

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Alpinia zerumbet* EM
MODELO MURINO DE FIBROSE PULMONAR**

BEATRIZ BENNY SUNGAILA PEREYRA

Aracaju
Fevereiro – 2016

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Alpinia zerumbet* EM
MODELO MURINO DE FIBROSE PULMONAR**

Dissertação de Mestrado submetida à banca
examinadora para a obtenção do título de Mestre
em Saúde e Ambiente, na área de concentração
Saúde e Ambiente.

BEATRIZ BENNY SUNGAILA PEREYRA

Orientadores

**Prof.^a Dra. Francine Ferreira Padilha
Prof.^a Dra. Edna Aragão Farias Cândido**

Aracaju
Fevereiro – 2016

P434e	Pereyra, Beatriz Benny Sungaila Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> em modelo murino de fibrose pulmonar. / Beatriz Benny Sungaila Pereyra ; orientação [de] Profª. Drª Francine Ferreira Padilha , Profª. Drª. Edna Aragão Farias Cândido. – Aracaju: UNIT, 2016. 116 p.; il. Inclui bibliografia. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2016. 1. <i>Alpinia</i> . 2. Bleomicina. 3. Fibrose pulmonar. I. Padilha, Francine Ferreira. (orient.). II. Cândido, Edna Aragão Farias. (orient.) III. Universidade Tiradentes. IV. Título. CDU: 614:504
-------	---

Ficha catalográfica: Rosangela Soares de Jesus CRB/5 1701

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Alpinia zerumbet* EM MODELO MURINO DE
FIBROSE PULMONAR**

Beatriz Benny Sungaila Pereyra

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:

Prof.^a Dra. Francine Ferreira Padilha
Orientadora

Prof.^a Dra. Edna Aragão Farias Cândido
Orientadora

Prof.^o Dr. Ricardo Luiz Cavalcante Albuquerque-
Junior
Universidade Tiradentes

Prof.^o Dr. Charles dos Santos Estevam
Universidade Tiradentes

Prof.^a Dra. Sheyla Rodrigues
Universidade Tiradentes (Suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico este Mestrado aos meus pais, Katia Sungaila e Christian Benny, por apostarem em minha capacidade e me incentivarem durante todo o tempo.

*“Mas pra quem tem pensamento forte,
O impossível é só questão de opinião”.*

Charlie Brown Jr. “Chorão”

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à Deus, por me dar a vida, estar sempre ao meu lado, me proteger e me guiar. Minha força vem daí de cima. Muito obrigada Senhor! Aos meus pais, Katia Sungaila Pereyra e Christian Benny Oioli Pereyra, pelo apoio, pela crença no meu potencial, por me criarem e me educarem da melhor forma, com muito amor, carinho, respeito e dedicação. Obrigada pelos ensinamentos da vida. Obrigada por entenderem e aceitarem a distância para realização deste sonho. Deus sabe como sinto a falta de vocês e como eu queria a presença de vocês na minha defesa. Amo muito vocês incondicionalmente!

As minhas irmãs, Blenda Benny, Bruna Carolina e Tatiana Sungaila, pelas parcerias, carinho e ajuda nos momentos mais difíceis. Sinto saudades de todas nós juntas. Aos meus sobrinhos Pedro Henrique, Bryan Benny e Bernardo, pelos momentos de afeto, amor e carinho nos momentos que eu mais precisava. Vocês são minha força, minha inspiração, meu tudo!!!! Eu amo muito vocês. Obrigada a toda minha família que está em Uberaba e em São Paulo!

Ao meu noivo João Paulo, pelo apoio, pela compreensão do tempo de convívio muitas vezes sacrificado para realização deste trabalho, pela cumplicidade, paciência, carinho, respeito e muito amor. Obrigada por estar comigo nessa caminhada, por acreditar sempre em mim e me fazer tão feliz! Eu te amo muito! Obrigada em especial a sua família que agora é a minha família também, por todo acolhimento, amor e incentivo para continuar e conquistar esse sonho.

Um agradecimento especial a minha "tia" Rita, Sogra linda do meu coração, que me chama de "Moooooooooooo" e me trata como uma filha, com todo o amor, carinho, preocupação e dedicação, te amo tiiiiiaaaa!!! Vaninha, obrigada pelo carinho e sempre me chamar de Rapunzel, voce é muito linda por dentro e por fora. Muito obrigada a Sessita, saiba que te admiro muito e agradeço muito por tudo o que fez e faz por mim, por sempre se lembrar e cuidar de mim quando preciso. Larinha, flor de Lis, um doce de pessoa que sempre torceu pelo meu sucesso, desejo tudo de bom do universo para você e para o Thiago! Vovó Idalia, Nieta e vovó Dalva, vocês são joias raras que me fazem ser uma pessoa melhor a cada dia, pelas histórias de vida, pelos ensinamentos, pelo amor, pelas orações e sabedoria! Kakau, Vítor e Tonê, tenho um carinho muito grande por vocês, muito obrigada sempre pela preocupação comigo e com minha família! Maria, um anjo que eu gosto tanto, você é muito especial para mim, obrigada por tudo sempre! E é claro, Lolo, obrigada por sempre me proporcionar alegria e estar comigo quando preciso (bomgaromamigoto, rsrs). Amo todos vocês!

Obrigada em especial a minha melhor amiga Juliana Maria que sempre torceu por mim mesmo distante! Te amo muito, saudades! Obrigada aos amigos, Jessica e Jean, Jojo e Larissa pela torcida!

Aos Professores do Mestrado, especialmente minha professora orientadora Dr^a Edna Aragão, por enxergar em mim o meu potencial desde a iniciação científica, mestrado e se Deus quiser até o doutorado, por nunca desistir de mim e sempre me direcionar para o melhor caminho, me orientando e transmitindo conhecimento. Agradeço pela compreensão em tudo, por passar comigo todos os momentos difíceis do mestrado, pela prioridade em relação até a sua vida pessoal. A senhora não foi somente orientadora, mas, em alguns momentos, conselheira, confidente, mãe e amiga. Serei eternamente grata a senhora. À minha outra orientadora, Dr^a Francine Padilha, pela disposição, oportunidade, atenção ensinamentos, orientações e contribuições. Por me receber em seu laboratório de portas abertas e sempre estar à disposição, respondendo minhas dúvidas e me incentivando a acreditar que tudo daria certo. Aos demais professores do programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, que foram de fundamental importância para a minha formação.

As amigadas que fiz dentro do Mestrado durante esta jornada, Mayanna, Fernanda, Maria Eliane, Thais, Cleberson, Cecília, Gislaine e Danielle Souza, por compartilharem comigo as alegrias, angustias, medos e vitórias.

Às alunas de Iniciação Científica Ana Bartira, Tais Bruna e Jennifer, pela oportunidade de convivência, pelas horas de sofrimento que passamos juntas no Biotério nas cirurgias, pelas apresentações nas semanas de pesquisa, em todos os momentos da pesquisa. Estão no caminho certo. Nunca desistem dos seus sonhos!

A todos que fazem parte do LBPN, LMBE em especial ao Professor Dr^o Ricardo Albuquerque por compartilhar seu conhecimento em histologia, me ajudar muito em tudo que preciso e por abrir as portas do seu laboratório para realização deste trabalho. Ao LBmat, especialmente a Daniela Droppa pela dedicação, paciência, colaboração nas análises e pela amizade. A Wanessa Lordello pela gentileza e apoio nas análises hematológicas. Aos funcionários do ITP. Aos funcionários do biotério. Aos animais, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência. Agradeço, também, à CAPES pelo apoio financeiro.

Finalmente, gostaria de agradecer Universidade Tiradentes por abrir as portas para que eu pudesse realizar este sonho que era a minha DISSERTAÇÃO DE MESTRADO e a todos os que, de forma indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS OU PRESSUPOSTOS DO PROJETO	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Epitélio alveolar normal.....	19
3.2 Doenças Pulmonares Intersticiais	19
3.3 Fibrose Pulmonar.....	20
3.3.1 Inflamação e fisiopatologia da fibrose pulmonar.....	21
3.4 Fármacos de indução de Fibrose Pulmonar	23
3.5 Tratamentos da Fibrose Pulmonar	24
3.5.1 Tratamento medicamentoso e vias de administração.....	24
3.6 Fitoterapia.....	26
3.6.1 <i>Alpinia zerumbet</i>	27
4 CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Desenho da Pesquisa	30
4.2 Obtenção do óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i>	30
4.3 Manipulação/ Cuidado com os animais	30
4.4 Administração da bleomicina e técnica de indução	31
4.5 Dose	31

4.6 Coeficiente Pulmonar	32
4.7 Análise histopatológica	33
4.7.1 Análise Semiquantitativa da Intensidade da Reação Inflamatória.....	34
4.8 Lavado broncoalveolar (LBA).....	34
4.9 Avaliação dos Parâmetros Hematológicos	35
4.10 Nível de TGF- β_1 medido pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)	36
4.11 Grau de Fibrose – “ <i>Aschroft scale</i> ”.....	37
4.12 Análise Morfológica do Colágeno.....	37
4.13 Preparação de pulmão homogeneizado de tecido.....	38
4.13.1 Medição de hidroxiprolina do tecido pulmonar.....	38
4.14 Análise estatística	39
5 REFERÊNCIAS	40
6 ARTIGO 1.....	47
7 ARTIGO 2.....	65
8 CONCLUSÃO GERAL.....	100
9 ANEXO I.....	101
10 ANEXO II.....	102
11 ANEXO III.....	103
12 ANEXO IV.....	104
13 ANEXO V.....	108

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Imagem das partes aéreas de *Alpinia zerumbet*. **28**
- Figura 2:** Organograma nas fases experimentais com ratos induzidos e não induzidos a FP por bleomicina (10U/kg), N= 75 animais. **32**
- Figura 3:** Procedimento de Lavado broncoalveolar para contagem total e diferencial de leucócitos. **35**
- Figura 4:** Procedimento de análise da microplaca (96 poços) realizada com as amostras de sangue colhidas para quantificação do TGF- β_1 . **37**
- Figura 5:** Armazenamento (congelado) logo após coleta das amostras dos ratos induzidos e não induzidos a FP por bleomicina para medição de hidroxiprolina e TGF- β_1 . **38**
- Figura 6:** Procedimento de análise da microplaca (96 poços) realizada com as amostras de tecido pulmonar colhidas para quantificação de hidroxiprolina. **39**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos parâmetros para a avaliação histológica da intensidade da resposta inflamatória nas áreas das feridas.

34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BLM-	Bleomicina
CEUA -	Comitê de Ética no Uso de Animais
DRGE-	Doença do Refluxo Gastroesofágico
FP-	Fibrose Pulmonar
GAG -	Glicosaminoglicanos
HE -	Hematoxilina-Eosina
HP-	Hipertensão Pulmonar
ITP -	Instituto de Tecnologia e Pesquisa
LBA -	Lavado Broncoalveolar
OEAz -	Óleo essencial da <i>Alpinia zerumbet</i>
OMS -	Organização Mundial da Saúde
SNC -	Sistema Nervoso Central
SUS -	Sistema Único de Saúde
TGF β -	Fator de Transformação do Crescimento Beta
TLR2-	Receptor toll-like 2
TLR4-	Receptor toll-like 4

TÍTULO DO PROJETO - Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* em modelo murino de Fibrose Pulmonar.

ÁREA DO CONHECIMENTO - Ciências Biológicas

SUBÁREA DO CONHECIMENTO – Morfologia

ESPECIALIDADE – Histologia

RESUMO

Contexto: A Fibrose Pulmonar (FP) é uma doença crônica e progressiva caracterizada por processos inflamatórios que resultam em deposição excessiva de colágeno no parênquima pulmonar, causando deterioração da função, com sintomas limitantes, qualidade de vida desfavorável e apresenta pouca possibilidade de terapia. A *Alpinia zerumbet* tem atraído grande atenção devido às suas ações terapêuticas do seu óleo essencial obtido a partir de suas folhas e ramos mostra através da análise química a presença de vários terpenos, dentre eles, se destacam terpeno-4-ol (23,2%), 1-8 cineol (21,8%). São potentes inibidores de citocinas e antiinflamatórios, respectivamente. **Objetivo:** Avaliar o efeito do óleo essencial da *Alpinia zerumbet* (OEAz) em modelo murino de FP induzido por bleomicina em ratos. **Material e métodos:** Foram utilizados 75 animais (Wistar) e após cada tempo de tratamento, foram realizadas avaliação histomorfológica do infiltrado inflamatório; contagem de leucócitos totais e diferenciais; categorização do grau de FP; quantificação de colágeno e mensuração da concentração plasmática do fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF β 1). **Resultados:** Valores significativamente menores ($p < 0,05$) foram observados no grupo tratado com OEAz em relação aos pesos dos pulmões, células inflamatórias, TGF β 1, deposição de colágeno e níveis de hidroxiprolina em 03, 14 e 28 dias após FP quando comparados aos grupos Controle Fibrose (CF) e Deflazacorte (DFZ). **Conclusão:** O OEAz melhora significativamente a resposta anti-inflamatória com potencial efeito regenerativo possivelmente pela ação inibitória da síntese de TGF β e diminuição da deposição de colágeno.

Palavras-chave: *Alpinia*; bleomicina ; Fibrose Pulmonar.

ABSTRACT

Background: Pulmonary Fibrosis (PF) is a chronic and progressive disease characterized by inflammatory processes that result in excessive collagen deposition in the lung parenchyma, causing deterioration of the function, with limiting symptoms, quality of life and unfavorable presents little chance of therapy. The *Alpinia zerumbet* has attracted great attention due to their therapeutic actions of essential oil obtained from the leaves and branches shows through chemical analysis the presence of several terpenes, among them stand out terpene-4-ol (23.2%), 1-8 cineole (21.8%). They are potent inhibitors of cytokines and antiinflammatories, respectively. **Objective:** To evaluate the effect of the essential oil of *Alpinia zerumbet* (EOAz) in a murine model of bleomycin-induced PF on rats. **Material and methods:** 75 animals (Wistar) were used and after each treatment period, there were histomorphological evaluation of inflammatory infiltrate; total leukocyte count and differential; categorizing the degree of PF; quantification of collagen and measurement of plasma concentration of the transformation growth factor beta 1 (TGF β 1). **Results:** Values significantly lower ($p < 0.05$) were observed in the group treated with EOAz in relation to the weights of the lungs, inflammatory cells, TGF β 1, collagen deposition and hydroxyproline levels at 03, 14 and 28 days compared PF Control groups fibrosis (CF) and deflazacort (DFZ). **Conclusion:** EOAz significantly enhances the anti-inflammatory response with regenerative potential effect possibly by inhibitory action of TGF β 1 and decreased collagen deposition.

Keywords: *Alpinia*; bleomycin; Pulmonary Fibrosis.

1 INTRODUÇÃO

A Fibrose Pulmonar é uma doença pulmonar progressiva intersticial e crônica, caracterizada morfológicamente por processos inflamatórios difusos que resultam em proliferação excessiva de fibroblastos e espessamento dos septos alveolares com deposição de colágeno no parênquima pulmonar (MARTINEZ *et al.*, 2008; SMITH *et al.*, 2010). Ela advém de efeitos tóxicos adversos de fármacos anti-neoplásicos, tais como bleomicina durante a terapia do câncer humano. Os fumantes de cigarro e os trabalhadores expostos a pó mineral e/ou amianto também estão predispostos a desenvolverem sua patogênese oriunda da inalação de partículas $\leq 5 \mu\text{m}$ provenientes de diferentes setores industriais (GUSTAFSON *et al.*, 2007; FISHWICK; BARBER, 2012; JINGFU *et al.*, 2014). Estima-se que com o tempo de exposição a poeiras tóxicas entre 5 a 10 anos já se tem risco a algum tipo de doença pulmonar limitante como a fibrose. No ano de 2000, as taxas médias de custo estimado de saúde de cada paciente relacionado a FP eram aproximadamente \$33.304 e \$40.707 nos Estados Unidos da América (RAGHU *et al.*, 2004; STEFANOV *et al.*, 2013).

As alterações fibróticas ocorridas na arquitetura pulmonar comprometem sua função na troca de gases e provocam diminuição da complacência pulmonar. Estima-se que a sobrevida média dos pacientes com FP é menor que cinco anos. Muitas possibilidades de tratamento têm sido investigadas, entretanto, o tratamento padrão utilizado, inclui agentes anti-inflamatórios, os quais oferecem pouca eficácia e efeitos adversos significativos afetando múltiplos órgãos (glaucoma, catarata, euforia, depressão, diabetes, HAS (Hipertensão Arterial Sistêmica), úlcera peptídica e pancreatite) por promover ação sistêmica (SWIGRIS; BROWN, 2006; VEIGA-JUNIOR, 2008; SMITH *et al.*, 2010).

Além dos efeitos sistêmicos provocados pelo tratamento padrão, a necessidade de altas doses diárias associadas a outros medicamentos inalatórios com uso de oxigenoterapia, elevam os efeitos adversos secundários e aumenta o custo mensal para o indivíduo, isto leva a uma péssima qualidade de vida e menor sobrevida. Desta forma, se faz necessário à implementação de um método terapêutico que seja mais eficaz sem efeitos adversos (VEIGA-JUNIOR, 2008; LOVEMAN *et al.*, 2015).

Dessa maneira, o tratamento fitoterápico torna-se uma alternativa, visto que, algumas plantas têm mostrado ações benéficas que podem agir diretamente na fisiopatologia de várias doenças. (BEZERRA *et al.*, 2000; LORENZI; MATOS, 2002, WANG *et al.*, 2002; VEIGA-JUNIOR, 2008).

A fitoterapia é uma alternativa eficiente e culturalmente difundida em busca de soluções terapêuticas. Dentre as plantas estudadas, encontra-se a *Alpinia zerumbet*, uma planta herbácea, da família Zingiberaceae, com sinonímia *A. speciosa*, encontrada comumente no nordeste brasileiro. Popularmente, todas as partes da planta (rizoma, folhas, flores e sementes) são utilizadas como agente medicinal (LORENZI; MATOS, 2002; ALBUQUERQUE; NEVES, 2004). Estudos em modelo murino tratados com óleo essencial ou extrato etanólico da *Alpinia zerumbet* apresentaram ação anti-inflamatória, inibindo processos edematosos em até 66%. Também foram encontrados resultados sobre o óleo essencial do rizoma da *Alpinia zerumbet* que demonstraram ação anti-inflamatória e antinociceptiva em ratos com artrite, com modificações no hipocampo no cérebro (LEMAN *et al.*, 2000). Shanmugam *et al.* (2011), relataram atividade anti-inflamatória crônica a partir do extrato etanólico da *Alpinia zerumbet*, apresentando indução de fibroblastos e síntese de colágeno e mucopolissacarídeos durante a formação do tecido granuloma.

Além dos efeitos anti-inflamatórios, estudos experimentais utilizando o OEAz, tem demonstrado uma variedade de atividades potencialmente benéficas, incluindo, efeitos, anti-oxidante; ansiolítico e antidepressivo (JUNIOR *et al.*, 2013); vasorrelaxante e anti-hipertensivo (CUNHA *et al.*, 2013); promoção de cicatrização de feridas, diferenciação/remodelação de tecido conjuntivo, com influência nos fibroblastos (SANTOS-JUNIOR, 2013); e ação reguladora deste óleo em canais de Ca^{++} (SANTOS *et al.*, 2011a; CUNHA *et al.*, 2013). O óleo essencial obtido a partir de suas folhas e ramos foi analisado quimicamente através da CG/MS revelando a presença de vários terpenos, dentre eles, se destacaram terpeno-4-ol (23,2%), 1-8 cineol (21,8%), γ -terpeno (11,6%) e γ -cymene (5,8%) (SANTOS *et al.*, 2011a). Por apresentar essa ação anti-inflamatória, potencial efeito remodelador do tecido conjuntivo e intervenção nos canais de cálcio, os estudos pré-clínicos sobre o óleo essencial da *Alpinia zerumbet* foram realizados para verificar seus efeitos nos tecidos com FP. Sendo assim, neste trabalho busca-se avaliar o efeito do OEAz no tecido fibrótico em modelo murino de FP.

2 OBJETIVOS OU PRESSUPOSTOS DO PROJETO

2.1 Objetivo geral:

- Avaliar o efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* em modelo murino de Fibrose Pulmonar

2.2 Objetivos específicos:

- Criar novo método de acesso a indução de fibrose pulmonar por bleomicina em murinos;
- Analisar e identificar as alterações histomorfológicas e bioquímicas associadas ao processo inflamatório e reparador, além de caracterizar o grau de FP entre os grupos.

3 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Epitélio alveolar normal

A unidade funcional dos pulmões são os alvéolos, os quais correspondem à uma área total de aproximadamente 143m² em sua superfície. A disposição dos alvéolos é feita na lâmina basal das células alveolares e capilares em tubos e sacos encontrados ao redor das paredes dos bronquíolos respiratórios. As células que revestem os alvéolos são chamadas de pneumócitos e se apresentam em dois tipos: Pneumócitos I (células de revestimento contínuo constituem 90% da parede alveolar e apresenta a função de troca gasosa); Pneumócitos II (constituem 10% da superfície alveolar, com função de produção e reciclagem de surfactante). Além dessas células, existe a presença dos macrófagos, cobrindo as células do epitélio alveolar, unidos às células epiteliais ou soltos dentro dos espaços aéreos (NEWELL, 2011).

Para acontecer a troca gasosa nos alvéolos, é necessário que ocorra a ventilação pela entrada e saída de ar nos pulmões, no qual, o consumo de oxigênio ambiental e retirada de dióxido de carbono mantém o metabolismo aeróbico celular e equilíbrio ácido-base (RYAN, *et al.*, 2013).

