implies the transfer of copyright from the author(s) to the publishers.

Types of Contribution

- 1 Original Research Article
- 2 Short communication
- 3 Frontiers review
- 4 Book review
- 5 Letter to the Editor
- 6 Commentary

1 Ordinary Research articles submitted to Respiratory Physiology & Neurobiology should deal with original research which has not been published previously, nor is being considered for publication elsewhere.

2 Short communication provides a rapid publication opportunity (usually 6-8 weeks from receipt of the accepted manuscript by the publisher) for short, concise papers dealing with original material within the scope of the journal. Short communications should not exceed 4 printed pages (about 8 manuscript pages), including up to 2 Figures, 1 Table and up to 10 References. Style of the manuscripts must otherwise conform with that of ordinary research articles (see below) and must, in particular, have an Abstract. The e-mail, telephone and fax number of the corresponding author must be given on the title page.

3 State-of-the-art reviews, prepared on invitation, will regularly appear under the title of Frontiers review.

4 Book reviews, prepared by invitation.

5 Contact the Editor before submitting a Letter to the Editor.

6 Reviewers are encouraged to propose any accepted manuscript for a formal Commentary which will be invited by the Editor.

Furthermore, Special Issues are regularly published with the help of invited Guest Editors. These issues combine reviews on topics of particular scientific interest and can arise from scientific

conferences. Suggestions for topics for Special Issues as well as for Guest Editors are invited by the Editor.

Authorship

Each author should have participated sufficiently in the work to justify authorship. This participation must include: (a) critically important intellectual contribution to the conception, design, and/or analysis and interpretation; (b) drafting the manuscript or critically reading it; and (c) thorough reading and final approval of the version to be published. Participation solely in the collection of data or provision of funds, space or equipment does not justify authorship. All authors take public responsibility for the paper as a whole, i.e., conception and design, data, analysis, and interpretation.

The acknowledgement section (see below) should list (a) other contributors for whom authorship is not justified, e.g. technical help; (b) financial and material support.

Previously published material

Results submitted for publication must not repeat findings that have already been, or are intended to be, published by the authors elsewhere. They should refer to their previous findings in the same way as they would refer to results from a different group. This applies not only to figures or tables, or parts of them, but has to be understood in a wider sense.

Ethics

The research described in papers submitted to Respiratory Physiology & Neurobiology that involve the use of human beings, including healthy volunteers, must adhere to the principles of the Declaration of Helsinki as well as to Title 45, U.S. Code of Federal Regulations, Part 46, Protection of Human Subjects, Revised November 13, 2001, effective December 13, 2001. Research involving animals must adhere to the American Physiological Society's Guiding Principles in the Care and Use of Animals. All investigations involving humans or animals that are reported in the journal must be conducted in conformity with these principles, and that a statement of protocol approval from an IRB or IACUC or equivalent is included in the methods section of the paper. In describing surgical procedures, the type and dosage of the anesthetic agent should be specified. Curarizing agents are not anesthetics; if these were used, evidence must be provided that anesthesia of suitable grade and duration was employed. Manuscripts reporting the results of experiments on human subjects, including healthy volunteers, must include a statement that informed consent was obtained.

Online submission of papers

Authors are requested to submit their manuscripts electronically, by using the EESubmit submission tool at <http://ees.elsevier.com/respnb/>. After registration, authors will be asked to upload their article and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply which incorporates the manuscript number for future correspondence.

Submission items (details are provided online in EES)

The following files must be uploaded when submitting a manuscript (* indicates mandatory files):

- 1 * Cover letter
- 2 * Manuscript
- 3 * Referee suggestions (for new submissions of Original Research Articles only)
- 4 * Rebuttal notes (for revised manuscripts only)
- 5 Figures
- 6 Permission note(s) (if applicable)

Cover Letter

Manuscripts submitted must be accompanied by a cover letter. It must state (a) that the work is original in that it has not been published before or submitted for publication elsewhere, and will not be submitted elsewhere before a decision has been taken as to its acceptability by Respiratory Physiology & Neurobiology; (b) that each author meets the criteria for authorship above and assumes the corresponding responsibility.