A ventilação é dividida em duas fases: inspiratória ativa e expiratória passiva. A inspiratória ativa é associada à contração dos músculos inspiratórios, no qual acontece um processo de redução da pressão intratorácica pelo aumento do volume da cavidade torácica, provocando a entrada do ar para baixo a partir da cavidade oral. Para isso, é necessária uma superação da elasticidade do sistema respiratório realizado pelos músculos da respiração e a resistência de fluxo de gás aéreo que envolve a resistência elástica pulmonar, resistência à fricção do fluxo, resistência à modificação dos tecidos, e ao movimento pulmonar juntamente ao do gás e tecido. A expiração normalmente é um processo passivo, no qual os músculos que participam desta ação relaxam, assim, permite o retorno dos tecidos elásticos da parede torácica à posição de repouso (HEMMINGS; EGAN, 2013).

3.2 Doenças Pulmonares Intersticiais

As doenças pulmonares intersticiais são causadas por processos inflamatórios no interstício pulmonar. Elas são classificadas em doenças pulmonares intersticiais, na qual se encontram a fibrose pulmonar idiopática, pneumonia de hipersensibilidade, a sarcoidose, a pneumonia intersticial não específica (agregada ou não às doenças do

tecido conjuntivo), doenças ocupacionais, pneumonia em disposição e bronquiolites de diversas formas (BALD *et al.*, 2012).

Nas doenças ocupacionais o aparecimento da FP está mais presente, que vai desde a indústria até a construção civil. Na produção industrial de asbesto (amianto) o trabalhador se expõe a poeira toxica formada com o tempo, cerca de 10 anos, essa poeira causa asbestose, um tipo de pneumoconiose que posteriormente causa FP. Ocorre o mesmo na construção civil com trabalhadores expostos às minas de carvão levando para as vias aéreas inferiores partículas de poeiras principalmente a silicose, porém, muitos outros agentes podem causar penumoconioses (por exemplo, estanho de bário, silício, zircônio e quartzo) estima-se que nessas minas com um tempo de exposição de 5 a 10 anos já se tem risco de algum tipo de doença pulmonar limitante (HONMA *et al.*, 2004; FISHWICK; BARBER, 2012; LANEY, WEISSMAN ,2012; EROL *et al.*, 2013; JINGFU *et al.*,2014).

A lesão pulmonar dependerá do tamanho e toxicidade da micropartícula inalada, comumente partículas com diâmetro médio de 0,5 a 10 µm, penetram-se nos alvéolos, no qual vão diretamente para os locais que contém células hospedeiras, principalmente os macrófagos, levando a danos pulmonares irreversíveis. A liberação de citocinas pró-inflamatórias ocorre na fase inicial os macrófagos alveolares residentes estimulam a atividade dos fibroblastos e eventual fibrose, caso esse processo ocorra de forma inadequada (ATES *et al.*, 2011; FISHWICK; BARBER, 2012).

3.3 Fibrose Pulmonar

A Fibrose Pulmonar (FP) é uma das pneumonias intersticiais idiopáticas mais comuns, porém, com o pior prognóstico, sendo uma doença crônica, progressiva e fibrosante. Ela é caracterizada morfológicamente por processos inflamatórios difusos que resultam em proliferação excessiva de fibroblastos e espessamento dos septos alveolares com deposição de colágeno e remodelação do parênquima pulmonar, associada com o padrão histopatológico e / ou radiológico de pneumonia intersticial não especificada. Esta doença fatal incide anualmente com cerca de 10 casos por 100 mil membros da população em geral e tem uma mortalidade associada de 50% em 3 anos após o diagnóstico (HONMA *et al.*, 2004; MARTINEZ *et al.*, 2008; SMITH *et al.*, 2010; STEFANOV *et al.*, 2013).

Os processos que interferem na fibrose nos pulmões dos pacientes com FP não são completamente compreendidos. No entanto, a etiologia pode estar associada a

consequências ambientais, riscos terapêuticos, doenças ocupacionais, predisposições genéticas, associada na maioria das vezes ao fumo, que pode decorrer na função pulmonar e, em última hipótese como prognóstico, a insuficiência respiratória (SELMAN *et al.*, 2001; SWIGRIS; BROWN, 2006).

Os sintomas clínicos mais comuns da FP são dispnéia, com piora progressiva e tosse seca, por mais de seis meses. Os indivíduos podem apresentar dedos em baqueta de tambor, e com o tempo, pode haver hipóxia, com coloração azulada das extremidades (pontas dos dedos). Na maioria das vezes está associada à uma variedade de comorbidades como hipertensão pulmonar (HP), doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), obesidade, câncer de pulmão e enfisema (LEE *et al.*, 2014).

O prognóstico do paciente com FP normalmente é ruim levando a limitação ao exercício, fadiga, ansiedade e perturbação do humor, qualidade de vida prejudicada afetando drasticamente a vida dos pacientes, e com o passar dos anos faz-se necessário a utilização de suplementação de oxigênio. Nos dias atuais, o transplante de pulmão prossegue sendo o único tratamento viável para os raros que se qualificam (SWIGRIS, *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2014).

O diagnóstico clássico da FP normalmente é feito colhendo informações do paciente com suspeita, como profissão, idade e hábitos diários como o uso de álcool, cigarro e outras drogas. Além de uma anamnese bem elaborada, são realizados exames clínicos para verificar a função pulmonar, radiografia, tomografia do tórax e exames laboratoriais (SPAGNOLO *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, novos exames mostraram avanços no diagnóstico da FP, tais exames permitem melhor apreciação do estado do parênquima pulmonar, como é o caso da Tomografia Axial Computadorizada de Alta Resolução, de pesquisas bioquímicas (sangue, lavado bronco-alveolar, secreções brônquicas) e o estudo de permeabilidade alvéolo-capilar. Porém, quando o diagnóstico não é confirmado pelos exames anteriores faz-se necessário a biópsia pulmonar (HONMA *et al.*, 2004; SPAGNOLO *et al.*, 2012).

3.3.1- Inflamação e fisiopatologia da fibrose pulmonar

A inflamação é uma resposta protetora corporal à infecção ou lesão. É comumente dividida em três fases: inflamação aguda, subaguda e crônica (DAS *et al.*, 2015).

Inicialmente leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) produzem respostas características a inflamação, como: dor, calor, rubor, inchaço e/ou associado a perda de função do tecido ou órgão acometido. Os neutrófilos têm o papel de controlar ou

limitar o aumento da inflamação. Porém, se a inflamação se estender a ponto de não ser restringida pelos leucócitos, esses, por sua vez, provocarão sinais sistêmicos como aumento da temperatura, leucocitose, alterações metabólicas e alterações plasmáticas através da mensuração das enzimas paraoxonase, adipocinas, homocisteína e determinação do status antioxidante, através da investigação de enzimas antioxidantes (SOD, GPx, GPRx), glutatona e microelementos envolvidos com a atividade antioxidante (DAS *et al.*, 2015; VELLOSA *et al.*, 2013).

Nesse período do processo inflamatório, há a presença de monócitos circulantes e sua produção pela medula óssea é aumentada, sendo atraídas para o local lesionado. No local específico da inflamação, os macrófagos passam a produzir altas concentrações de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, tornando o sítio de inflamação altamente microbicida e tumoricida (PAPAKONSTANTNOU; KARAKIULAKIS, 2009; SMITH *et al.*, 2010).

Em condições normais, ocorre uma inflamação temporária, ou seja, formação de tecido, remodelação e finalmente reparação do tecido normal. Contudo, ferimentos onde há inflamação crônica persistente podem estimular a resposta fibroproliferativa liberando fatores de crescimento fibrogênicos como TGF- β , componentes da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina, glicosaminoglicanos (GAG) no pulmão e angiogênese desordenada (PAPAKONSTANTNOU; KARAKIULAKIS, 2009; SMITH *et al.*, 2010).

O TGF- β é a citocina pró-fibrogênica mais evidente em quase todas as doenças fibróticas, sendo uma proteína multifuncional, realiza um papel fundamental na deposição de matriz extracelular (CHERESH. P *et al.*, 2013).

No início dessa inflamação, o TGF- β promove o desenvolvimento de inflamação no local conduzindo a FP. Isso porque o TGF- β é o principal indutor da transição epitelial-mesenquimal em células epiteliais alveolares e transdiferenciação de fibroblastos quiescentes em miofibroblastos (células que sintetizam proteínas efetoras pró-fibróticas, tais como colágeno tipo I e fibronectina). Isso contribui para a deposição e acúmulo de matriz extracelular através da regulação das atividades celulares como: a proliferação celular, diferenciação, adesão, migração e apoptose (HUNNINGHAKE; SCHWARZ, 2007; SMITH *et al.*, 2010; CHERESH *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2015).

Nesta fase devido ao acúmulo de colágeno ocorrerá um remodelamento do parênquima pulmonar com o espessamento dos septos alveolares. A cicatriz resultante estimula a produção de espécies reativas de oxigênio levando ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ativar a criação de um círculo vicioso pró-fibrogênico de TGF- β latente (ROSSARI 2004; HUNNINGHAKE; SCHWARZ, 2007;

SMITH *et al.*, 2010; CHERESH *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015).

Existem alguns mecanismos pelos quais o TGF- β pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, tais como: ativação de oxidases na membrana celular que promovem a liberação do H₂O₂ para o espaço extracelular em fibroblastos do pulmão; indução a produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial, pela diminuição da atividade complexo IV (enzima transmembranar encontrada em bactérias e mitocôndrias) em células epiteliais do pulmão e ativação do Nox4 (enzima da família 4 NADPH-oxidase) para gerar espécies reativas de oxigênio em vários tipos de células, *in vitro* e *in vivo*. Estes mecanismos sugerem que o TGF- β pode aumentar o stress oxidativo, importante na patogênese da FP (LUO *et al.*, 2014).

A hipótese de estresse oxidativo é a mais aceitável ao processo fisiopatológico da FP, por envolver todas as anormalidades moleculares, celulares e teciduais que ocorrem devido ao excesso de produção de espécies reativas de oxigênio. Os pulmões são os órgãos mais vulneráveis a esse estresse oxidativo, pois, são submetidos a níveis mais altos de oxigênio com pressões de 150 mmHg, enquanto os alvéolos são de 100 mmHg. Já a pressão submetidas a outros órgãos podem variar de pressões altas a baixas (45 mmHg a 1 mmHg) (CHERESH *et al.*, 2013).

TRAAETH *et al.* (2004) relataram que baixas concentrações extra-mitochondriais de Ca²⁺ livres, já são suficientes para aumentar o consumo de oxigênio, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, resultando principalmente de um aumento da atividade do ciclo de Krebs.

Alguns autores relatam que intervenção e modulação dos canais de cálcio e proteínas relacionadas ao cálcio têm sido referidas para tratamentos em fibrose pulmonar idiopática e outras doenças pulmonares fibróticas como sendo benéficas, por apresentarem ação anti-fibrótica (ROACH, *et al.*, 2013, YU *et al.*, 2014).

3.4 Fármacos de indução de Fibrose Pulmonar

Muitos medicamentos podem induzir a doença pulmonar intersticial (DPI), podendo ser por lesão pulmonar direta ou por uma reação de hipersensibilidade levando a fibrose pulmonar, ainda que na maioria dos casos dos agentes etiopatogénicos sejam de maneira idiopática. Um dos medicamentos que provoca a toxicidade pulmonar é a Amiodarona, que é utilizada no tratamento de arritmias cardíacas. Suas apresentações são descritas por várias formas: doença intersticial e alveolar aguda e crônica, com diversas gravidades, no entanto, a apresentação de FP é rara (SILVA *et al.*, 2006)

A Bleomicina é um antibiótico frequentemente utilizado em tratamentos de quimioterapia no câncer humano. Tem sido bastante usada como método de experimentação para investigar ações terapêuticas na fibrose pulmonar (SMITH *et al.*, 2010; SHI *et al.*, 2014). Vários são os estudos que utilizam a bleomicina em diferentes modelos animais, incluindo camundongos, ratos, hamsters e cães (SHI *et al.*, 2014). O uso desses modelos animais tem auxiliado de forma parcial com o intuito de melhorar os tratamentos utilizados nos seres humanos com a doença. Atualmente é o fármaco padrão para indução mais reprodutível em animais pela administração intratraqueal de dose única e o que se assemelha a FP do ser humano, por reproduzir atributos histológicos e bioquímicos análogos (ROSSARI, 2004; AYTEMUR *et al.*, 2012).

Os mecanismos pelos quais a bleomicina induz a lesão pulmonar e, conseqüentemente, a fibrose, não estão completamente esclarecidos, porém, o desenvolvimento da fibrose pulmonar após a utilização da bleomicina, tem sido relacionado ao aumento dos níveis de Ca^{2+} (Winters *et al.*, 2016). Segundo Atzori *et al.* (2004), a bleomicina gera espécies reativas de oxigênio através do calcio na ligação com o ferro, causando danos no DNA. Assim, essa interação parece iniciar as alterações inflamatórias e fibroproliferativas, através de uma ação combinada de várias outras citocinas que levam a acumulação de colágeno no pulmão.

3.5 Tratamentos da Fibrose Pulmonar

3.5.1- Tratamento medicamentoso e vias de administração

Os tratamentos para a FP vêm sendo aprimorados ao longo dos anos, porém, a sua progressão não acompanha simultaneamente aos efeitos progressivos da doença. Os tratamentos compreendem a utilização de fármacos anti-inflamatórios, imunossupressores e a utilização de glicocorticoides (LATTA *et al.*, 2002; ROUMESTAN *et al.*, 2004).

Um estudo realizado por Raghu *et al.* (2012), sugeriu a administração de duas drogas (uma combinação de prednisona e azatioprina ou ciclofosfamida) ou três (azatioprina, prednisona e N- acetilcisteína) em um subgrupo de pacientes com FP idiopática. Dados de pneumologistas mostraram que quase 50% das pessoas que realizaram essa administração aumentaram o risco de morte e hospitalização em comparação ao grupo do efeito placebo o que evidencia, no entanto a contra-indicação do uso da combinação dos dois ou três medicamentos (KAUNISTO *et al.*, 2013).

O medicamento Deflazacorte tornou-se mais frequentemente utilizado por apresentar menos efeitos indesejáveis. É um composto precedido de oxazolina de

prednisolona, com atuação imunossupressora análoga. É indicado principalmente para o tratamento de artrite reumatóide, órgãos de rejeição de transplante, síndromes nefróticas, asma, broncopneumopatia obstrutiva crônica, sarcoidose, FP difusa e para outras aplicações. Estudos realizados em seres humanos mostram que doses de tratamento de deflazacorte (0,15mg/dia) em relação a cortisona (5,0mg/dia) apresentaram ações supressoras semelhantes, entretanto, o deflazacorte demonstrou-se melhor tendo a dose diária menor, uma vez que causa menos efeitos secundários advindo de doses maiores diárias (LATTA *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2011).

Os glicocorticóides atuam na regulação de sistemas metabólicos, resposta ao stress, como também no Sistema Nervoso Central (SNC) e na maioria dos tecidos e órgãos periféricos. Inicialmente sua indicação era para tratamento de insuficiência adrenal, porém, após alguns anos relataram eficiência da cortisona na terapêutica da artrite reumatóide. Suas ações anti-inflamatórias e imunossupressoras derivam da capacidade inibitória da produção de cicloxigenase e devido a isso, diminuição das migrações ou ativações de várias células inflamatórias. São utilizados também como atuantes inibidores de proliferação e resposta citotóxica no tratamento de alguns tumores. Tem pouco desenvolvimento em configurações tópicas em dermatologia, mas o índice terapêutico melhorou em relação ao tratamento de doenças respiratórias crônicas e do sistema digestivo. Porém, por ter uma abordagem sistêmica e ser necessário na maioria das vezes, seu uso à longo prazo, termina acarretando em efeitos indesejáveis significativos (ROUMESTAN *et al.*, 2004).

Os glicocorticoides podem apresentar diminuição de massa óssea pela alta absorção de cálcio devido ao aumento hormonal da paratireoide e outros efeitos colaterais como: glaucoma, catarata, euforia, depressão, diabetes, HAS (Hipertensão Arterial Sistêmica), úlcera peptídica e pancreatite. Porém, o Deflazacorte comparado aos outros glicocorticoides apresenta menos efeitos em relação a diabetes e a perda de massa óssea e possui as mesmas ações imunossupressoras (DING *et al.*, 2014).

A absorção do Deflazacorte quando administrado oralmente é rápida pelo trato gastrointestinal e imediatamente metabolizado pelo fígado, ocorrendo a conversão por esterases plasmáticas para o seu principal metabólito ativo que é o 21-hidróxideflazacort. Esse metabólito atinge seu pico plasmático em 1,5 e 2h e sua meia vida em 1,1 e 1,9h. Apresenta uma extensão de absorção quando administrado por via oral de 68% e sua eliminação acontece pelos rins, sendo 70% excretados pela urina e 30% pelas fezes (MIGNANI *et al.*, 2013; DING *et al.*, 2014).

Já a absorção por medicamentos inalatórios administrados por via respiratória inicia-se na mucosa nasal até chegar aos alvéolos, podendo ser utilizada tanto para obtenção de efeitos locais ou sistêmicos. As administrações de medicamentos feitas por inalação, normalmente estão sob a forma de gás ou contidas em pequenas partículas líquidas ou sólidas, geradas por nebulização ou aerossóis. As principais vantagens desta via incluem o uso de pequenas doses de medicamentos para rápida ação e minimização de efeitos colaterais sistêmicos por não sofrer fenômeno de primeira passagem (metabolização no fígado) (MIGNANI *et al.*, 2013).

Com a evolução da FP, a oxigenoterapia, pode ser essencial em casos de hipoxemia, sendo as vezes necessária a utilização por meses ou anos, no entanto, seu uso contínuo pode ser prejudicial, pois, quando são usados níveis acima de 50%, podem causar toxicidade pulmonar devido à formação de radicais livres. Níveis de nitrogênio estáveis permanecem os alvéolos abertos, porém, esses níveis são reduzidos com a exposição prolongada à oxigenoterapia, podendo provocar “Atelectasia de absorção”. Apesar desse suporte complementar, nas últimas décadas, houve pouco progresso no tratamento farmacológico da doença (PAIVA; AMARAL, 2009; SAUL; KENDALL, 2011). Desta forma, há uma tendência na utilização das plantas medicinais (BRASILEIRO, 2008; SANTOS, 2011b).

3.5.2 Fitoterapia

As plantas medicinais tem seus registros primitivos relatados como sendo um dos mais antigos recursos utilizados na prevenção, cura ou tratamento de injúrias na história da humanidade, na busca por recursos terapêuticos. Hoje em dia, muitos fatores têm colaborado para o uso frequente deste recurso, incluindo o elevado custo dos medicamentos industrializados, o complexo acesso da população à assistência médica, como também, a tendência na utilização de produtos naturais (BORGES, 2006; BRASILEIRO, 2008; SANTOS, 2011b).

A organização Mundial da Saúde (OMS) verificou que aplicações convencionais de saúde, tais como acupuntura, fitoterapia e técnicas manuais estão em ascensão, obtendo espaço de maneira complementar aos tratamentos medicamentosos. Cerca de 80% dos seres humanos tem inacessibilidade ao atendimento primário à saúde, por residirem em locais afastados dos centros de saúde ou por não terem recursos financeiros para obtenção dos medicamentos de indicação médica. No entanto, o tratamento com plantas medicinais torna-se um tratamento alternativo (VEIGA-JUNIOR, 2008).

Na Conferência sobre Atenção Primária em Saúde feita em Alma-Ata, 1978, a OMS, adotou oficialmente o uso de fitoterápicos para fins preventivos, curativos ou diagnósticos, com recomendações aos Estados Membros a transmissão das informações necessárias para sua aplicação (SANTOS, 2011b; GONÇALVES, *et al.*, 2013).

No Brasil, o emprego da fitoterapia pelo Sistema Único de Saúde (SUS), propõe por meio de seus princípios: universalidade, integralidade e equidade, adotar a fitoterapia para complementar à saúde, buscando aumentar seu acesso, prevenir injúrias, promoção, manutenção e recuperação da saúde, para contribuir e fortalecer esses princípios, dispondo de políticas públicas e normas específicas com a finalidade de institucionalizar essa prática (FONTENELE, *et al.*, 2013; GONÇALVES, *et al.*, 2013).

No nordeste brasileiro, o uso das plantas medicinais ainda é comum na elaboração de remédios caseiros, afim de tratar múltiplas doenças, onde encontram aproximadamente 500 espécies de vegetais, com composição majoritária de plantas silvestres. Desta forma, estudos a respeito vem aumentando de forma gradual nessa região, resultando no aumento expressivo de publicação sobre o assunto (LUZ, 2001; BORGES, 2006; BRASILEIRO, 2008; SANTOS, 2011b).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) avalia como medicamento fitoterápico aquele adquirido excepcionalmente de matérias-primas de origem vegetal, que apresenta qualidade constante e reprodutível e que seja assinalado pelos levantamentos etnofarmacológicos de seus riscos e eficácia, bibliografias técnico científicas em publicações ou ensaios clínicos. A Anvisa tem organizado normas para a regulamentação dos medicamentos fitoterápicos, desde a Portaria nº 6, de 1995, advindo pelas Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de 2000; nº 48, de 16 de março de 2004, nº10, de 9 de março de 2010, e nº 14, de 31 de março de 2010, atualmente vigente, que prepara sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (SANTOS, 2011b; GONÇALVES *et al.*, 2013).

3.5.2.1 *Alpinia zerumbet*

A *Alpinia zerumbet* é uma planta herbácea, perene e aromática da família Zingiberaceae, encontrada em abundante quantidade no nordeste brasileiro. Cresce em touceiras em posição vertical de 8 a 10 m de altura em climas subtropicais e tropicais. Tem origem no sul e sudeste Ásia e atinge 2 a 3 metros de altura. É também conhecida como “colônia”, “água-de-alevante”, “cuité-açu” e “pacová” (BEZERRA *et al.*, 2000; LORENZI; MATOS, 2002; ALBUQUERQUE; NEVES, 2004; SHANMUGAM *et al.*, 2011).

Popularmente, todas as partes da planta (sementes, folhas, rizoma e flores) são utilizadas de formas diferentes para indicações clínicas como, dores de cabeça, atividades relaxantes, anti-hipertensiva, atividade antiespasmódica, efeito relaxante do tônus basal e efeito anti-inflamatório (BEZERRA *et al.*, 2000; LORENZI; MATOS, 2002; ALBUQUERQUE; NEVES, 2004; SHANMUGAM *et al.*, 2011) (Figura1).



Figura 1: Foto *Alpinia zerumbet*.(Fonte:<<http://www.bambooland.com.au/gingers/alpinia-zerumbet-cv-green-shell>>).

Estudos em modelo murino com óleo essencial ou extrato etanólico da *Alpinia zerumbet* apresentaram ação anti-inflamatória, inibindo processos edematosos em até 66%. Também foram encontrados resultados sobre o óleo essencial do rizoma da *Alpinia zerumbet* que demonstraram ação anti-inflamatória e antinociceptiva em ratos com artrite, com modificações no hipocampo no cérebro (LEMAN *et al.*, 2000). Shanmugam *et al.* (2011), relataram atividade anti-inflamatória crônica a partir do extrato etanólico da *Alpinia zerumbet*, apresentando indução de fibroblastos e síntese de colágeno e mucopolissacarídeos durante a formação de tecido do granuloma.

Além dos efeitos anti-inflamatórios, estudos experimentais utilizando o OEAz, tem demonstrado uma variedade de atividades potencialmente benéficas, incluindo, efeitos, anti-oxidante; ansiolítico e antidepressivo (JUNIOR *et al.*, 2013); vasorrelaxante e anti-hipertensivo (CUNHA *et al.*, 2013); promoção de cicatrização de feridas, diferenciação/remodelação de tecido conjuntivo, com influência nos fibroblastos (SANTOS-JUNIOR, 2013); e ação reguladora deste óleo em canais de Ca^{2+} (SANTOS *et al.*,2011a; CUNHA *et al.*,2013).

Tais propriedades são atribuídas à presença de terpenos na composição a *Alpinia zerumbet* e aos princípios ativos terpeno-4-ol e 1,8 cineol, os quais podem influenciar diretamente na inflamação, promovendo ação inibitória na produção de interleucinas e conseqüentemente reduzindo a síntese Fatores de Necrose Tumoral

alfa (TNF α), um importante mediador pró-fibrótico (JUERGENS *et al.*, 2003; KHALIL *et al.*, 2004; SANTOS *et. al.*, 2004; CAL, 2006).

O monoterpeneo 1,8 cineol é conhecido também como eucaliptol, tem uso tradicional em medicamentos expectorantes. Em pesquisas clínicas com pacientes asmáticos, o princípio ativo 1,8-cineol proporcionou efeito anti-inflamatório, mucolítico de vias aéreas superiores e inferiores, além de inibição na produção de Fatores de Necrose Tumoral alfa (TNF α) e interleucina 1 (mediadora de inflamação), leucotrieno4 (metabólito do ácido araquidônico, aumenta a permeabilidade vascular) e tromboxano (vasoconstritores na circulação sistêmica, mas vasodilatadores na circulação pulmonar). Relataram o 1,8 cineol, como um potente inibidor de citocinas que pode ser adequado para o tratamento a longo prazo da inflamação das vias aéreas na asma brônquica e outras injúrias sensíveis aos corticosteróides (JUERGENS *et al.*, 1998a; 1998b; 2003).

Sendo um dos componentes mais encontrados na *Alpinia zerumbet*, o monoterpeneo 1,8 cineol é utilizado também, com a finalidade de aprimorar a absorção dos medicamentos transdérmicos, pois, apresenta interação com lipídeos e queratina, permitindo a expansão da solubilidade aos medicamentos (SAPRA *et al.*, 2008). Essa absorção acontece por via inalatória, estudos indicam que após 15 minutos inalado, o 1,8 cineol já se encontra na corrente sanguínea (JÄGER *et al.*, 1996).

As pesquisas clínicas realizadas em trabalhos publicados anteriormente revelaram efeitos quando utilizando os princípios ativos do OEAz foram: atividade relaxante de duodeno, onde o terpeno-4-ol, quando administrado na dose de 60 mM inibe a sua contração fásica, provavelmente pelo antagonismo de cálcio dependente (NASCIMENTO *et al.*, 2005) e ação anti-inflamatória redutora da substância P, segundo Juergens *et al.*, (2003) e o 1,8-cineol com efeito anti-inflamatório de vias aéreas, evidenciados também em estudos realizados por Santos *et al.*, (2004), Koh (2002) e Cal (2006) além de efeito de absorção dérmica em 1 hora.

Estudo desenvolvido por Cândido *et al.* (2012), demonstrou ação depressora na atividade do sistema nervoso central, onde crianças com paralisia cerebral com aplicação tópica e inalatória do OEAz na dose 0,05ml/10Kg para relaxamento de musculaturas espásticas (tensão muscular) apresentaram, além do relaxamento muscular de forma significativa, segundo as mães, melhora na tosse, sialorréia, respiração bucal, porém sem alteração no comportamento que refletisse ação depressora central.

4 CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho da Pesquisa

O presente estudo caracteriza-se como um estudo explicativo, experimental, com abordagem analítica quantitativa de dados. Foi submetido à análise pelo Comitê de Ética no Uso de animais (CEUA) da referida universidade com aprovação de protocolo: 070514 (ANEXO I).

Antes de iniciar a pesquisa foi realizado um projeto piloto, no qual, os pesquisadores passaram por um processo de treinamento para manuseio, aplicação dos devidos medicamentos, análise histomorfológica do infiltrado inflamatório e análise do colágeno dos pulmões dos ratos. Essas análises do projeto ocorreram no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) de Sergipe (SE).

4.2 Obtenção do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*

O óleo essencial de *Alpinia zerumbet*, foi coletado pela empresa Hebron a partir de folhas verdes e extraído por destilação a vapor. A planta *Alpinia zerumbet* foi catalogada no Herbarium na Universidade Federal de Sergipe numa exsiccata com o código de ASE No. 08245. A dose utilizada neste estudo foi de 0,05 mL / 10 kg na concentração de 100% e foi diluída em solução salina para tratamento através da nebulização. Este óleo essencial da *Alpinia zerumbet* foi analisado cromatograficamente e foram apresentados monoterpenos de hidrocarbonetos (40,32%), predominantemente γ -de terpineno (11,63%) e p-cimeno (5,85%); monoterpenos oxigenados (50,94%), cujos terpenos foram terpeno-4-ol (23,23%) e 1,8 cineol (21,77%); sesquiterpenos oxigenados (3,52%) e hidrocarbonetos sesquiterpênicos (2,8%) [artigo que está sendo avaliado na revista phytomedicine].

4.3 Manipulação/ Cuidado com os animais

Foram utilizados 75 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), de ambos os sexos, com aproximadamente 12 semanas de idade e peso médio de 250 \pm 50 g, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes. Os animais permaneceram no biotério, em gaiolas de polipropileno padrão, agrupados em número de 5, mantidas em ambiente com temperatura controlada de (~22°C), regime de luz, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*. Os 75 animais foram divididos em 5 grupos:

- Grupo Sham, saudável, sem indução (n=15);
- Grupo Veículo, induzidos com solução salina (n=15);

- Controle Fibrose, tratados com BLM+ solução salina(1mL) (n=15);
- Grupo Deflazacorte, tratados com BLM+ Deflazacorte(1mL/kg) (n=15);
- Grupo OEAz, BLM+ submetidos à terapêutica inalatória pelo OEAz (0,05 mL/10kg)(n=15) .

Subdivididos em 3 tempos: 03, 14 e 28 dias, respectivamente (Figura 2).

4.4 Administração da bleomicina e técnica de indução

O método sugerido modifica o método de Rossari (2004). A indução da FP foi por injeções intratraqueais em procedimento cirúrgico de sulfato de bleomicina, em doses de 10 U/kg em animais anestesiados com Cloridrato de Ketamina a 10% (95 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina 2 % (12 mg/kg). A instilação da bleomicina foi realizada com agulha de 100U utilizada para injetar insulina na traqueia com orientação de palpação para localizar a traqueia. Para se ter o acesso do lúmen da traqueia a agulha foi inclinada a 10º graus e 0,7cm acima da linha traçada no limite superior dos ombros dos ratos.

Foi aguardado um período de 3 dias para a indução da fibrose pulmonar. Foi retirado o material biológico para verificar a FP *in situ* (pulmão direito e esquerdo). O material foi processados para análise hitomorfológica do infiltrado inflamatório e medição do quantitativo de hidroxiprolina.

4.5 Dose

A dose do OEAz foi de 0,05 mL/10Kg, ministrada de forma inalatória. Para realização da terapêutica foi criada uma câmara adaptada em que os animais receberam o OEAz por via inalatória através da aerosolterapia diariamente. A dosagem de Deflazacorte (confeccionado em farmácia de manipulação) foi de 1mg/kg administrada por gavagem/diária.

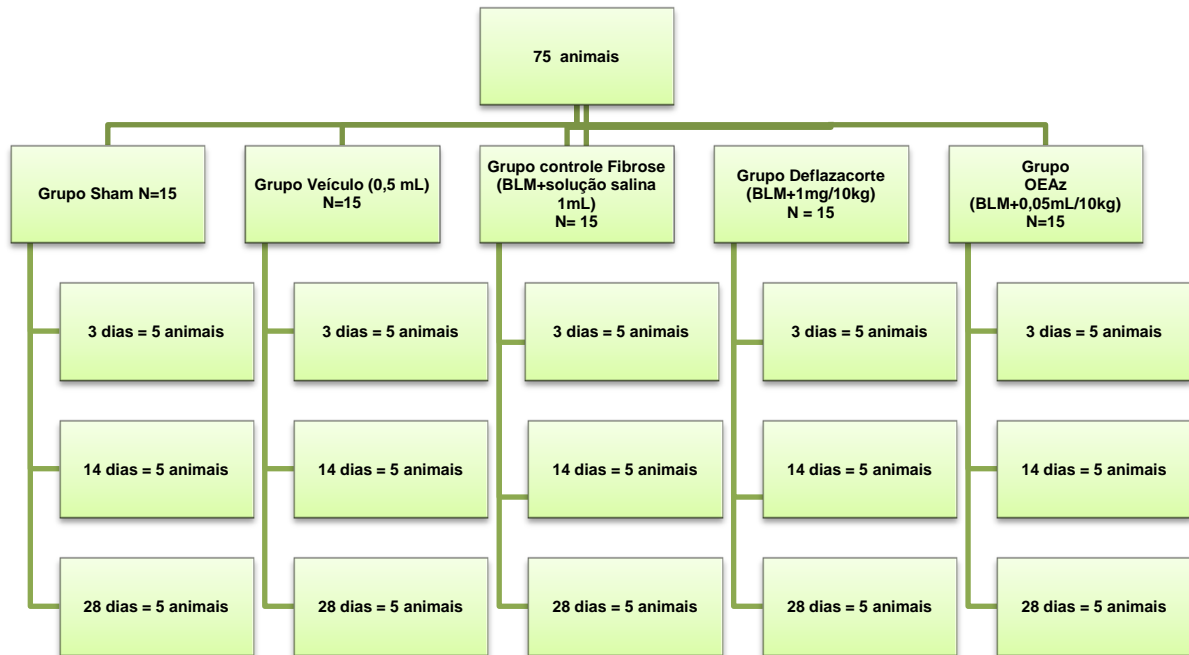


Figura 2: Organograma nas fases experimentais com ratos induzidos e não induzidos a FP por bleomicina (10U/kg), N= 75 animais.

Os ratos foram sacrificados após 03, 14 e 28 dias de tratamento, no qual o tórax de cada rato foi aberto e hilo de cada pulmão foi ligado. Os pulmões foram dissecados livres de seu brônquios, vasos sanguíneos e gânglios hilares. Cada amostra de pulmão foi pesada para peso úmido, livre de sangue com soro fisiológico estéril gelado. Pulmões direitos foram utilizados para fazer o Lavado Broncoalveolar (LBA). Um terço dos pulmões esquerdos foram fixados a 10% de formalina tamponada neutra para exame histopatológico. Dois terços dos pulmões esquerdos foram imediatamente congelados a -20°C para a medição da hidroxiprolina (SAMAH *et al.*, 2012).

4.6 Coeficiente Pulmonar

Nos dias 0, 03, 14 e 28, todos os ratos foram pesados para observar possíveis mudanças de massa corporal e pulmonar dos animais em cada grupo. Nos dias 03, 14 e 28, os ratos foram sacrificados e os pulmões foram retirados e pesados. Coeficiente pulmonar foi determinado pela equação:

$$\text{Coeficiente Pulmonar (CP)} = \frac{\text{Massa Pulmonar (g)}}{\text{Massa Corporal (Kg)}} \times 100\%$$

4.7 Análise histopatológica

4.7.1- Análise Semiquantitativa da Intensidade da Reação Inflamatória (secções coradas em HE)

Para avaliação das características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório/reparativo, foram analisadas as secções histológicas coradas em HE, observando-se os seguintes critérios: intensidade e tipo do infiltrado inflamatório. A intensidade do processo inflamatório foi observada e determinada de acordo com os seguintes critérios: (aguda) – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituírem menos de 10% da população celular observada na área da ferida cirúrgica; (subaguda) – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituírem entre 10% a 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica. (crônica) – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituírem mais de 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica. A tipagem da reação inflamatória foi determinada considerando-se a análise semi-quantitativa das diferentes células inflamatórias de acordo com os critérios descritos na Tabela 1 (SOUZA *et al.*, 2013).

Tabela 1. Descrição dos parâmetros para a avaliação histológica da intensidade da resposta inflamatória nas áreas das feridas.

Escore da resposta inflamatória	Semiquantificação da resposta inflamatória	Classificação da resposta inflamatória
0	Ausente	Ausente
1	Leve	
2	Moderada	Crônica (predominância de linfócitos e histiócitos)
3	Intensa	
4	Intensa	Subaguda (equilíbrio de neutrófilos, linfócitos e histiócitos)
5	Intensa	Aguda (predominância de neutrófilos)

Fonte: Adaptado de Souza *et al.*, 2013.

Para realização da análise, pulmões esquerdos foram cortados transversalmente com 3 seções de 5 µm de espessura de cada e analisados por randomização sistemática. As imagens dos cortes histológicos foram digitalizadas a partir de um polarizador para luz transmitida (45MM U-POT, Olympus) acoplado a microscópio trinocular CX31 (Olympus), com sistema de captura de imagens C-70070 WIDE ZOOM (Olympus). As imagens foram digitalizadas com aumento microscópio de 100 e 400 vezes e gravadas em formato TIFF sem compressão.

Através do programa *Axion Vision Rel. 4.8* para Windows, estes arquivos de imagem foram abertos, as quais foram exibidas na tela do monitor em 100% do seu tamanho, sendo realizada a análise conforme escala descrita anteriormente.

4.8 Lavado broncoalveolar (LBA)

O fluido de lavagem broncoalveolar (LBA), foi recolhido a partir dos pulmões direitos. A traqueia foi canulada e brônquio esquerdo foi suturado. Foi instilado no lúmen das vias aéreas direitas, na qual foi lavada três vezes com 2 mL de solução salina fisiológica estéril e retirado um total de 4 ml por meio de uma sonda traqueal acoplado a uma seringa de 5 mL, aproximadamente 85% da taxa total do fluido foi recuperado (Figura 3). O sobrenadante isento de células foi recolhido após

centrifugação a 5000 rpm durante 10 min a 4 ° C. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em 200 ul de solução salina fisiológica. As contagens de células totais foram realizadas por um equipamento automatizado (Sysmex Hematologia XE-5000™-Laboratório de Biomedicina da Universidade Tiradentes) e diferenciais (Wright-Giemsa) foram realizadas utilizando hemocitômetro (KUROKAWA *et al.*, 2010; CHITRA *et al.*, 2013; GOU *et al.*, 2014).

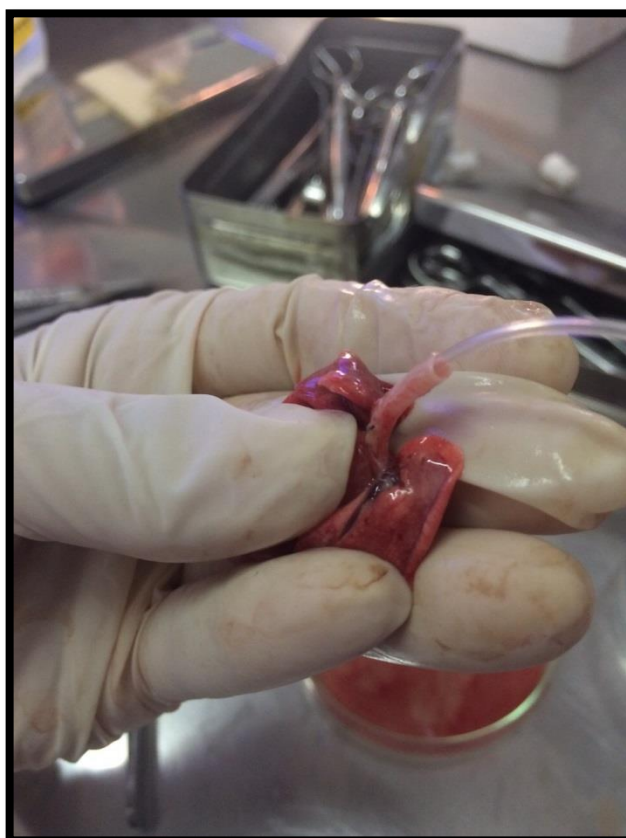


Figura 3: Procedimento de Lavado broncoalveolar para contagem total e diferencial de leucócitos.

4.9 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Coletas de sangue foram realizadas após a eutanásia dos animais no qual foram utilizados tubos coletores internamente revestidos com ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), evitando assim a coagulação da amostra. Os parâmetros hematológicos avaliados foram contagem diferencial, tais como os eosinófilos (%), linfócitos (%), neutrófilos e monócitos (%). Essa contagem diferencial dos leucócitos foi realizada através do esfregaço sanguíneo previamente elaborado com as amostras frescas, através de uma gota de sangue total pingada em lâmina limpa de vidro com borda fosca e identificada para a preparação do esfregaço. Após esfregaço pronto, as lâminas estendidas foram coradas com corantes panóticos, e será realizada a

contagem diferencial em 100 células utilizando o microscópio de Luz. Após centrifugação a 3000 rpm durante 4 min, o soro sanguíneo foi utilizado para mensurar a concentração plasmática de TGF- β_1 .

4.10 Nível de TGF- β_1 medido pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

A concentração plasmática de TGF- β_1 foi medida por kit ELISA (Life technologies) como descrito anteriormente (CHEN *et al.*, 2015), e o procedimento foi de acordo com as instruções do fabricante como se segue: Foram adicionados 100 μ L da solução Padrão Tampão de Diluição (Standard Diluent Buffer 8 mM sodium azide; 25 mL). Foram deixados poços vazios para cromogeno em branco. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de padrões e as amostras diluídas aos poços apropriados. A placa foi tapada e a incubação ocorreu durante 2 horas à temperatura ambiente. Subsequente, a solução foi descartada cuidadosamente e os poços foram lavados 4 vezes com tampão de lavagem (Wash Buffer Concentrate 25X).

Após essa etapa, foi adicionado o anticorpo detector, para isso, 100 μ L da solução de detecção de anticorpos foram adicionados em cada poço, exceto os espaços em branco cromogeno. A placa foi coberta e a incubação foi durante 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi descartada novamente cuidadosamente e os poços foram lavados 4 vezes com tampão de lavagem. Imediatamente foi Adicionado o Anti-Rabbit HRP IgG e 100 μ L da solução Padrão Tampão de Diluição. Em seguida, foram deixados poços vazios para cromogeno em branco, a placa foi coberta e a incubação durou 30 minutos à temperatura ambiente, logo após, a solução foi novamente descartada cuidadosamente e os poços foram lavados 4 vezes com tampão de lavagem.

Ao término do experimento, foram adicionados 100 μ L de cromogeno estabilizado a cada poço. A solução de substrato ficou azul, a incubação durou 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após o tempo esperado foi adicionado 100 μ L de solução de paragem a cada poço. A solução mudou de azul para amarelo e a absorbância foi lida a 450 nm (Figura 4).

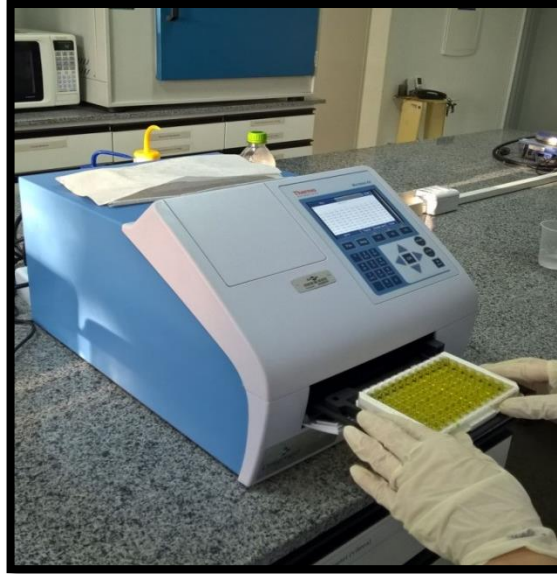


Figura 4: Procedimento de análise da microplaca (96 poços) realizada com as amostras de sangue colhidas para quantificação do TGF- β_1 .