Referee suggestions

Authors are requested to submit at least 4 names (with full addresses, including phone, fax and e-mail) of appropriate reviewers for their manuscripts. The editor will consider these nominations even though he is not constrained to follow them. Please note that if your manuscript is accepted, the Editor may invite a formal Commentary, which would appear alongside your manuscript.

Preparation of manuscripts

The text must be clear and concise, conforming to accepted standards of English style and usage. Non-native English speakers may be advised to seek professional help with the language. Manuscripts must be double spaced throughout with wide margins. Pages should be numbered in the following order:

-Title page: Full title, not to exceed 100 characters and spaces; list of authors, marking corresponding author; laboratory of origin with full postal address (if more than one, indicate each author's affiliation by superscript a,b...); phone, fax numbers and e-mail of corresponding author; present address of authors and e-mail address, if applicable.

-Abstract page: Abstract not exceeding 160 words stating what was done, what was found, and what was concluded. References in the Abstract should give authors, year, journal, volume, and inclusive pages, e.g. Parisian et. al., *Respir. Physiol. Neurobiol.* 142: 127-143, 2004. Please note that the text of the abstract must be copied into an extra field within EES to assist in the refereeing process.

-Text pages. The Introduction should introduce the problem and should present a brief yet comprehensive account of its history, quoting the relevant and important papers in the area. The Methods should be complete, but should resort to earlier publications if possible. The Results should clearly document the main findings, which should be critically discussed in the Discussion. Repetition among these sections should be avoided. These sections should be numbered as 1. Introduction etc., with subsections numbered as 1.1 etc.

-Acknowledgements. If present should list (a) other contributors for whom authorship is not justified, e.g. technical help; (b) financial and material support.

-References, starting on a new page and typed double spaced (for style, see below).

-Figure legends and Tables (on separate page; for style, see below).

Nomenclature

Standard nomenclature should be used throughout; unfamiliar or new terms, arbitrary abbreviations and trade names should be defined when first used, independently in the Abstract and in the main text. Unnecessary abbreviations and symbols are to be avoided.

Symbols and Units

The meaning of the symbols should be clearly understood from the context, and all symbols that are not commonly used should be defined on their first appearance in the Abstract and in the main text. The symbols should conform with the glossary of terms and symbols in respiratory physiology proposed by the International Union of Physiological Sciences. The following are examples of main symbols and their modifiers. A more complete description of units, symbols and abbreviations is given

in the Combined Index to Volumes 51-75 of *Respiration Physiology* (now *Respiratory Physiology & Neurobiology*).

Main Symbols:

•			
F	Fractional concentration in dry gas phase	V	Volume per unit time, e.g., flow, ventilation
P	Gas pressure in general	C	Concentration
D	Diffusing capacity	S	Saturation
f	Frequency	R	Respiratory exchange ration
V	Volume		

Modifiers (small capitals and ordinary small letters, on the same line as main symbol):

I	inspired	L	lung, pulmonary
E	expired	R	respiratory
ET	end-expired, end-tidal	b	blood in general
A	alveolar a arterial	c	capillary
T	tidal	c.	end capillary
D	dead space	v	venous
B	barometric	v!	mixed venous blood
H	heart, cardiac		

STPD Standard temperature and pressure, dry (0°C, 760 mmHg) BTPS Body temperature and pressure, saturated with water vapor ATPS Ambient temperature and pressure, saturated with water

All symbols referring to gas species are in subscript, e.g. PCO₂ Dash above a symbol designates a mean value, e.g. $\bar{P}_v$!

Examples of Combinations:

FEN₂ Fractional concentration of nitrogen in dry expired gas PETCO₂ Partial pressure of CO₂ in end-tidal gas PcO₂ Partial pressure of oxygen in capillary blood (distinct from PCO₂) PAO₂-PaO₂ Oxygen partial pressure difference between alveolar gas and arterial blood PB Barometric pressure CvCO₂ Concentration of carbon dioxide in venous blood Sv! Saturation of oxygen in mixed venous blood.

.O₂

VE Expired ventilation or ventilation (not minute ventilation or minute volume) VT Tidal volume fR Respiratory frequency fH Cardiac frequency.