4.11 Grau de Fibrose – “Aschroft scale”

Para a análise histológica quantitativa, uma escala fibrótica numérica foi utilizada “Aschroft scale” (ASHCROFT *et al.*, 1988). Resumidamente, o grau de FP foi pontuado em uma escala de 0-8, examinando seis campos escolhidos aleatoriamente por amostra com uma ampliação de 100X. Os critérios de classificação de fibrose do pulmão foram como se segue: grau (0): de pulmão normal; grau (1): espessamento fibroso mínimo paredes bronquiolares ou alveolares; grau (3): espessamento moderado de paredes sem danos evidentes arquitetura pulmonar; grau (5): aumento da fibrose com danos na estrutura pulmonar e formação de bandas fibrosas ou pequenas massas fibrosas; grau (7): a distorção grave da estrutura e grandes áreas fibrosas; e grau (8): obliteração fibroso total de campos. A pontuação média de todos os campos foi realizada como a pontuação da fibrose encontrada no do corte histológico de pulmão (SAMAH *et al.*, 2012). Se houvesse alguma dificuldade em decidir entre duas categorias de número ímpar, o campo foi representado pelo grau de de número par (Exemplo: dúvida entre grau 1 e 3, o campo foi representado por grau 2 (ASHCROFT *et al.*, 1988).

4.12 Análise Morfológica do colágeno

Para análise do padrão de neoformação do colágeno, 3 secções histológicas de 5 μm de espessura foram corados pela técnica histoquímica do picrossírius e

analisados sob luz polarizada por randomização sistêmica (ALBUQUERQUE JÚNIOR *et al.*, 2009). Para tanto, foi utilizado um polarizador para luz transmitida (45MM U-POT, Olympus) acoplado a um microscópio trinocular CX31 (Olympus), com sistema de captura de imagens C-70070 WIDE ZOOM (Olympus). Para essa análise descritiva do padrão de formação do colágeno foram analisadas as seguintes variáveis: birrefringência (esverdeada ou amarelo-esverdeada para colágeno tipo III imaturo, e alaranjada ou avermelhada para colágeno tipo I maduro).

4.13 Preparação de pulmão homogeneizado de tecido

Cada pulmão direito e esquerdo foi pesado, homogeneizado e dividido em microtubos de forma igual (Figura 5). Um dos microtubos foi usado para medição do teor de hidroxiprolina do pulmão (SAMAH *et al.*, 2012).



Figura 5: Armazenamento (congelado) logo após coleta das amostras dos ratos induzidos e não induzidos a FP por bleomicina para medição de hidroxiprolina e TGF- β ₁.

4.13.1 Medição de hidroxiprolina do tecido pulmonar

O teor de colágeno total do pulmão foi determinado pelo método de ligação de corante MAK008-1KT Hydroxyproline Assay Kit (Sigma- Aldrich, representante nordeste/Brasil). Tecidos do pulmão esquerdo foram cortados 10 mg, no qual, uma alíquota de 1 mL de cada suspensão homogeneizada foi colocado em microtubos selados muito bem tapados contendo 100 μ l de água ultrapura e 100 μ l de solução de ácido clorídrico 12 M para ser mantida a 120 ° C durante 3 h para completar digestão.

O hidrolisado resultante foi deixado arrefecer à temperatura ambiente para ser neutralizado com 2 ml de solução de hidróxido de sódio 6 M e, em seguida, foram

transferidos 50 µl e então adicionados a 1 ml de solução consistindo de 1,4% de cloramina T, 10% de propanol, e 0,5 M de acetato de sódio, pH 6,0. Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, 1 ml de reagente de Ehrlich (1 M dimetilaminobenzaldeído (DMBA) em 70% de propanol e 20% de ácido perclórico) foi adicionado, e a solução resultante foi incubada a 60° C durante 1 hora e 30 min. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 560 nm num leitor de microplacas (Thermo Plate tp reader) (Figura 9), e a quantidade de hidroxiprolina foi determinada relativamente a uma curva padrão preparada com a utilização de concentrações conhecidas de hidroxiprolina. Trans-4-hidroxi- L -prolina (10 ug / mL) foi utilizada como uma solução padrão (LI *et al.*, 2015) (Figura 6).



Figura 6: Procedimento de análise da microplaca (96 poços) realizada com as amostras de tecido pulmonar colhidas para quantificação de hidroxiprolina.

4.14 Análise Estatística

Valores descritivos foram expressos das médias e desvios padrões após a normalidade das variáveis com o Kolmogorov smirnov. O programa GraphPad Prism 6.01 foi utilizado para todas as análises estatísticas . Dados gaussianos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) e testes de comparações múltiplas de Tukey. Dados não gaussianos foram analisados pelo teste Kruskal- Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn. A significância estatística foi determinada quando foi $p < 0,05$.

5 REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, E.S.B.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt e Smith (Zingiberaceae). *Acta Bot Bras* 2004; 18(1).
- ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. *et al.* Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *Inter J Morphol* 2009; 27(4):1105-1110.
- ASHCROFT, T. *et al.* Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol* 1988; 41(4): 467-470.
- ATES, I., *et al.* Possible effect of gene polymorphisms on the release of TNF α and IL1 cytokines in coal workers' pneumoconiosis. *Exp Toxic Pathol* 2011 Jan; 63(1–2): 175–179.
- ATZORI, G., *et al.* Attenuation of bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice using the heme oxygenase inhibitor Zndeuteroporphyrin IX-2,4-bisethylene glycol. *Tórax* 2004; 59: 217-223 .
- AYTEMUR, Z. A. Effects of iloprost on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats compared with methyl-prednisolone. *Rev Port Pneumol, et al.* 2012 Nov–Dec; 18(6):272–277.
- BALD, B.G., *et al.* Destaques das Diretrizes de Doenças Pulmonares Intersticiais da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *J Bras Pneumol* 2012; 38(3): 282-291.
- BEZERRA, M. A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CRIDDLE, D.N.; FONTELES, M.C. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essencial oil of *Alpinia Speciosa Schum* on rat ileum. *Phytother Res* 2000; 7(14): 549-551.
- BORGES, F.S. *Dermato-funcional: modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas*. São Paulo: Phorte, 2006.
- BRASILEIRO, B.G. *et al.* Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no "Programa de Saúde da Família", Governador Valadares, MG, Brasil. *Rev Bras Cienc Farm* 2008 São Paulo Oct/Dec; 44(4).
- CAL, K. Effect of physicochemical properties of cyclic terpenes on their ex vivo skin absorption and elimination kinetics. *J Dermatol Sci* 2006b feb; 41(2):.137-142.
- CÂNDIDO, E.A.F., XAVIER-FILHO, L. Viabilidade do uso do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, *Zingiberaceae*, na otimização do tratamento fisioterapêutico em paralisia cerebral espástica. *Arq Bras Neurocir* 2012; 31(3):110-115.
- CHEN L.J., *et al.* Bleomycin induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in pleural mesothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015 Mar 1;283(2):75-82.
- CHERESH, P., *et al.* Oxidative stress and pulmonary fibrosis. *BBA Mol Basis Dis* 2013 jul; (1832)7:1028-1040.

CHITRA, P., *et al.* Berberine attenuates bleomycin induced pulmonary toxicity and fibrosis via suppressing NF- κ B dependant TGF- β activation: a biphasic experimental study. *Toxicol Lett.* 2013 May 23;219(2):178-93.

CUNHA, G.H. *et al.* Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. *Vascul Pharmacol* 2013; 58: 337-345.

DAS, A., ROY, S. Chapter 28- Micromanaging Inflammation and Tissue Repair. *MicroRNA in Regenerative Medicine* 2015. :739-756.

DING, W., DING, L., LI, W.B., PAN, H., LIN, H.D. Pharmacokinetics of deflazacort tablets in healthy Chinese volunteers. *Yao Xue Xue Bao.* 2014 Jun;49(6):921-6.

EROL, I., *et al.* Pneumoconiosis and quartz content of respirable dusts in the coal mines in Zonguldak, Turkey. *Inter J Coal Geol* 2013 Sept; 116–117(1):26-35.

FISHWICK, D. BARBER, C. Pneumoconiosis. *Med* 2012; 40(6):310-313.

FONTENELE, R.P., *et al.* Fitoterapia na Atenção Básica: olhares dos gestores e profissionais da Estratégia Saúde da Família de Teresina (PI), Brasil. *Ciênc Saúde Coletiva* 2013 Rio de Janeiro, aug; 18(8):2385-2394.

GAO Y., *et al.* Baicalein attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats through inhibition of miR-21. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013 Dec;26(6):649-54.

GONÇALVES, N.M.T., *et al.* Políticas de Saúde para a Fitoterapia no Brasil. *Rev Cubana Plant Med* 2013 Ciudad de la Habana oct.-dic; 18(4).

GOU S, ZHU T, WANG W, XIAO M, WANG X.C, CHEN Z.H. Glucagon like peptide-1 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis, involving the inactivation of NF- κ B in mice. *Int Immunopharmacol.* 2014 Oct;22(2):498-504.

GUSTAFSON, T., *et al.* Occupational exposure and severe pulmonary fibrosis. *Resp Med* 2007 Oct; 101(10): 2207–2212.

HEMMINGS, H.C; EGAN, T. D. Pulmonary Physiology. In Lumb AB, Horner, D. *Pharmacology and physiology for Anesthesia: Foundations and Clinical Application.* [edited by] Philadelphia: Saunders; 2013. p.445-457.

HONMA, K., *et al.* Proposed criteria for mixed-dust pneumoconiosis: definition, descriptions, and guidelines for pathologic diagnosis and clinical correlation. *Hum Pathol* 2004 Dec; 35(12):1515–1523.

HUNNINGHAKE, G.W.; SCHWARZ, M.I. State of the art. Does current knowledge explain the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis? A perspective. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4(5): 449-452.

JÄGER, W. *et al.* Pharmacokinetic studies of the fragrance compound 1,8-cineol in Humans during inhalation. *Chem Senses.* 1996 Aug; 21(4):477-480.

JINGFU M., *et al.* Prevalence of coal workers' pneumoconiosis in China: A systematic analysis of 2001–2011 studies. *Int J Hyg Environ Health* 2014 Jan;217(1):46-51.

JUERGENS, U.R., *et al.* Antiinflammatory effects of euclyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes *ex vivo*. *Eur J Med Res* 1998a Sep 17;3(9):407-412.

JUERGENS, U.R., *et al.* Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes *in vitro*. *Eur J Med Res* 1998b; Nov 17;3(11):508-510.

JUERGENS, U.R. *et al.* Antiinflammatory activity of 1,8-cineole (eucalyptol) in bronchial asthma: a Double-blind placebo-controlled Trial. *Respir Med* 2003 Mar; 97(3):250-256.

JUNIOR, W.A.R., *et al.* Psychopharmacological and antioxidante effects of hydroethanolic extract of *Alpinia zerumbet* leaves in mice. *Pharm J* 2013 May-June; 5(3):113-118.

KAUNISTO, J., *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis - a systematic review on methodology for the collection of epidemiological data. *BMC Pulm Med* 2013 Aug 20;13:53.

KHALIL, Z., *et al.* Regulation of Wheal and Flare by Tea Tree Oil: Complementary Human and Rodent Studies. *J Invest Dermatol* 2004; 123(4): 683-690.

KIM, H.J; PERLMAN, D.;TOMIC, R. Natural history of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2015 Jun;109(6):661-70.

KOH, K.J.; PEARCE, A.L.; MARSHMAN, G.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. *British J Dermatol* 2002; 147(6):1212-1217.

KUROKAWA S., *et al.* Effect of inhaled KP-496, a novel dual antagonist of the cysteinyl leukotriene and thromboxane A2 receptors, on a bleomycin-induced pulmonary fibrosis model in mice. *Pulm Pharmacol Ther.* 2010 Oct;23(5):425-31.

LANEY, A. S.; WEISSMAN, D.N. The Classic Pneumoconioses: New Epidemiological and Laboratory Observations. *Clin Chest Med* 2012 Dec;33(4):745-58.

LATTA, K. *et al.* Effects of deflazacort and cortisone on cellular proliferation in the rat thymus. *Life Sci* 2002 Sep 6;71(16):1951-60.

LEE, *et al.* The burden of idiopathic pulmonary fibrosis: An unmet public health need. *Respir Med* 2014 Apr 13;(14)00124-3.

LEMAN, S; BERNET, F.; SEQUEIRA, H. Autonomic dysreflexia increases plasma adrenaline level in the chronic spinal cord-injured rat. *Neuroscience letters* 2000; 286(3): 159-162.

LI, L., *et al.* Total extract of Yupingfeng attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Phytomedicine.* 2015 Jan 15;22(1):111-9

LI, X.W., *et al.* Role of eukaryotic translation initiation factor 3a in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol.* 2015 Feb 15;749:89-97.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Medicinais do Brasil – Nativas e Exóticas*. p.505-07 [s.e.]. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002.

LOVEMAN E., et al. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of treatments for idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2015 Mar;19(20):i-xxiv, 1-336.

LUO, F., et al. Arsenic trioxide inhibits transforming growth factor- β 1-induced fibroblast to myofibroblast differentiation in vitro and bleomycin induced lung fibrosis in vivo. *Respir Res*. 2014 Apr 24;15:51.

LUZ, F. J. F. Plantas medicinais de uso popular em Boa Vista, Roraima, Brasil. *Hortic Bras* 2001 Brasília Mar;19(1).

MARTINEZ, et al. Efeitos da quercetina na lesão pulmonar induzida por bleomicina: um estudo preliminar. *J Bras Pneumol* 2008; 34(7): 445-452.

MIGNANI, S., et al. Expand classical drug administration ways by emerging routes using dendrimer drug delivery systems: A concise overview. *Adv. Drug Del Rev* 2013, (65)10:1316-1330.

NASCIMENTO, N.R.F.; CARDOSO, J.H.L.; LESSA, L.M.A.; RORIZ-FILHO, J.S.; CUNHA, K.M.A.; FONTELES, M.C. Terpinen-4-ol: mechanisms of relation on rabbit duodenum. *J Pharmacol* 2005; 57(4).

NEWELL, R.L.M. Anatomy of the post-laryngeal airways, lungs and diaphragm. *Cardiothorax* 2011 May; 29(5):199–203.

OLIVEIRA, C.C. *Estudo toxicológico pré-clínico do extrato aquoso e do óleo essencial das folhas de Alpinia zerumbet (Pers.) Burt & Smith*. [Dissertação] submetida à coordenação do curso de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, 2008.

PAIVA, M.A.S.S.; AMARAL, S.M.M. Doença pulmonar intersticial crônica na criança. *J Pediatr* (Rio J.) Porto Alegre Maio/Junho 2009;83(3).

PAPAKONSTANTNOU, E.; KARAKIULAKIS, G. The “sweet” and “bitter” involvement of glycosaminoglycans in lung diseases: pharmacotherapeutic relevance. *Br J Pharmacol* Aug 2009; 157(7): 1111–1127.

RAGHU, G; et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;183:788-824.

ROSSARI, J. R. F. *Fibrose pulmonar induzida por bleomicina intratraqueal em ratos wistar: uso do interferon- α -2b em um modelo experimental de síndrome da distração respiratória aguda* [Dissertação] .f.99. Porto Alegre: UFRS, 2004.

ROUMESTAN, et al. Les glucocorticoïdes et leur récepteur: mécanismes d'action et conséquences cliniques. *La Rev Méd Inter* 2004 Sept; 25(9):636–647.

RYAN, P. *et al.* Neonatal pulmonary physiology. *Semin Pediatr Surg* 2013 Nov;22(4):179-184.

SAMAH, M., EL-AIDY A.E.L-R, TAWFIK, M.K, EWAIS, M.M. Evaluation of the antifibrotic effect of fenofibrate and rosiglitazone on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Eur J Pharmacol* 2012, Aug; 689(1-3): 186-193.

SANTOS, B.A *et al.* Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related to L-type Ca(2+) current blockade. *Phytomedicine* 2011a May 15;18(7):539-543.

SANTOS, F.A; *et al.* 1,8-Cineole (eucalyptol) a monoterpene oxide attenuates the colinic damage in rats on acute TNBS-colitis. *Food Chem Toxicol* 2004 Apr;42(4):579-584.

SANTOS, R.L., *et al.* Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. *Rev Bras Plant Med Botucatu* 2011b; 13(4).

SANTOS-JUNIOR, L. *Avaliação do efeito do óleo essencial da Alpinia zerumbet, Zingiberaceae no processo cicatricial após tenotomia parcial no tendão do calcâneo de ratos.* [Dissertação].. Universidade Tiradentes, 2013.

SAPRA, B.; JAIN, S.; TIWARY, A.K. Percutaneous Permeation Enhancement by Terpenes: Mechanistic View. *AAPS J* 2008;10(1):120-132.

SAUL, D. J.; KENDALL, J.B. Respiratory system: applied pharmacology. *Anaesth Intens Care Med* 2011 Dec; 12(12):542–545.

SELMAN, M. *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001 Jan 16;134(2):136-151.

SHANMUGAM, T.; SHANMUGAM, S.; VENUGOPALAN, R. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of *Alpinia speciosa* K. Schum rhizomes. *J Pharm* 2011 Mar; 4(3):728.

SHEN, A. S. *et al.* The intensity of chronic lung inflammation and fibrosis after bleomycin is directly related to the severity of acute injury. *Am Rev Respir Dis.* 1988 Mar;137(3):564-71.

SHI K, *et al.* Pathogenesis pathways of idiopathic pulmonary fibrosis in bleomycin-induced lung injury model in mice. *Respir Physiol Neurobiol* 2014; 1;190:113-7

SILVA, M.N., *et al.* Fibrose pulmonar secundária à amiodarona- A propósito de um caso clínico. *Rev. Portug Pneumol (English Edition)* 2006 Nov-Dec; 12(6):725-730.

SMITH, M.R. *et al.* Curcumin inhibits fibrosis-related effects in IPF fibroblasts and in mice following bleomycin-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010 May;298(5):616-625.

SOUZA, I.C.L., *et al.* Effect of the maltodextrin-induced chemical reticulation on the physical properties and healing potential of collagen-based membranes containing Brazilian red propolis extract. *Int J. Med. Med. Sci.* 2013 Dec 5(12):514-524.

SPAGNOLO, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnostic pitfalls and therapeutic challenges. *Multidiscip Respir Med* 2012 Nov 12;7(1):42.

STEFANOV, A.N. *et al.* Positional Cloning Reveals Strain-Dependent Expression of *Trim16* to Alter Susceptibility to Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *PLoS Genet* 2013;9(1):e1003203.

SWIGRIS, J. *et al.* Pulmonary rehabilitation in idiopathic pulmonary fibrosis: A call for continued investigation. *Respir Med* 2008 Dec;102(12):1675-1680.

SWIGRIS, J.; BROWN, K. Fibrose pulmonar idiopática: uma década de progressos. *J Bras Pneumol* 2006;32(3): 249-260.

TRAASETH, N. *et al.* Role of calcium signaling in the activation of mitochondrial nitric oxide synthase and citric acid cycle. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jul 23;1658(1-2):64-71.

VEIGA-JUNIOR, F.V. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev Bras Farmacogn* 2008 João Pessoa Apr./June;18(2).

VERMA, R., BRAHMANKAR, M., KUSHWAH, L., SURESH, B. Evaluating the inhibitory potential of sulindac against the bleomycin-induced pulmonary fibrosis in wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013 Nov;36(3):769-78.

WANG, H.D., *et al.* Bilirubin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(3):406-411.

WANG, P., *et al.* Determination of the solubility, dissolution enthalpy and entropy of Deflazacort in different solvents. *Fl Phas Equil* 2011;306:171-174.

WINTERS, C.J., *et al.* CaMKII inhibition in type II pneumocytes protects from bleomycin-induced pulmonary fibrosis by preventing Ca²⁺-dependent apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016 Jan 1;310(1):L86-94.

YU N., *et al.* SLC41A1 knockdown inhibits angiotensin II-induced cardiac fibrosis by preventing Mg²⁺ efflux and Ca²⁺ signaling in cardiac fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Dec 15;564:74-82.

YUAN, G., *et al.* Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pac J Clin Nutr* 2006;15(2):143-152.

SUBMISSÃO DO ARTIGO:

“New method of pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice”.

----- Mensagem original -----

Assunto:Submission Confirmation

Data:19/01/2016 11:10

De: RPP <rppneu@elsevier.com>

Para:edna_aragao1@globo.com, edna_candido@itp.org.br

Dear Edna,

We have received your article "New method of pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice" for consideration for publication in Revista Portuguesa de Pneumologia, Portuguese Journal of Pulmonology.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

**Revista Portuguesa de Pneumologia,
Portuguese Journal of Pulmonology**

Título	Área de Avaliação	Classificação
Revista Portuguesa de Pneumologia	INTERDISCIPLINAR	B2

Impact Factor: **1.167** ⓘ

5-Year Impact Factor: **0.670** ⓘ

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Revista Portuguesa de Pneumologia, Portuguese Journal of Pulmonology

6 ARTIGO 1

New method of pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice

B.B.S. Pereyra, ^{a,b,c}, M.M.Freitas ^{a,b}, D.Droppa-Almeida^{a,c}, A.B.Oliveira^{a,b},
T.B.A.Santos^{a,b}, F.F.Padilha ^{a,c}, E.A.F. Cândido^{a,b},

^aTiradentes University, 300 Murilo Dantas Ave, Farolândia. 49032-490
Aracaju/SE, Brazil.

^b Biological testing laboratory and natural products, Research and Technology
Institute (RTI), Tiradentes University.

^c Biomaterials and Molecular Biology Laboratory, Research and Technology
Institute, Tiradentes University.