The basic quantities and units of the *Système International d'Unités* (SI) are recommended; abbreviations may be modified for clarity, e.g. sec instead of s, L instead of l (but ml). Amount of gases should be expressed as mole rather than gas volume (see Piiper et al., *Respir. Physiol.* 13: 292-204, 1971). For pressure, mmHg (= Torr), cmH₂O and atm may be used as well as the SI unit kPa (= 7.5 mmHg . 10 cm H₂O).

Typing these symbols and any others is simple with the Equation Editor, built into Microsoft Word. To access this tool, click on *Insert > Object* and select *Equation Editor* from the drop-down menu. This allows you to compose nearly every symbol. An even more advanced software for composing symbols and equations is MathType, which can be downloaded from <http://www.dessci.com/en/products/mathtype/>. It inserts itself into Word (and other text editing software) and replaces (in Word) the Equation Editor.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references typed on separate pages, following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list and vice versa; and that the spelling of authors. names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. References to manuscripts that have not yet been accepted should not be listed in the reference list; refer to them in the text as "unpublished", listing names and initials of all authors.

2 In the text refer to the author.s name (without initial) and year of publication, followed . if necessary . by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989)".

3 If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and all co-authors should be mentioned.

4 References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors. names, and chronologically per author. References in the list must not be numbered. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1998a, 1998b, etc. The following are examples for the style of referencing:

Kindig, C.A., Sexton, W.L., Fedde, M.R., Poole, D.C., 1998. Skeletal muscle microcirculatory structure and hemodynamics in diabetes. *Respir. Physiol.* 111, 163-175.

Dejours, P., 1988. *Respiration in Water and Air. Adaptations - regulation - evolution.* Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.

Fencl, V., (1986). Acid-base balance in cerebral fluids. In: Cherniack, N.S., Widdicombe, J.G. (Eds.). *Handbook of Physiology, Section 3: The Respiratory System, Vol. II: Control of Breathing, part 1.* American Physiological Society, Washington, DC, pp. 115-140.

Respiratory Physiology & Neurobiology should be referred to as *Respir. Physiol. Neurobiol.* Please note that the reference style in EndNote and RefMan that the journal uses is *Comp. Biochem. Physiol.*

Illustrations, Tables and Equations

Figures (to be uploaded as separate file(s), see below) and tables should be numbered in Arabic numerals. In the text they should be referred to as Fig. 1, Table 2, Eq. 3 etc. (not as fig. 1, figure 1; tab. 2, table 2). The lettering of the figures must be large enough to be legible after reduction to the final size; the maximal print width is 7.5 cm for narrow figures (one column width) and 16 cm for wide figures (two columns). A calibration bar should be given on all micrographs. Each table should be typed on a separate sheet and numbered correctly. Each illustration and table should have a caption and these should be typed on a separate sheet of the manuscript. The approximate position of figures and tables should be indicated in the margin of the text.

Figure files Figures should be uploaded as separate file(s). please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or Microsoft Office files) and with the correct resolution. Please note that normally the resolution needs to be correct before conversion to an acceptable format.

Reproduction of Colour Illustrations For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For submitting colour illustrations online, authors are recommended to go to the web page describing the preparation of electronic artwork (<http://authors.elsevier.com/artwork>) for detailed information. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether these illustrations are reproduced in colour in the printed version.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to .grey scale. (for the printed version should you opt to not pay for colour in print) please submit, in addition, usable black and white prints corresponding to all colour illustrations. As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that the figure captions are meaningful for both versions, if applicable.

Supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our Author Gateway at <http://authors.elsevier.com>

Proofs

One set of proofs, as an e-mail PDF, will be sent electronically to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections are not possible, so please ensure your first sending is complete.

Offprints

25 offprints will be supplied free of charge to the corresponding author. Additional offprints can be ordered on an offprint order form, which is sent upon acceptance of the paper.

Language editing services for authors

Within the Author Gateway section of the Elsevier website (<http://authors.elsevier.com/>) there is detailed information and links to companies who can check and improve the English of the manuscript before submission.

Respiratory Physiology & Neurobiology has no page charges.

January 2007 version.