(*) Correspondence author: Dr. Edna Aragão Farias Cândido

phone number: +557991316322;

email address: edna_aragao1@globo.com

Abstract

Background: Pulmonary fibrosis is a disabling and life-threatening disease, involved in inflammatory processes which proceed in fibroblast proliferation and consequent increase of connective tissue in lung parenchyma, leading to deterioration of function. **Objective:** to determinate the effectiveness of a new method of inducing pulmonary fibrosis with bleomycin (BLM) injected into the lumen of the trachea aided by palpation in mice. **Material and methods:** The sample was consisted of 18 mice subjected to induced pulmonary fibrosis and their controls. After 3 days the animals were euthanized and lungs were removed, which were processed for morphological analysis of the inflammatory infiltrate and check total collagen content of the lung hydroxyproline count in tissue. The GraphPad Prism 1.6 software was used for statistical analysis with ANOVA ONE WAY test with Tukey post-test, p values <0.05 were considered significant. **Results:** It was found that the inflammatory process induced by BLM behaved with infiltration of inflammatory cells reflecting inflammation and increased hydroxyproline with a significant difference. **Conclusion:** The new method proved to be a simple and efficient method for FP induction.

Key words: Pulmonary Fibrosis, *Alpinia*, Trachea.

List of "Abbreviations"

BLM-	Bleomycin
ECAU -	<i>Ethics Committees Animal Use</i>
HE -	Hematoxylin-Eosin
PF-	Pulmonary Fibrosis

Introduction

Pulmonary Fibrosis (PF) is a chronic and progressive disease that affects the lung parenchyma irreversibly. The progression of the disease leads to the replacement of healthy lung tissue by fibrous connective tissue. It affects the disease lung compliance and gas exchange causing severe respiratory failure and death.

The pathology develops secondarily to other pulmonary aggression, resulting from chronic inflammatory diseases, viral, radiotherapy, chemotherapy, among others. However, the origin of pulmonary fibrosis is still unknown in most of cases, so-called idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [1].

The most used experimental model of PF in use today is induced by the BLM in mice [2]. Several authors have reported the induction of pulmonary fibrosis in mice Wistar intratracheal medium, exposing the trachea, where, through a dissection is instilled BLM sulfate single dose of 100mg / kg into the trachea [3]. Other methods used to induce pulmonary fibrosis is through oral and nasal instillation in which, after the animals were anesthetized BLM is administered using intravenous catheters, such as small intratracheal probes [4].

However, the most widely used model is the single intratracheal administration with only one application in low wall model [11] accessing the trachea surgically, requiring the animals to an open procedure and risk aggravating. Thus, this study aimed to verify the effectiveness of a new method of inducing pulmonary fibrosis with BLM injected into the lumen of the trachea aided by palpation in murine.

Materials and Methods

Animals

Adult Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*, 200–300 g) were randomly assigned into one of 3 groups (n = 18, 6 eat group). Rats housed were in controlled conditions at 22 ± 2 °C under a 12-h light/dark cycle, with access to food and water ad libitum. The experiments reported in this study performed were in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. The Ethics Committees Animal Use (ECAU) of the Tiradentes University, Sergipe, Brazil approved study (#070514).

Groups

The groups were made as follows: Sound group without any injuries or procedures; Vehicle group only subjected to instillation of saline solution injected by an insulin syringe in the lumen of the trachea with the aid of palpation; and Lesion group, animals FP induced by instillation of BLM injected by an insulin syringe in the lumen of the trachea with the aid of palpation.

Experimental design

The suggested method modifies the [3] method. Induction of PF was by intratracheal injections surgical procedure BLM sulfate, at doses of 10 U / kg in animals anesthetized with ketamine at 10% (95 mg / kg) and xylazine 2% (12 mg / kg). The instillation of BLM was performed using 100U needle used to inject insulin into the trachea with palpation guidance to locate the trachea.

To get the tracheal lumen access, the needle was inclined at 10 degrees and 0.7cm above the line drawn on the upper limit of the shoulders of the mice (Figure 1).

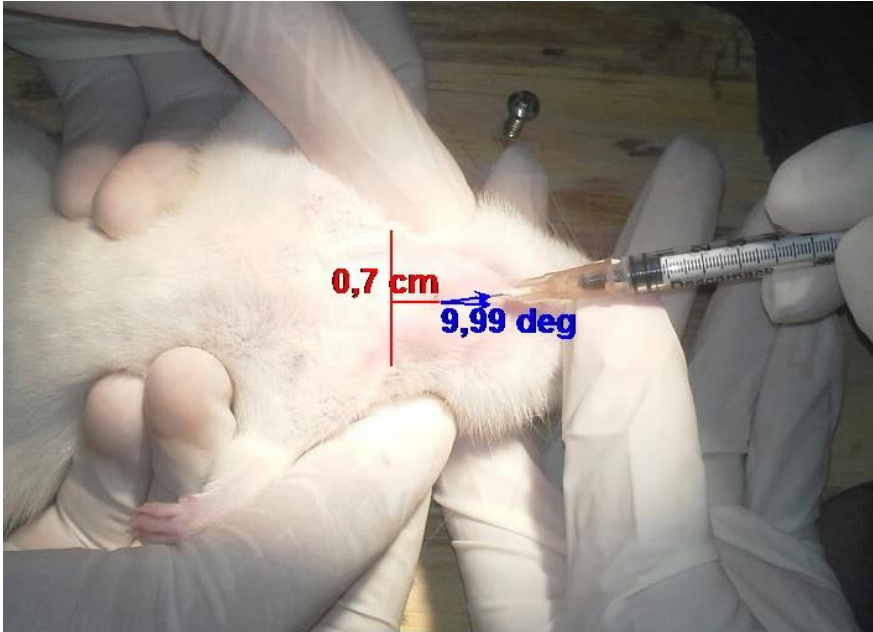


Figure 1: Demonstration of Pulmonary Fibrosis induced by injecting bleomycin directly into trachea without surgery.

After 3 days, the induction of pulmonary fibrosis was started. It was removed the biological material to verify in situ FP (right and left lung). The material was processed for hitomorfológica analyze inflammatory infiltration and the quantitative measurement of hydroxyproline.

Histological analysis of the inflammatory infiltrate

The histological sections stained were with hematoxylin–eosin (HE) according to the procedure described by [5]. The infiltration type and the

inflammatory process were classified as acute when polymorphonuclear cells predominated; or chronic when mononuclear cells predominated.

The fixer used in this study was 70% buffered formalin. Lung tissue with approximately 3 mm thickness was fixed in formalin for 48 hours.

Inclusion and Court

In the dehydration process, successive washings of the lung tissues were performed in increasing concentrations of alcohol (70%, 95%, 95%, 100%, 100%).

Staining with hematoxylin-eosin

The staining technique was as follows: after the hydration process followed by washing in running water and distilled water the slides, they were bathed in hematoxylin for a period of 3 minutes followed by rinsing with water for removal of excess dye. Then it proceeded with eosin staining for 30 seconds. After this, the blades have undergone a new dehydration process by washing with increasing concentrations of alcohol (80%, 95%, 100%). Next, the slides were placed in xylene (diaphanization), where they remained for 10 minutes.

In this staining, the following inflammatory cells were analyzed: lymphocytes, macrophages, neutrophils, and plasma cells. The slides were photographed with microscope (Olympus BX51, Tokyo, Japan) equipped with a digital camera (Olympus DP71, Tokyo, Japan). Images were acquired with a resolution of 2040 x 1536 pixels and saved in file in TIF format.

Morphological Analysis of Inflammatory infiltrates

To evaluate the histological and histopathological features associated with inflammatory lung process, it was analyzed the histological sections stained with hematoxylin-eosin (HE). The predominance of cells involved in the inflammatory process it was by recognition and counting of leukocytes with identification of polymorphonuclear and mononuclear cells. The slides were photomicrographed in four histological fields (magnification of 100x) and were digitized using Olympus 200® image capture software. The images were overlapped by 100 test reticle containing a total of 500 points counting on each blade preventing the counting of the cells. The average of the cells was obtained through summation ratio structures, and the quantitative analysis fields [5].

Measurement of hydroxyproline of the pulmonary tissue

Each right and left lung was weighed, homogenized and divided into microtubes equally. One of the microtubes were used for measurement of lung hydroxyproline content. Content of Total lung collagen was determined by the dye binding method MAK008-1KT Hydroxyproline Assay Kit (Sigma-Aldrich, representing north / Brazil). The left lung tissues were cut and then added 10 mg Ehrlich solution (1 M dimethylaminobenzaldehyde (DMBA) in 70% propanol and 20% perchloric acid). After cooling to room temperature, the absorbance is measured at 560 nm in a microplate reader (Thermo Plate reader tp) and the amount of hydroxyproline was determined relative to a standard curve prepared using known concentrations of hydroxyproline. Trans-4-hydroxy-L-proline (10 g / mL) was used as a standard solution.

Statistical analysis

The program GraphPad Prism 6.01 was used for all statistical analyses. Results are expressed as the mean±SD. Statistical significance ($p<0,05$) was determined using a ONE-WAY ANOVA, and Tukey's test of quantitative measurement. Each time point was analyzed separately.

Results and Discussion

It was realized the standardizing of the pulmonary fibrosis induction by instillation of BLM was carried directly into the trachea the animal in vivo and without the need for surgery. Thus lower risk of death in invasive procedure and difficult to perform.

HE staining was performed to observe the pathological change with pulmonay fibrosis. Histological examination of lung samples showed that BLM induced classical FP through the new method of induction in injury group (Figure 2).

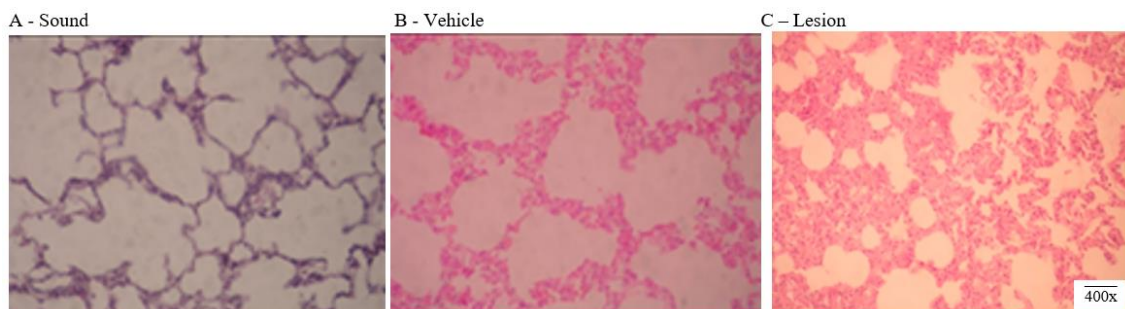


Figure 2: Histological sections of lungs samples of rats treated with BLM showing (HE, 400x magnification).

After the inflammatory cell count ,the most frequent cells were polymorphonucleate inflammatory cells (neutrophils) and mononuclear (macrophages and lymphocytes) in relation to other types of

polymorphonucleate cells (neutrophils, monocytes and plasma cells. The mean count of Lymphocytes ($p < 0.001$) and macrophages ($p < 0.001$) in the injury control group were different in relation to the healthy group. And in relation to the vehicle, lymphocytes ($p < 0.001$) and macrophages ($p < 0.05$) (Figure 3).

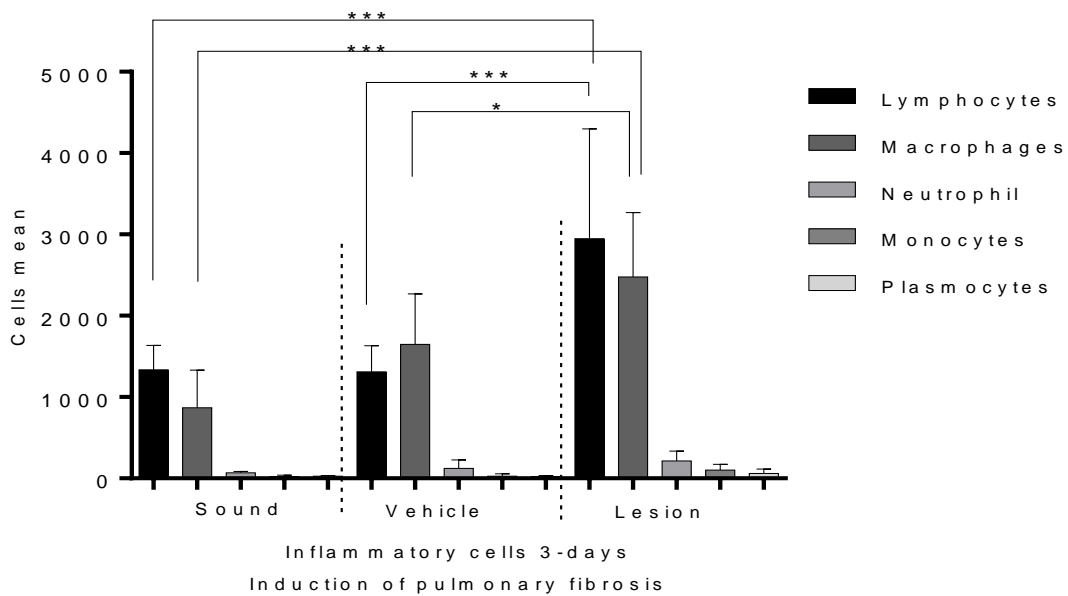


Figure 3: Mean types on Inflammatory cells polymorphonuclear and mononuclear in 3 days in the induction of pulmonary fibrosis for bleomycin. ANOVA ONE-WAY and Tukey pos-test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, and *** $p < 0,001$.

Figure 4 shows the average quantity of collagen deposition in rats with induced by BLM in mice. This analysis was performed with hydroxyproline, demonstrating that the lesion group showed a denser deposition of this compound demonstrated the arrangement for collagen formation in this tissue significantly manner towards Sound groups ($p < 0.01$) and vehicle ($p < 0.05$).

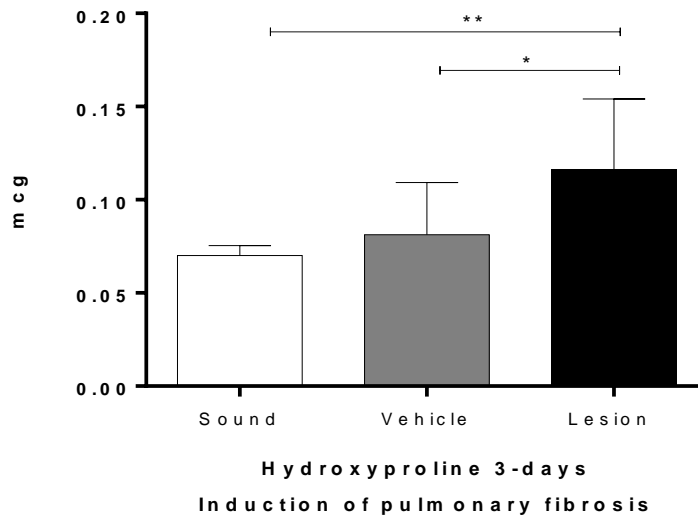


Figure 4: Hidroxyproline analysis in the 3-days at pulmonar fibrosis for bleomicine in rats. Induction intratracheal injections surgical procedure bleomycin sulfate, at 10 U / kg doses. ANOVA ONE-WAY and Tukey pos-test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, and *** $p < 0,001$.

The average between the groups was in the healthy group (0.07 ± 0.0053); in the vehicle group (0.08 ± 0.028); and the lesion group (0.11 ± 0.037). In order to investigate how is the development of PF a widely used method is to experimental lung injury induced by BLM [7].

The PF induction method has been optimized by applying various doses of intraperitoneal application [8], intravenous [9], subcutaneously [10] and nasal instillation [4], however, the most widely used model is the single intratracheal administration with only one application in low wall model [11] accessing the trachea surgically, requiring the animals to an open procedure and risk aggravating.

In this study, we used a new method standardizing the induction of PF by instillation of BLM directly into the living animal trachea, without surgery, only

using an insulin syringe. With this procedure it was possible to verify the possibility of PF induction without the need for surgical access to the trachea followed by instillation of BLM. As the group subjected to induction, group injury, inflammatory cells presented the type lymphocytes and macrophages in the lung tissue predominant form.

In this study, histological analysis was performed in three days, after the first event involving the first pro-inflammatory cells. Ou et al.[12] Report that in FP is common to find lymphocytes and macrophages. This statement is strengthened by [13], [14] and [15] when reporting substantial contribution to these cells in BLM-induced lung inflammation. As for [3], the cells most often found during the acute phase of pulmonary fibrosis are macrophages.

According to Das et al. [16] in acute lung inflammation, inflammatory cells responds injuries, repairing or removing damaged tissues caused by physical, chemical or biological events. The process involves endothelial cells, epithelial cells and alveolar macrophages; and chemokines, adhesion molecules and secreting tissue factor [17]. Monocytes are directed to the site followed by macrophages. Macrophages in turn, are responsible for the high concentrations of reactive oxygen species and nitrogen [17]; [18].

It was observed in this study, the increase in hydroxyproline in the lung tissue injury in group also induced by BLM in relation to Healthy and vehicle groups. This finding is explained by the involvement of more events of inflammation that leads to pulmonary fibrosis. Hydroxyproline is an amino acid present in the composition of collagen induced pro-fibrotic proteins synthesized by transdifferentiation of quiescent fibroblasts into myoblasts [19]; [18]; [20]; [21]; [22]; [23] and hence increase of collagen expression [6].

Conclusion

It is concluded that the induction proposed by this study, by injection instilled into the trachea without surgical access was satisfactory, producing inflammatory cells and increase in hydroxyproline production resulting from PF.

The induction by direct instillation of BLM into the trachea without surgical access and aided by palpation is a quick and economical method; eliminates the complications of surgical procedures and reduces the risk of death of the animals.

Acknowledgements

This work was not financially supported. LBMAT Laboratory with Padilha is recipient of CNPq (National Council for Scientific and Technological Development / Brazil) with productivity grant. BBS Pereyra, Freitas, DDroppa-Almeida, Oliveira and TBASantos received scholarship from PROSUP / CAPES / BR and FAPITEC / SE / BR. Acknowledgements to LMPE, RLCAbuquerque-Junior and Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation / Ministry of Agriculture, Livestock and Supply / BR) have contributed for the analyzes.

Conflict of interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

References

- [1] Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 35, 13180. <http://dx.doi:10.1073/pnas.0605669103>
- [2] Grabarz, F., 2014. Células NKT macrófagos M2 e o desenvolvimento da fibrose pulmonar. São Paulo. Dissertação [Mestrado em Imunologia celular e molecular]. Universidade de São Paulo, instituto de ciências biomédicas; 2014.
- [3] Rossari J R F. Fibrose pulmonar induzida por bleomicina intratraqueal em ratos wistar: uso do interferon-2b em um modelo experimental de síndrome da Distrição respiratória aguda–SDRA –. Porto alegre. Dissertação [Mestrado em medicina: pneumologia]. Universidade Federal do Rio Grando do Sul; 2004.
- [4] François A, Gombault A, Villeret B, Alsaleh G, Fanny M, Gasse P, et al. B cell activating factor is central to bleomycin – and IL-17-mediated experimental pulmonary fibrosis, Journal of Autoimmunity. 2014; 56, 1-11. <http://dx.doi:10.1016/j.jaut.2014.08.003>
- [5] Albuquerque-Júnior RLC, Barreto ALS, Pires JA, Reis FP, Lima SO, Amália M. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. Int. J. Morphol. 2009; 4, 1105-1110. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022009000400025>

[6] Li XW, Wu YH, Li XH, Li D, Du J, Hu CP, et al. Role of eukaryotic translation initiation factor 3a in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol.* 2015; 749, 89-9. <http://dx.doi:10.1016/j.ejphar.2015.01.004>

[7] Jin G Y, Bok S M, Han Y M, Chung M J, Yoon K-H, Kim S R, et al. Effectiveness of rosiglitazone on bleomycin-induced lung fibrosis: Assessed by micro-computed tomography and pathologic scores, *European Journal of Radiology.* 2012; 81, 1901-1906. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejrad.2010.12.061>

[8] Asker S A, Mazroa S A, Boshra V, Hassan A M. Biochemical and histological impact of direct renin inhibition by aliskiren on myofibroblasts activation and differentiation in bleomycin induced pulmonary fibrosis in adult mice. *Tissue Cell.* 2015; 4,373-8. <http://dx.doi:10.1016/j.tice.2015.05.001>

[9] Kurokawa S, Suda M, Okuda T, Miyake Y, Matsumura Y, Ishimura M, et al. Effect of inhaled KP-496, a novel dual antagonista of the cysteinyl leukotrine and thromboxane A2 receptors, on a bleomycin-induced pulmonary fibrosis model in mice. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2010; 5, 425-431. <http://dx.doi:10.1016/j.pupt.2010.04.008>

[10] Della Latta V, Cecchettini A, Del Ry S, Morales MA. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacol Res.* 2015; 97,122-130. <http://dx.doi:10.1016/j.phrs.2015.04.012>

[11] Chen LJ, Ye H, Zhang Q, Li FZ, Song LJ, Yang J, et al. Bleomycin induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in pleural mesothelial cells .Toxicol Appl Pharmacol. 2015; 2, 75-82.

<http://dx.doi:10.1016/j.taap.2015.01.004>

[12] Ou XM, Feng, YL, Wen FQ, Huang XY, Xiao J, Wang K, et al. Simvastatin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Chin. Med. J. (Engl.). 2008; 121, 1821–1829.

[13] Todd NW, Scheraga RG, Galvin JR, Iacono AT, Britt EJ, Luzina IG, et al. Lymphocyte aggregates persist and accumulate in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. J. Inflamm. 2013; Res., 6, 63–70.

<http://dx.doi:10.2147/JIR.S40673>

[14] Bargagli E, Prasse A, Olivieri C, Muller-Quernheim J, Rottoli P. Macrophage-derived biomarkers of idiopathic pulmonary fibrosis. Pulm. Med. 2011; 717130. <http://dx.doi:10.1155/2011/717130>

[15] Subbian S, Tsenova L, O'Brien P, Yang G, Koo MS, Peixoto B, et al. Phosphodiesterase-4 inhibition combined with isoniazid treatment of rabbits with pulmonary tuberculosis reduces macrophage activation and lung pathology. Am. J. Pathol. 2011; 1, 289-

301. <http://dx.doi:10.1016/j.ajpath.2011.03.039>

[16] DAS, A., ROY, S. Micromanaging Inflammation and Tissue Repair.

MicroRNA in Regenerative Medicine. 2015; 28,739- 756.

<http://dx.doi:10.1016/B978-0-12-405544-5.00028-9>

[17] Papakonstantinou E, Karakioulakis G. The “sweet” and “bitter” involvement of glycosaminoglycans in lung diseases: pharmacotherapeutic relevance. Br J

Pharmacol. 2009; 7, 1111–1127.

<http://dx.doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00279.x>

[18] Smith MR, Gangireddy SR, Narala VR, Hogaboam CM, Standiford

TJ, Christensen PJ, et al. Curcumin inhibits fibrosis-related effects in IPF

fibroblasts and in mice following bleomycin-induced lung injury. Am J Physiol

Lung Cell Mol Physiol. 2010; 5, 616-625.

<http://dx.doi:10.1152/ajplung.00002.2009>

[19] Hunninghake, G,W, Schwarz, M, I. State of the art. Does current

knowledge explain the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis? A

perspective. Proc Am Thorac Soc. 2007; 5, 449-452.

<http://dx.doi:10.1513/pats.200702-03MS>

[20] Cheresh P, Kim SJ, Tulasiram S, Kamp DW. Oxidative stress and

pulmonary fibrosis. Biochim Biophys Acta. 2013; 7, 1028-1040.

<http://dx.doi:10.1016/j.bbadis.2012.11.021>

[21] Luo F, Zhuang Y, Sides MD, Sanchez CG, Shan B, White ES, et al. Arsenic trioxide inhibits transforming growth factor- β 1-induced fibroblast to myofibroblast differentiation in vitro and bleomycin induced lung fibrosis in vivo.

Respir Res. 2014. 1, 51. <http://dx.doi:10.1186/1465-9921-15-51>

[22] Shi K, Jiang J, Ma T, Xie J, Duan L, Chen R, et al. Pathogenesis pathways of idiopathic pulmonary fibrosis in bleomycin-induced lung injury model in mice.

Respir Physiol Neurobiol. 2014; 190, 113-7.

<http://dx.doi:10.1016/j.resp.2013.09.011>

[23] Kim Hj, Perlman D, Tomic R. Natural history of idiopathic pulmonary

fibrosis. Respir Med. 2015; 6, 661-70. <http://dx.doi:10.1016/j.rmed.2015.02.002>

SUBMISSÃO DO ARTIGO:

“Essential oil of Alpinia zerumbet partially reverts the bleomycin-induced pulmonary fibrosis in murine model”.

----- Mensagem original -----

Assunto:Submission Confirmation

Data:19/01/2016 11:14

De:"Ingrid Maier" <" <im_phytomedicine@t-online.de>

Para:edna_aragao1@globo.com, edna_candido@itp.org.br

Dear Edna,

We have received your article "Essential oil of Alpinia zerumbet partially reverts the bleomycin-induced pulmonary fibrosis in murine model" for consideration for publication in Phytomedicine asOriginal Article

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

Phytomedicine

International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology

Impact Factor: **3.126** ⓘ

5-Year Impact Factor: **3.373** ⓘ

Título	Área de Avaliação	Classificação
Phytomedicine (Stuttgart)	INTERDISCIPLINAR	A2

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Ingrid Maier

Managing Editor

Phytomedicine

7 ARTIGO 2

Essential oil of *Alpinia zerumbet* partially reverts the bleomycin-induced pulmonary fibrosis in murine model

B.B.S. Pereyra,^{a,b,d} M.M.Freitas^{a,b}, D.Droppa-Almeida^{a,d}, A.B.Oliveira^{a,b},
T.B.A.Santos^{a,b}, W.L.P.Vivas^{a,c}, F.F.Padilha^{a,d}, E.A.F. Cândido^{a,b},

^aTiradentes University, 300 Murilo Dantas Ave, Farolândia. 49032-490
Aracaju/SE, Brazil.

^bBiological testing laboratory and natural products, Research and Technology
Institute (RTI), Tiradentes University.

^cBiomedical laboratory, Tiradentes University.

^dBiomaterials and Molecular Biology Laboratory, Research and Technology
Institute, Tiradentes University.

Corresponding author:

(*) Correspondence author: Dr. Edna Aragão Farias Cândido

phone number: +557991316322;

email address: edna_aragao1@globo.com

Abstract

Background: Pulmonary Fibrosis (PF) is a chronic and progressive disease that presents little possibility of therapy. The *Alpinia zerumbet* has attracted great attention due to their therapeutic actions. The essential oil obtained from the leaves and branches shows through chemical analysis the presence of several terpenes, among them are highlighted terpene-4-ol (23.2%), 1-8 cineole (21.8%). **Objective:** To evaluate the effect of the essential oil of *Alpinia zerumbet* (EOAz) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in murine model.

Material and methods: Seventy-five Wistar rats were used and after each treatment period histomorphological evaluation of inflammatory infiltrate; Total and differential leukocytes counts; categorizing of the grade of PF; quantification of collagen and of transforming growth factor beta 1 (TGF β 1) were performed. **Results:** Values significantly lower ($p < 0.05$) were observed in the group treated with EOAz in relation to the weights of the lungs, inflammatory cells, TGF β 1, collagen deposition and hydroxyproline levels at 03, 14 and 28 days when compared to groups Fibrosis Control (FC) and deflazacort (DFZ).

Conclusion: EOAz significantly enhances the anti-inflammatory response with potential regenerative effect possibly by inhibitory action of TGF β 1 and the decrease of the collagen deposition.

Key terms: *Alpinia*; bleomycin ; pulmonary fibrosis.

List of "Abbreviations"

BLM-	Bleomycin
ECAU -	Ethics Committees on Animal Use
DFZ-	Deflazacort
EOAz-	Essential oil of <i>Alpinia zerumbet</i>
FC-	Fibrosis Control
HE -	Hematoxylin-Eosin
BALF -	Bronchoalveolar lavage fluid
PF-	Pulmonary Fibrosis
PGE2-	Prostaglandin-2
TGF β -	Transforming growth factor beta
TLR2-	Toll-like receptor 2
TLR4-	Toll-like receptor 4

Introduction

PF is a progressive and chronic interstitial lung disease characterized morphologically by diffuse inflammatory process which result in excessive fibroblast proliferation and thickening of alveolar septa with collagen deposition in lung parenchyma (Martinez et al. 2008; Smith et al. 2010). It stems from adverse toxic effects of anticancer drugs such as BLM during human cancer therapy. It is estimated that with the time of exposure to toxic dust from 5 to 10 years has already been demonstrated to provide some kind of risk limitation pulmonary disease and fibrosis. In 2000, the average estimated cost rates for

each health patient related to PF were approximately \$33,304 and \$40,707 in the United States (Raghu et al. 2004; Stefanov et al. 2013).

Many treatment options have been investigated, But the standard treatment used includes anti-inflammatory agents and immunosuppressive drugs, which offer little efficacy and many side effects affecting multiple organs such as glaucoma, cataracts, euphoria, depression, diabetes, arterial systemic hypertension (ASH), peptide ulcer and pancreatitis, leads it causes thus a poor quality of life and shorter survival of patients (Swigris and Brown 2006; Smith et al. 2010). For this reason, it is necessary to implement a therapeutic method such as herbal medicine, which is more effective without adverse effects (Veiga-Junior 2008; Loveman et al. 2015).

Alpinia zerumbet is a herbaceous plant of the Zingiberaceae family, with synonymy *A.speciosa*, commonly found in Brazilian northeastern. Popularly, all parts of the plant (rhizomes, leaves, flowers and seeds) are used as medicinal agent (Lorenzi and Matos 2002; Albuquerque and Neves 2004). Studies in murine model with essential oil or ethanol extract of *Alpinia zerumbet* showed anti-inflammatory action by inhibiting edematous processes by up to 66%. Results were also found about the essential oil from the rhizome of *Alpinia zerumbet* that demonstrated anti-inflammatory and antinociceptive action in rats with arthritis, with changes in the hippocampus in the brain (Leman et al. 2000). The anti-inflammatory chronic activity from ethanol extract of *Alpinia zerumbet* was described, showing induction of fibroblasts and synthesis of collagen and mucopolysaccharides during the formation of granuloma tissue (Shanmugam et al. 2011).

In addition to antiinflammatory effects, experimental studies using EOAz has shown a variety of potentially beneficial activities, including effects anti-oxidant; effects anxiolytic and antidepressant (Santos et al. 2011); vasorelaxant and antihypertensive (Cunha et al.2013); promoting wound healing, the differentiation/remodeling of connective tissue, influencing in fibroblasts (Junior et al. 2013) and a regulating action of this oil in Ca²⁺ channel (Cunha et al. 2013; Santos-Junior 2013). The essential oil obtained from the leaves and branches of *Alpinia zerumbet* was chemically analyzed by GC/MS revealing the presence of various terpenes, including stood terpene-4-ol (23.2%), 1-8 cineol (21, 8%), γ -terpene (11.6%) and γ -cymene (5.8%) (Santos-Junior 2013). By presenting this anti-inflammatory action and potential regenerative effect, preclinical studies on the essential oil of *Alpinia zerumbet* were conducted to test its effects in tissues with PF. Thus, objective of this study was to assess the anti-inflammatory and regenerative fibrotic tissue subjected to treatment with EOAz in a murine model of PF.

Material and methods

Research Design

This study is characterized as a comprehensive study, experimental, using a quantitative analytical approach data. It was analyzed by the Ethics Committee on Animal Use (ECAU) of the referred university with approval protocol: #070514 (Annex I).

The obtainment of essential oil from *Alpinia zerumbet*

The essential oil of *Alpinia zerumbet*, was collected from green leaves and extracted by steam distillation by Hebron. The *Alpinia zerumbet* plant is cataloged In the Herbarium at the Federal University of Sergipe an dried specimen was cataloged with the ASE code No. 08245. The dose was 0.05 ml/10kg diluted in saline solution with 100% concentrated. This bioproduct to base of Essential Oil *Alpinia zerumbet* (EOAz), that it were analyzed by chromatographically and presented hydrocarbon monoterpenes (40.32%), predominantly γ -terpinene (11.63%) and p-cymene (5.85%); oxygenated monoterpenes (50.94%), terpene-4-ol (23.23%) and 1,8 cineole (21.77%); oxygenated sesquiterpenes (3.52%) and sesquiterpene hydrocarbons (2.8%) [Article being evaluated in this journal].

Preparations of Pulmonary fibrosis in rats

The followed method induces PF by intra tracheal injections in surgical procedure of BLM sulfate, at doses of 10 U / kg (Rossari 2004). The animals were anesthetized with ketamine hydrochloride 10% (95 mg / kg) and xylazine 2% (12 mg / kg). The model suggested in the present study provides the anesthesia procedure in animals as described above, followed by palpation and the trachea instillation (needle 100U) BLM sulfate within the trachea 10 U / kg doses. To have the access to the tracheal lumen needle was inclined to 10 grades and 0.7cm above the line drawn at the upper limit of the shoulders of the mice.

Experimental Groups

75 Wistar rats (*Rattus norvegicus albinos*) were used in both sexes, with approximately 12 weeks of age and weighing 250 ± 50 g, from the Bioterium of the University Tiradentes. The animals remained in standard polypropylene cages, grouped in number of 5, kept in a controlled environment, with light/dark cycle of 12 hours with temperature ($\sim 22^\circ$), receiving water and balanced food *ad libitum*. The 75 animals were divided into 5 groups:

- Sham Group, only the induction process (n = 15);
- Vehicle treated with saline (n = 15);
- FC treated with BLM + saline (1 ml) (n = 15) Inhaled;
- Deflazacort group treated with BLM + deflazacort (DFZ) (1 mL / kg) (n = 15) by gavage;
- Group EOAz, BLM+ submitted to inhalation therapy by EOAz (0.05 mL / 10 kg) (n = 15).

Subdivided in 3 times: 03, 14 and 28 days, respectively.

Pulmonary coefficient

On days 0, 03, 14 and 28, all mice were weighed to observe the weight changes of mice in each group. Each time the mice were sacrificed and the lungs were removed and weighed (Li et al. 2015). Pulmonary coefficient was determined by the equation:

$$\text{Pulmonary coefficient (PC)} = \frac{\text{Lung weight ratio (g)}}{\text{Body weight (Kg)}} \times 100\%$$

Histological procedures and morphological analysis

Serial 5 µm thick sections were obtained from the paraffin-embedded samples and stained in hematoxylin-eosin. The intensity of the inflammatory response was assessed as described in Table 1 (Souza et al. 2013).

Table 1. Description of the parameters for the histological evaluation of the intensity of the inflammatory response in the areas of the wounds.

Score of the inflammatory response	Semi Quantification of inflammatory response	Classification of the inflammatory response
0	Absent	Absent
1	Slight	
2	Moderate	Chronic (predominance of lymphocytes and histiocytes)
3	Intense	
4	Intense	Subacute (balance of neutrophils, lymphocytes and histiocytes)
5	Intensa	Acute (mainly neutrophils)

Source: Adapted from Souza et al. (2013).

Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF)

The BALF fluid was collected from the right lung. The trachea was cannulated and left bronchus was sutured. Was instilled physiological saline solution into the lumen of the right respiratory tract an endotracheal tube attached to a 5 mL syringe, approximately 85% of the total rate fluid was recovered. The cell-free supernatant was collected after centrifugation at 5000 rpm for 10 min at 4 ° C. Cell pellets were resuspended in 200 ul of physiological saline solution. Total cell counts were performed by an automated device (Sysmex Hematology™ XE-5000 -Laboratório of Biomedicine at the University Tiradentes) and differential (Wright-Giemsa) were performed using hemocytometer (Kurokawa et al. 2010).

Hematological parameters evaluation

Blood samples were taken after euthanasia of the animals which were used in collecting tubes internally coated with ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), thereby preventing coagulation of the sample. The hematological parameters were evaluated differential count, such as eosinophils (%), lymphocytes (%), neutrophils and monocytes (%).

Another collection was performed using blood serum after centrifugation at 3000 rpm for 4 min to measure the plasma concentration of TGF- β 1.

TGF- β 1 level measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The plasma concentration of TGF- β 1 was measured by ELISA kit (Life Technologies) as described above and the procedure according to the manufacturer's instructions (Chen et al. 2015).

PF grades by the *Ashcroft scale*

For quantitative histological analysis, a numerical fibrotic scale was used "*Ashcroft scale*" (Ashcroft et al. 1988). Briefly, the degree of PF was scored on a scale of 0-8, examining six randomly selected fields per sample at a magnification of 400 \times .

Morphological analysis of collagen

For pattern analysis of collagen formation, histological sections of 5 mm thick were stained by immunohistochemistry technique of picrosirius and analyzed under polarized light (Souza et al. 2013). For this descriptive analysis of collagen formation pattern the following variables were analyzed: birefringence (greenish or yellow-green to collagen type III immature, and orange or reddish to mature type I collagen).

Measurement of hydroxyproline of the pulmonary tissue

Content of Total lung collagen was determined by the dye binding method MAK008-1KT Hydroxyproline Assay Kit (Sigma-Aldrich, representing north / Brazil). The left lung tissues were cut and then added 10 mg Ehrlich solution 1 M dimethylaminobenzaldehyde in 70% propanol and 20% perchloric acid).

After cooling to room temperature, the absorbance is measured at 560 nm in a microplate reader (Thermo Plate reader tp) and the amount of hydroxyproline was determined relative to a standard curve prepared using known concentrations of hydroxyproline. Trans-4-hydroxy-L-proline (10 g / ml) was used as a standard solution (Li et al. 2015).

Statistical analysis

Descriptive values are expressed as means and standard deviations. The program GraphPad Prism 6.01 was used for all statistical analyses. Results are expressed as the mean \pm SD. Statistical significance was determined for comparison between different groups of the same cell, one-way ANOVA, and Tukey's test of quantitative measurement or Kruskal-Wallis, and Dun's test of quantitative measurement. Each time point was analyzed separately. Statistical significance was determined when p was <0.05 .

Results

Pulmonary coefficient

The EOAz Group is the one that most resembles Sham and Vehicle groups at 3 and 14 days showing lower values, but no significant difference between the Deflazacort and FC groups (Figures 1 and 2):

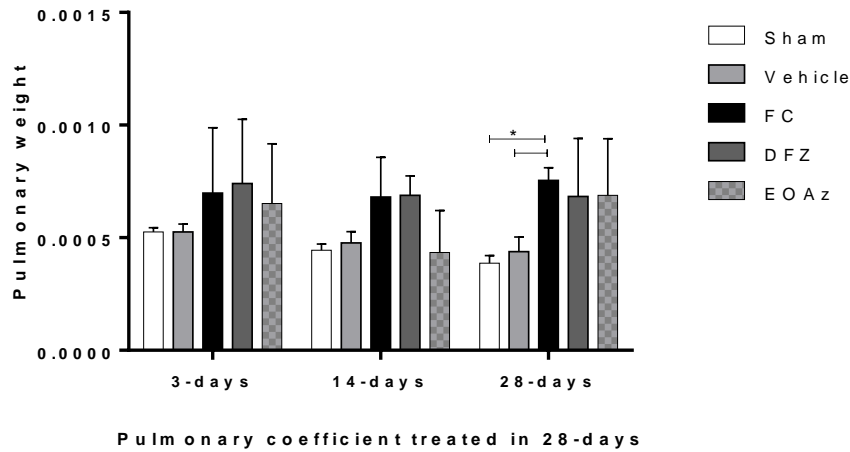


Figure 1: Pulmonary coefficient obtained showed a significant difference just 28 days between groups (Sham and Vehicle vs. FC, * $p < 0.05$; ANOVA ONE-WAY with Tukey post test).

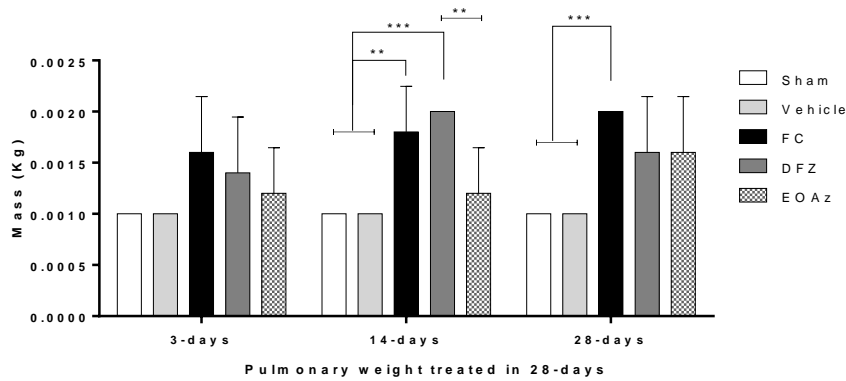


Figure 2: Lung weight obtained showed a significant difference at 14 days (Sham vs. SC, $p < 0.01$), (FC vs. vehicle, $p < 0.01$) (DFZ vs. Sham $p < 0.001$) (Vehicle DFZ vs. $p < 0.001$), vs. DFZ EO Az, $p < 0.01$). In 28 days it had significant difference only of Sham and groups vs. Vehicle FC ($p < 0.001$, ANOVA ONE-WAY with Tukey post test).

Histopathological Analysis

Histological examination of lung samples show classic PF induction by the BLM. The Sham group performed with intact lumen, while the other groups had compromised lumen. The inflammatory response was observed with the more visible presence of pathological changes in the FC group with narrowing of the alveolar spaces and filling them by inflammatory cells; followed by the DFZ and EOAz group. The inflammatory cells present were macrophages, lymphocytes and neutrophils (Figure 3).

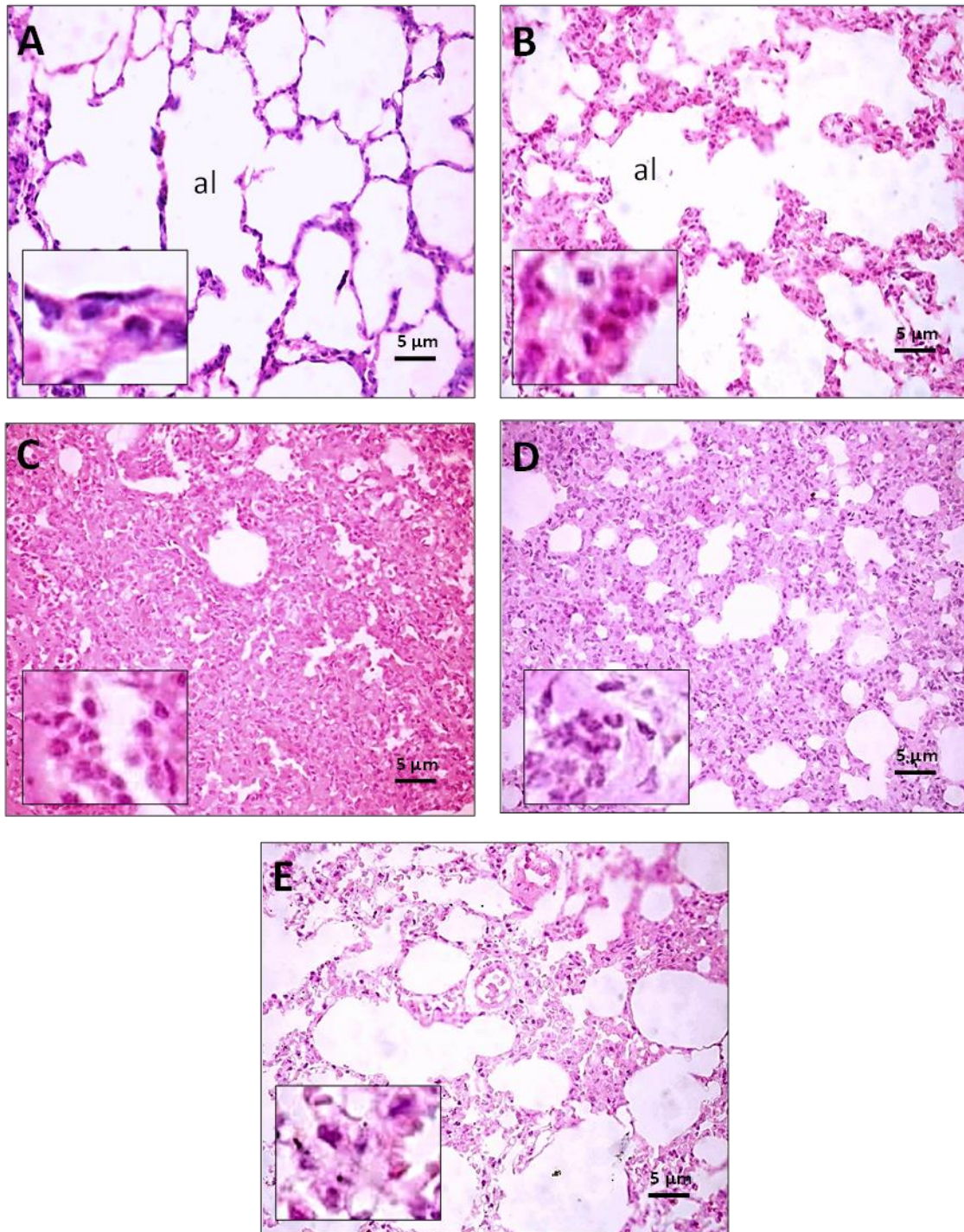


Figure 3: Histological sections stained with H.E, 3 days (400x magnification). A- Sham Group: alveolar structure with septum and completed alveolar spaces with the presence of type I and type II pneumocytes and absence of inflammatory cells; B- Vehicle Group: alveolar structure with septum and completed alveolar spaces. Small increase in alveolar thick with rare presence

of neutrophilic infiltrate; C- Fibrosis Control Group: obliteration of septum and alveolar spaces with intense inflammatory infiltrate composed of neutrophils and deposition of fibrotic mass; D- Deflazacort Group: narrowing of the alveolar septa with neutrophilic infiltrate; E- EOAz Group: alveolar structure with septa and alveolar spaces with small increased thickness and presence infiltrate composed of neutrophils.

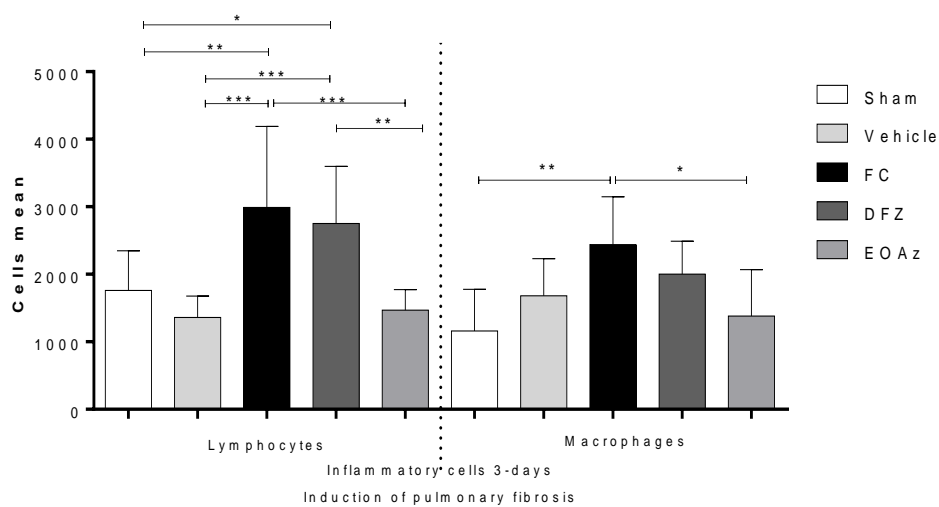


Figure 4: After 03 days of treatment on acute phase, the average Macrophage and Lymphocyte cells were predominant in both groups. FC groups and DFZ vs. Sham, vehicle and EOAz; ONE-WAY ANOVA with Tukey post test; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

BALF

A higher amount of total inflammatory cells at 3 and 14 days of treatment in FC and DFZ groups compared to sham, vehicle and EOAz (p < 0.001) were observed; and decreased compared to the SC group (p < 0.05) at 3 days of treatment (Table 2 and 3). The EOAz group performed elevated just 14 days of

treatment compared to sham and vehicle groups, but decreased compared to control and DFZ groups ($p < 0.001$).

Table 2 shows the differential leukocytes at time of 3 days of treatment. Neutrophils were presented with high value in DFZ group ($p < 0.05$) compared to the sham group; in the control groups ($p < 0.05$) and DFZ ($p < 0.001$) when compared to the vehicle group. Eosinophils were equal among all groups. The lymphocytes were decreased significantly in the control group ($p < 0.001$; $p < 0.01$) and DFZ ($p < 0.001$) compared to Sham group, Vehicle and EOAz. Monocytes in the vehicle group ($p < 0.05$) appeared high in relation to Sham and EOAz group. And basophils were found equal in their values.

Table 2. Average \pm Standard Deviation of the total count and differential leukocyte bronchoalveolar lavage of rats induced to PF in three days.

Cells	Sham	Vehicle	FC	DFZ	EOAz
Total	127 \pm 68,95 ^a	292,7 \pm 167,3 ^a	763,3\pm891,1^{b***c*}	356,7\pm200,1^{d*}	296,7 \pm 174,4 ^a
Leukocytes					
Neutrophils	(46 \pm 0,5) ^{acd}	(29,3 \pm 2,7) ^a	(59,7\pm25,2)^{acd*}	(71,7\pm16,4)^{bcd*}	(46,5 \pm 14,5) ^{abcd}
Eosinophils	(0,1 \pm 0,2) ^a	(0,6 \pm 1) ^a	(0,1 \pm 0,2) ^a	(0,0 \pm 0,0) ^a	(0,0 \pm 0,0) ^a
Lymphocytes	(37,2 \pm 2,9) ^a	(36,1 \pm 13,7) ^a	(9,7\pm7)^{bc**}	(5,4\pm5,9)^{bc***}	(37,6 \pm 14,9) ^a
Monocytes	(6,9 \pm 1,5) ^a	(23,7\pm13)^{b*}	(14,1 \pm 10,2) ^{ab}	(10,9 \pm 11,9) ^{ab}	(6,6 \pm 1,5) ^a
Basophils	(9,6 \pm 1,0) ^a	(10,1 \pm 1,2) ^a	(16,2 \pm 8,8) ^a	(11,9 \pm 1,7) ^a	(9,2 \pm 2,6) ^a

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Anova One Way.

Table 3 shows the differential leukocytes time of 14 days of treatment. Neutrophils were presented with decreased value in the vehicle group ($p < 0.05$) compared to the sham group; and similar to time of three days of elevated treatment in the control group ($p < 0.05$; $p < 0.001$) and DFZ ($p < 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.05$) compared to Sham group, Vehicle and EOAz. Eosinophils in DFZ group ($p < 0.05$) showed higher values when compared to the sham and control

groups. Lymphocytes, as well as three days of treatment, were also decreased significantly in the control groups ($p < 0.001$) and DFZ ($p < 0.001$; $p < 0.05$) compared to Sham group, Vehicle and EOAz. Monocytes also remained high in Vehicle group ($p < 0.05$) when compared to Sham group and now also the DFZ group. Basophils remained similar in both groups.

Table 3. Average \pm Standard Deviation of the total count and differential leukocyte bronchoalveolar lavage of rats induced to PF in 14 days.

Cells	Sham	Vehicle	FC	DFZ	EOAz
Total	127 \pm 68,95 ^a	292,7 \pm 167,3 ^a	760\pm458,1^{bc***}	746,7\pm231,6^{bc***}	673,3\pm148,7^{d***}
Leukocytes					
Neutrophils	(46 \pm 0,5) ^a	(29,3\pm2,7)^{b*}	(64\pm4,9)^{c*}	(67,4\pm18)^{cd**}	(48 \pm 6,2) ^a
Eosinophils	(0,1 \pm 0,2) ^a	(0,6 \pm 1,1) ^{ab}	(1 \pm 1,7) ^a	(3,2\pm4)^{b*}	(2 \pm 1) ^{ab}
Lymphocytes	(37,27 \pm 2,9) ^a	(36,1 \pm 13,7) ^a	(15,6\pm3,7)^{bc***}	(9,3\pm7,3)^{d***c*}	(27,7 \pm 114,2) ^{ab}
Monocytes	(6,9 \pm 1,5) ^{ac}	(23,7\pm13)^{bc*}	(10,8 \pm 7,9) ^{ac}	(8,3 \pm 7,7) ^{ab}	(12,4 \pm 8,4) ^{abc}
Basophils	(9,6 \pm 1) ^a	(10,1 \pm 1,2) ^a	(9,3 \pm 1,4) ^a	(11,7 \pm 5,1) ^a	(9,8 \pm 0,9) ^a

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Anova One Way.

And Table 4, on 28 days of treatment, the differential leukocytes remained similar to previous treatments. Neutrophils showed high values similar to the times of 3 and 14 days of treatment in the control group ($p < 0.05$) compared to vehicle group. Eosinophils proved to be equal among the groups. Lymphocytes, unlike the times 3 and 14 days of treatment, failed to perform high in DFZ and control groups ($p < 0.01$, $p < 0.001$) compared to Sham and vehicle groups, and DFZ compared to EOAz ($p < 0.05$) to present reduced ($p < 0.05$) compared to EOAz group, while the EOAz was equal to Sham group and vehicle groups. DFZ. Monocytes, as well as at 3 and 14 days of treatment, also remained high in Vehicle group ($p < 0.05$) compared to Sham group and DFZ.

Table 4. Average total score \pm Standard Deviation of total and differential count of leukocytes in bronchoalveolar lavage in rats induced to pulmonary fibrosis within 28 days.

Cells	Sham	Vehicle	FC	DFZ	EOAz
Total	127 \pm 68,95 ^a	292,7 \pm 167,3 ^{ac}	573,3\pm194,8^{bc**}	430 \pm 325,8 ^{ac}	313,3 \pm 201,1 ^{ac}
Leukocytes					
Neutrophils	(46 \pm 0,6) ^{ab}	(29,3 \pm 3,1) ^a	(59,5\pm 3,5)^{ab*}	(44,9 \pm 35,1) ^{ab}	(38,5 \pm 24,4) ^{ab}
Eosinophils	(0,1 \pm 0,2) ^a	(0,6 \pm 1,1) ^a	(1 \pm 1,7) ^a	(0,4 \pm 0,6) ^a	(0,6 \pm 1,1) ^a
Lymphocytes	(37,2 \pm 3,2) ^{ab}	(36,1 \pm 15,4) ^{ab}	(21,4\pm 5,4)^{a*}	(21,1\pm15,8)^{a*}	(46 \pm 25,7) ^{ab}
Monocytes	(6,9 \pm 1,7) ^a	(23,7\pm14,5)^{bc*}	(9,73 \pm 4,6) ^{abc}	(22,4\pm16,5)^{abc*}	(5,4 \pm 2,6) ^{ab}
Basophils	(9,6 \pm 1,1) ^a	(10,1 \pm 1,4) ^a	(8,3 \pm 3,5) ^a	(11,1 \pm 4,7) ^a	(9,2 \pm 2,8) ^a

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Anova One Way.

Evaluation of Hematologic Parameters

The bloods were collected at the end of each treatment period to be analyzed and compared between groups. There was an increase of inflammatory cells in groups PF induced by BLM in comparison to the Sham and the Vehicle groups which were not induced. There was a significant difference between the groups only in neutrophils and lymphocytes in 14 and 28 days (Table 5).

In 14 days (Table 5) of treatment the neutrophils in the control group were decreased compared to Sham group, Vehicle and DFZ ($p < 0.05$). The lymphocytes had decreased in the DFZ and EOAz groups ($p < 0.05$) compared to Sham group, Vehicle and Control; and increased in vehicle and control groups ($p < 0.05$) compared to Sham group, DFZ and EOAz.

As early as 28 days (Table 5) the neutrophils in control and DFZ groups were elevated ($p < 0.05$; $p < 0.01$) compared to Sham group, Vehicle and EOAz; and decreased in EOAz and vehicle group ($p < 0.05$) compared to Sham group, control and DFZ. The amounts of lymphocytes were all different from each other and except compared to the sham group; the DFZ group ($p < 0.001$) had the

lowest values, followed by the control group ($p < 0.01$) compared to the other groups; and the vehicle group ($p < 0.05$), followed even with higher values, the EOAz group ($p < 0.01$) had higher values than the other groups.

Table 5. Average \pm Standard Deviation of Hematologic parameters of rats induced to Pulmonary Fibrosis in 28 days.

Differential leukocytes count on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats					
Neutrophils	Sham	Vehicle	FC	DFZ	EOAz
3 dias	44,2 \pm 2,86 ^a	37,2 \pm 10,43 ^a	49,8 \pm 15,35 ^a	57,8 \pm 10,47 ^a	41,8 \pm 11,88 ^a
14 dias	44,2 \pm 2,86 ^a	37,2 \pm 10,43 ^a	34,2\pm7,15^{b*}	49 \pm 10,7 ^a	51,6\pm8,73^{b*}
28 dias	44,2 \pm 2,86 ^a	37,2\pm10,43^{b*}	50,6\pm11,59^{cd*}	54,2\pm6,53^{cd*}	31,6\pm10,06^{b*}
Eosinophils	Sham	Vehicle	FC	DFZ	EOAz
3 dias	0,8 \pm 1,3 ^a	1,2 \pm 1,3 ^a	2,2 \pm 1,92 ^a	0,6 \pm 0,89 ^a	1 \pm 1 ^a
14 dias	0,8 \pm 1,3 ^a	1,2 \pm 1,3 ^a	1 \pm 1 ^a	1,2 \pm 1,3 ^a	1 \pm 0,7 ^a
28 dias	0,8 \pm 1,3 ^a	1,2 \pm 1,3 ^a	1,2 \pm 0,83 ^a	1,6 \pm 1,67 ^a	1,6 \pm 1,6 ^a
Lymphocytes	Sham	Vehicle	FC	DFZ	EOAz
3 dias	50,4 \pm 4,33 ^a	56,6 \pm 9,23 ^a	42,8 \pm 11,43 ^a	37 \pm 8,6 ^a	45 \pm 15,36 ^a
14 dias	50,4 \pm 4,33 ^a	56,6\pm9,23^{b*}	57\pm7,51^{b*}	42,4\pm9,8^{c*}	40,4\pm6,69^{c*}
28 dias	50,4 \pm 4,33 ^a	56,6\pm9,23^{b*}	42,6\pm12,86^{c**}	37,4\pm5,27^{d***}	64,2\pm8,92^{e***}
Monocytes	Sham	Vehicle	FC	DFZ	EOAz
3 dias	5 \pm 2,55 ^a	5 \pm 2,82 ^a	5,4 \pm 2,51 ^a	4,2 \pm 3 ^a	5,6 \pm 1,67 ^a
14 dias	5 \pm 2,55 ^a	5 \pm 2,82 ^a	7,6 \pm 1,81 ^a	7 \pm 4,3 ^a	7 \pm 3,39 ^a
28 dias	5 \pm 2,55 ^a	5 \pm 2,82 ^a	4,8 \pm 2,04 ^a	6,4 \pm 4,98 ^a	2,8 \pm 1,09 ^a

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Anova One Way.

TGF- β 1 level measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The quantification of the cytokine TNF- β 1 in 3 days of treatment, it was increased in FC group compared to the Sham group, Vehicle and EOAz. The DFZ group was also found elevated compared to Sham and vehicle groups. In 14 days all experimental groups were found high in relation to Sham and vehicle groups. And in 28 days the FC group was still elevated compared to Sham and vehicle groups, though the DFZ and EOAz groups were found elevated only in relation to the Sham group (Figure 5).

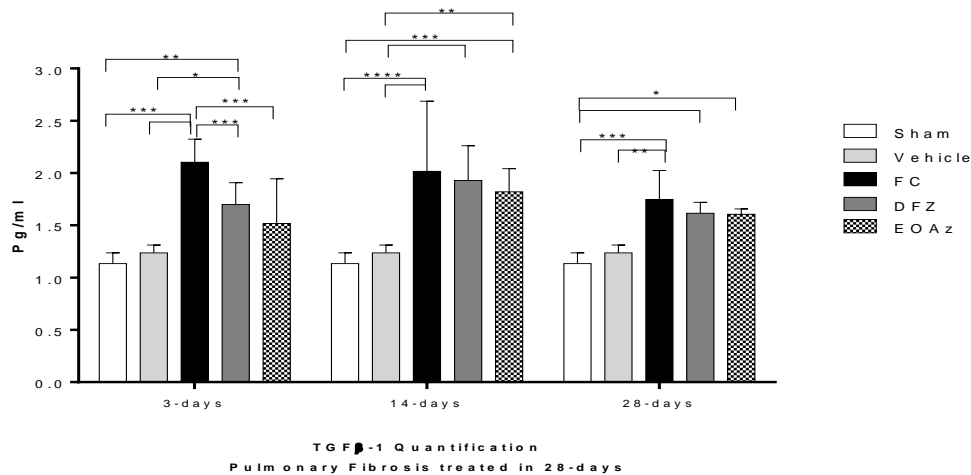


Figure 5: Quantification of TGF- β 1 in FP bleomycin-induced in rats. TGF- β 1 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Sham and Vehicle ($p < 0.0001$) Fibrosis control; Fibrosis control ($p < 0.001$); Sham Vehicle and Fibrosis control ($p < 0.05$) deflazacort and Fibrosis control ($p < 0.001$) Essential Oil *Alpinia zerumbet* in 3 days; And Sham Vehicle ($p < 0.0001$) Fibrosis control; Essential Oil *Alpinia zerumbet* ($p < 0.001$) Sham; Deflazacort ($p < 0.001$) Vehicle; Essential Oil *Alpinia zerumbet* ($p < 0.01$) Vehicle after 14 days. Fibrosis control ($p < 0.001$) Sham; Sham ($p < 0.05$) and deflazacort and Essential Oil *Alpinia zerumbet* and Fibrosis control ($p < 0.01$) Vehicle after 28 days.

PF grades by the Ashcroft score

The morphology of the pulmonary tissue demonstrated that in 14 days it presented PF if compared to Sham group and vehicle. The FC group was the group with the highest degree of pulmonary fibrosis (3.8 ± 1.3 ; $p < 0.001$). However, the EOAz group despite having PF (2.6 ± 1.1 ; $p < 0.01$), this was lower than in the group FC. With in 28 days of treatment the FC group increased their degree of fibrosis (4.7 ± 1.1 ; $p < 0.001$) and the DFZ groups

(4.48 ± 0.87 ; $p < 0.001$) and EOAz (3.4 ± 1.1 , $p < 0.001$) also showed the same behavior. However, EOAz group showed lower fibrosis in relation to DFZ groups ($p < 0.05$) and FC ($p < 0.01$) (Figure 6).

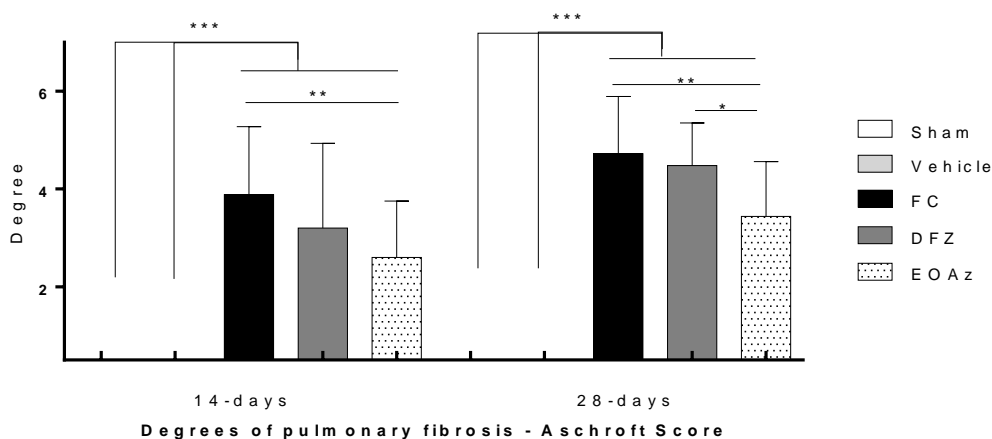


Figure 6: Grades of Fibrosis by the Ashcroft score (14 and 28 days). In 14 days there was a significant difference between the groups (Sham and Vehicle vs. Fibrosis control, Deflazacort and Essential Oil *Alpinia zerumbet*); (FC vs EOAz $p < 0.01$). In 28 days (Essential Oil *Alpinia zerumbet* vs. Fibrosis control, $p < 0.01$); (Deflazacort vs. Essential Oil *Alpinia zerumbet*, $p < 0.05$).

Qualitative analysis of pattern formation of collagen (Picosirius)

The Picosirius staining was performed for the qualitative determination of collagen type I and III between groups. The sham group showed a normal distribution of collagen around the alveoli.

From groups PF induced by BLM in 14 days of treatment, the most intense collagen deposition was in groups FC and DFZ with moderate deposition for collagen type I and III; and scarce deposition of collagen type I and III to EOAz

group. The Sham & Vehicles groups showed scarcity in type I collagen (Figure 7).

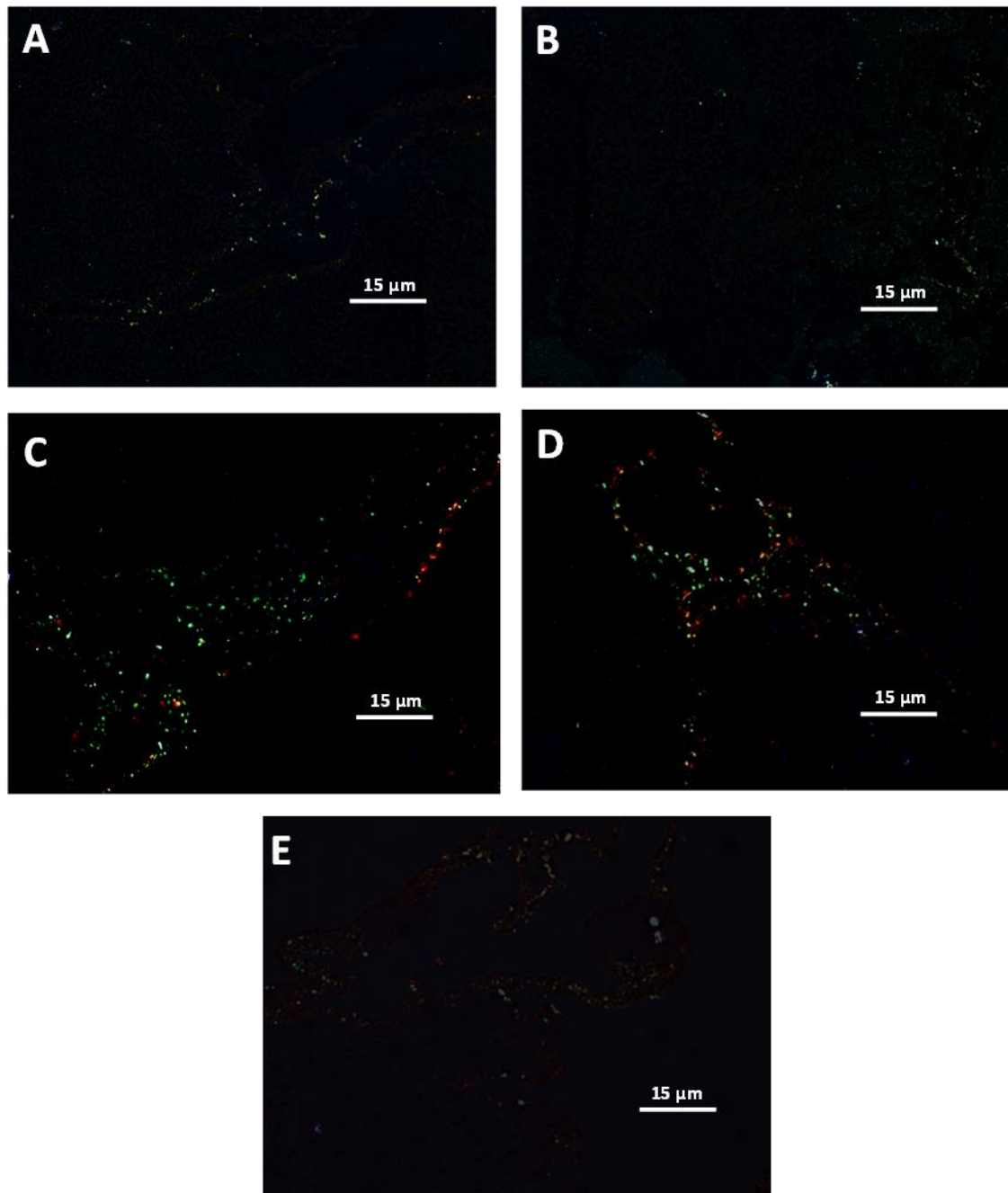


Figure 7: Histological sections stained with Picrossirius, 14 days (100x magnification). A- Sham Group; B- Vehicle Group; C- Fibrosis Control Group; D- Deflazacort Group; E- EOAz Group. Small amount of collagen in all groups being more present in Fibrosis Group Control group followed by Deflazacort.

For the groups treated within 28 days it was found that the FC group deposition of collagen type I and III was intense; in DFZ group showed moderate deposition of collagen type I and III; and EOAz group deposition was scarce for type I collagen (Figure 8).

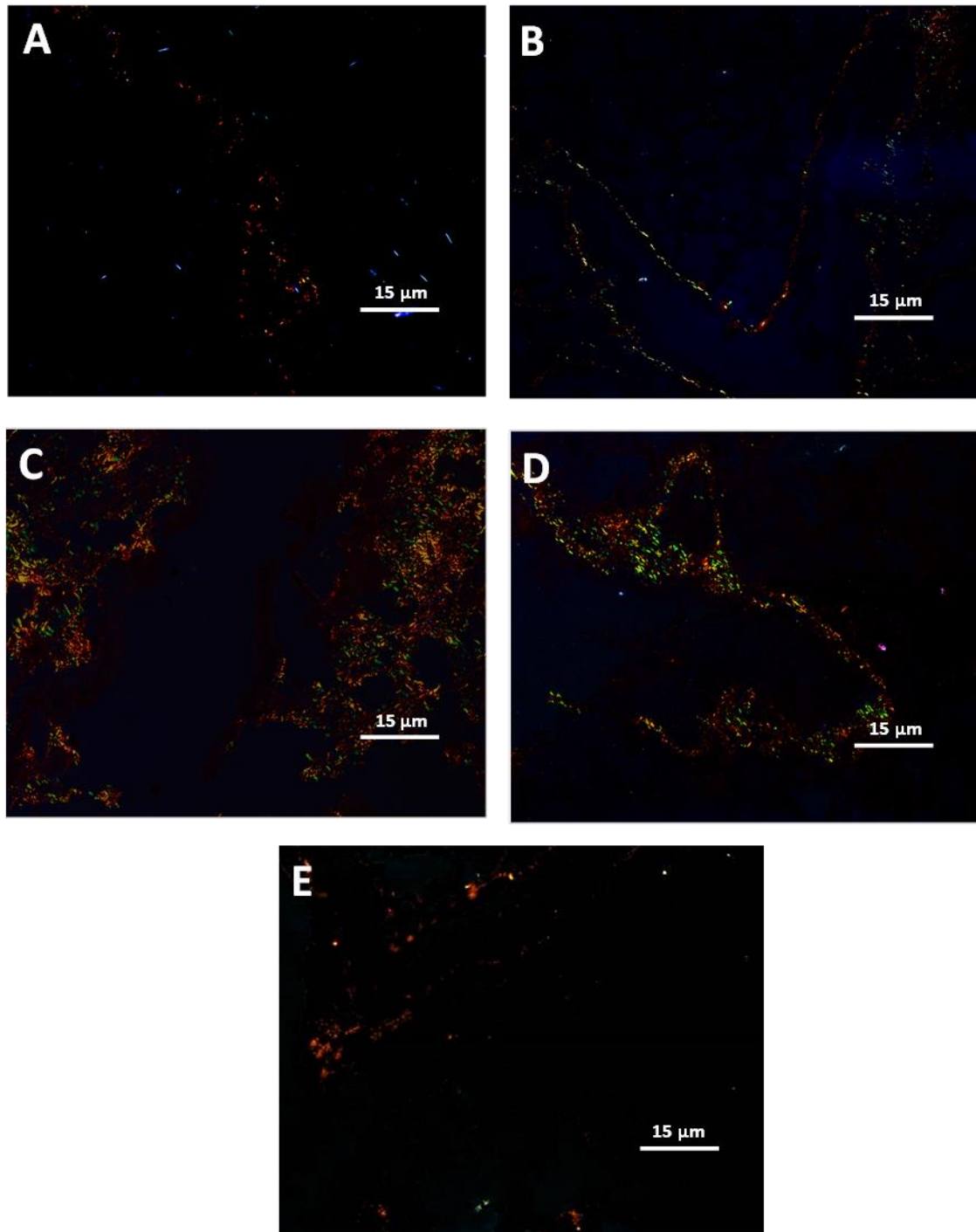


Figure 8: Histological sections stained with Picrosirius 28 days (100x magnification). A- Sham Group: Small Quantity of normal collagen; B- Vehicle

Group : Small Quantity of normal collagen; C- Fibrosis Control Group : excessive collagen deposition (yellow-green birefringence and reddish yellow) in abnormal fibrotic tissue ; D- Deflazacort Group : Collagen deposition Moderate of abnormal fibrous tissue; E- EOAz Group : Small collagen deposition in fibrotic tissue.

Collagen accumulation in the lungs of mice with bleomycin-induced PF (hydroxyproline)

To quantify the collagen deposition in all groups and times it was performed hydroxyproline analysis. In 3 days of treatment the group FC performed with higher quantitative of hydroxyproline ($p < 0.05$) followed by DFZ ($p < 0.05$) compared to the sham group. In 14 days of treatment the FC group still remains with greater quantitative of hydroxyproline ($p < 0.001$; $p < 0.05$) compared to Sham group, Vehicle and EOAz. The DFZ group had higher quantitative of hydroxyproline compared to the sham group. And the EOAz performed equal to the Sham and vehicle groups and different to FC group ($p < 0.05$). However, in 30 days of treatment, FC groups ($p < 0.001$) and DFZ ($p < 0.01$) values were still high in relation to the Sham group; and the SC group ($p < 0.01$) compared to vehicle group (Figure 9).

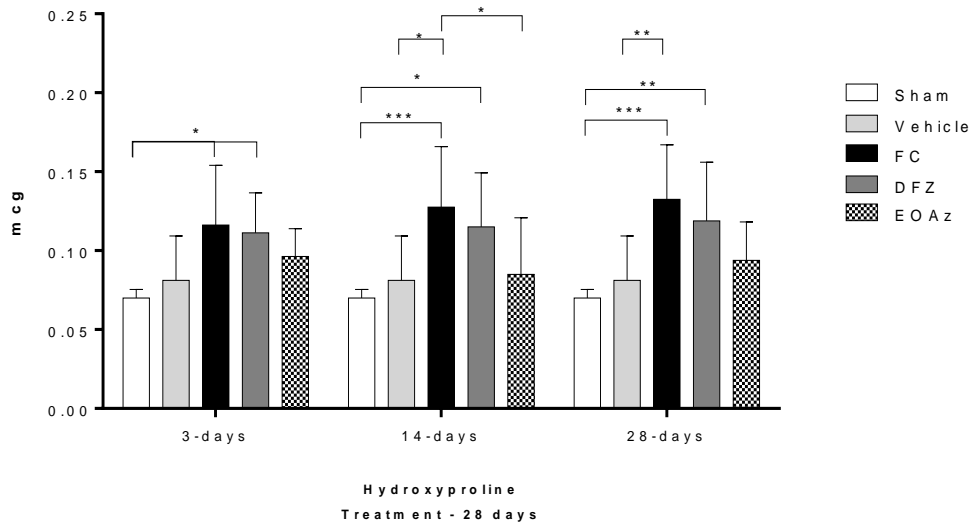


Figure 9: Analysis of hydroxyproline in pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. In 3 days (Sham vs. SC, $p < 0.05$); (FC vs. vehicle $p < 0.05$); In 14 days (Sham vs. FC, $p < 0.001$); (DFZ vs. Sham $p < 0.05$); (EOAz vs. SC, $p < 0.05$); In 28 days (Sham vs. FC, $p < 0.001$); (Sham vs DFZ, $p < 0.01$) and (FC vs. vehicle, $p < 0.01$).

Discussion

This study analyzed the inflammatory and restorative response of PF. It was used BLM, which is an anti-neoplastic drug for inducing the animals to PF.

After 24h of BLM administration, there is an increase of the number of neutrophils. In about seven days, the infiltration of lymphocytes starts, which continue until the eleventh day. The fibrotic response becomes detectable in the tissues for 11 days, persisting for at least twenty days (Matute-Bello et al. 2008).

In this study it was realized nebulization to therapy of EOAz therefore it has been seen that the time of absorption of 1.8 cineole by inhalation therapy is found in the bloodstream after 15 minutes (Jäger et al. 1996). The EOAz may

have acted on the attenuation of PF through the reduction of the inflammatory response, therefore, in treating of mice at 03 days it showed lower intensity inflammation in the histology (HE) compared to the group treated with DFZ and FC groups.

This is probably due to the fact that the active principles terpene-4-ol and 1.8 cineol have potential anti-inflammatory action (Santos et al. 2011). The principle active 1,8-cineole provided anti-inflammatory effect, mucolytic airway suitable for long-term treatment of airway inflammation in asthma and other corticosteroid responsive injury (Juergens et al. 2003).

Furthermore, neutrophilic inflammation responds poorly to treatment with corticosteroids (Gibson et al. 2001). So it was observed in this study, when performed blood smear within 28 days a significant increase in neutrophils from FC and DFZ groups. The BALF also showed similar results other inflammatory responses analyzed, since presented leukocyte differentials with acute neutrophilic inflammation, subacute and chronic in FC group; acute and subacute in DFZ group.

Macrophages and lymphocytes represent cells most found in lung tissue damage in the acute phase (Todd et al. 2013). Rossari (2004) reports macrophages as predominant cells on the pulmonary fibrosis. This was also seen in this study because in the induced groups there is an increased amount of macrophages and lymphocytes in histopathological analysis in HE compared to other cells (neutrophils, monocytes and eosinophils) and non-induced groups (Sham and vehicle) to PF.

In studies with essential oil of *Melaleuca alternifolia*, where the main component is terpene-4-ol, there was modulation of macrophages by the action

of proinflammatory cytokines resulting in toll-like receptor activation 2 (TLR2) and toll-like receptor 4 (TLR4) (Nogueira et al. 2014). These findings may be reinforced by Jäger et al. (1996) when demonstrated the 1,8 cineole with an inhibitory effect of interleukin 1, 4 and 5. Kim et al. (2015) reported the anti-inflammatory action of terpene-4-ol by suppression of TNF- α , IL-1b, IL-8, IL-10, and the prostaglandin-2 production (PGE2) production by monocytes activated by lipoproteins.

Another inflammatory action duct it would be the activation of TGF- β 1 by the Smad signaling pathway protein expression. The increased presence of the protein expression of Smad 2 and 3 of TGF- β 1 is shown dependently the increase of extracellular Ca²⁺ channels or increase in the expression of ion channels KCa3.1 (Roach et al. 2015). This study used EOAz which features in its constitution the terpene-4-ol. According Santos et al. (2011) the oil has ability to modulate calcium channel L-type Ca²⁺ by expressed CaV1.2 (A1c) or CaV1.3. Possibly the results of EOAz group in the acute phase of treatment inhibiting TGF- β 1 justified by present values equal to the Sham group and different group Vehicle FC. This answer probably cause proinflammatory attenuation in the early days of inflammation.

Still in relation to TGF- β 1, it can influence the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts when there is an increase of extracellular Ca²⁺ or increasing the expression of ion channels KCa3.1 inducing the expression of Smad 2 and 3. The increased expression will enable production fibrosis (Roach et al. 2015). The inability to regulate this process results in excess production of extracellular matrix and the accumulation in lung tissue (Kurokawa et al. 2010).

In the current study there was an relative increase of lungs weight and lung index mice with BLM induced within 14 days group in FC and DFZ groups when compared to mice EOAz group and Sham and Vehicle. This may be due to excessive deposition of collagen as a result of fibrosis (Li et al. 2015). This excessive deposition of collagen is a feature in which PF is reported by several authors (Chen et al. 2015).

Epithelial changes associated with abnormal wound healing have an important role in establishing the PF (Selman et al. 2001). These findings are confirmed by the analysis of Ashcroft scale and the Picrosirius staining.

In reading Ashcroft scale the degree of PF was higher in the FC group, while lower in EOAz group in subacute treatment. On the other hand, in chronic treatment the results showed an increase of the degree of fibrosis; however, the EOAz group was less fibrotic relative to FC and DFZ group.

In Picrosirius staining the FC and DFZ groups showed moderate to intense deposition of collagen; while in EOAz group that deposit was during all the time in low collagen deposition.

This result in the production of fibrosis was also observed in the analysis of hydroxyproline, since the FC group has elevated levels of hydroxyproline from acute phase to chronic. As the DFZ group showed high levels of hydroxyproline in the sub-acute and chronic. The EOAz group showed significantly lower levels compared to the FC group in 14 days, most active time of hydroxyproline to fibrosis induction. Thus, it was observed in this study that there were higher levels of degrees of fibrosis, collagen deposition and Hydroxyproline in FC and DFZ groups compared to the group treated with EOAz.

Acknowledgements

This work was not financially supported. LBMAT Laboratory with Padilha is recipient of CNPq (National Council for Scientific and Technological Development / Brazil) with productivity grant. BBS Pereyra, Freitas, DDroppa-Almeida, Oliveira, WLPVivas and TBASantos received scholarship from PROSUP / CAPES / BR and FAPITEC / SE / BR. Acknowledgements to LMPE, RLCAbuquerque-Junior and Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation / Ministry of Agriculture, Livestock and Supply / BR) have contributed for the analyzes.

Conflict of interest

The authors have declared that there is no conflict of interest

Conclusion

This study demonstrates that EOAz improves the inflammation of the PF with regenerative potential effect possibly be concluded by the anti-inflammatory action, inhibitory action of beta Transforming growth factor synthesis (TGF- β 1) and decreased collagen.

From these results it can lead new prospects of EOAz as a therapeutic target in fibro-proliferative lung diseases.

References

Albuquerque ESB, Neves LJ, 2004. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.)

Burt e Smith (Zingiberaceae). *Acta Bot Bras.* 1, 109-121.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062004000100010>

Ashcroft, T, Simpsom JM, Timbrell V, 1988. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a pulmonary fibrosis on an numerical scale. *J Clin Pathol.* 4, 467-470. <http://dx.doi:10.1136/jcp.41.4.467>

Chen LJ, Ye H, Zhang Q, Li FZ, Song LJ, Yang J, Mu Q, Rao SS, Cai PC, Xiang F, Zhang JC, Su Y, Xin JB, Ma WL, 2015. Bleomycin induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in pleural mesothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2, 75-82. <http://dx.doi:10.1016/j.taap.2015.01.004>

Cunha GH, de Moraes MO, Fachine FV, Frota Bezerra FA, Silveira ER, Canuto KM, de Moraes ME, 2013. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. *Vascul Pharmacol.* 5-6,337-45. <http://dx.doi:10.1016/j.vph.2013.04.001>

Gibson PG, Simpson JL, Saltos N, 2001. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest.* 5,1329-36. <http://dx.doi:10.1378/chest.119.5.1329>

Jäger W, Nasel B, Nasel C, Binder R, Stimpfl T, Vycudilik W, Buchbauer G, 1996. Pharmacokinetic studies of the fragrance compound 1,8-cineol in Humans during inhalation. *Chem Senses*. 4, 477-480.

<http://dx.doi:10.1093/chemse/21.4.477>

Juergens U.R, Dethlefsen U, Steinkamp G, Gillissen A, Regges R, Vetter H, 2003. Antiinflammatory activity of 1,8-cineole (eucalyptol) in bronchial asthma: a Double-blind placebo-controlled Trial. *Respir Med*. 3,250-256.

<http://dx.doi:10.1053/rmed.2003.1432>

Junior WAR, Piatto AL, Conterato GMM, Wildner SM, Marcon M, Moreira S, Dal Santo G, Mocelin R, Emanuelli T, Santos CAM, 2013.

Psychopharmacological and antioxidant effects of hydroethanolic extract of *Alpinia zerumbet* leaves in mice. *Pharm J*. 3,113-118.

<http://dx.doi:10.1016/j.phcgj.2013.05.003>

Kim HJ, Perlman D, Tomic R, 2015. Natural history of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 6, 661-70. <http://dx.doi:10.1016/j.rmed.2015.02.002>

Kurokawa S, Suda M, Okuda T, Miyake Y, Matsumura Y, Ishimura M, Saito R, Nakamura T, 2010. Effect of inhaled KP-496, a novel dual antagonist of the cysteinyl leukotriene and thromboxane A₂ receptors, on a bleomycin-induced pulmonary fibrosis model in mice. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 5, 425-431.

<http://dx.doi:10.1016/j.pupt.2010.04.008>

Leman S, Bernet F, Sequeira H, 2000. Autonomic dysreflexia increases plasma adrenaline level in the chronic spinal cord-injured rat. *Neuroscience letters*. 3, 159-162. [http://dx.doi:10.1016/S0304-3940\(00\)01111-3](http://dx.doi:10.1016/S0304-3940(00)01111-3)

Li, X.W., Wu YH, Li XH, Li D, Du J, Hu CP, Li YJ, 2015. Role of eukaryotic translation initiation factor 3a in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol.*, 749, 89-9. <http://dx.doi:10.1016/j.ejphar.2015.01.004>

Lorenzi H, Matos FJ, 2002. *Plantas Medicinais do Brasil – Nativas e Exóticas*. 2.ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA.

Loveman E, Copley VR, Colquitt J, Scott DA, Clegg A, Jones J, O'Reilly KM, Singh S, Bausewein C, Wells A, 2015. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of treatments for idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 20, i-xxiv, 1-336. <http://dx.doi:10.3310/hta19200>

Martinez JAB, Ramos SG, Meirelles MS, Verceze AV, Arantes MR, Vannucchi H, 2008. Efeitos da quercetina na lesão pulmonar induzida por bleomicina: um estudo preliminar. *J Bras Pneumol.* 7, 445-452. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132008000700003>

Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR, 2008. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 3, L379–L399.

<http://dx.doi:10.1152/ajplung.00010.2008>

Nogueira MN, Aquino SG, Rossa Junior C, Spolidorio DM, 2014. Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1b, IL-6 and IL-10. *Inflamm Res.* 9,769-78. <http://dx.doi:10.1007/s00011-014-0749-x>

Raghu G, Nyberg F, Morgan G, 2004. The epidemiology of interstitial lung disease and its association with lung câncer. *British Journal of Cancer.* 91, 3-10. <http://dx.doi:10.1038/sj.bjc.6602061>

Roach KM, Feghali-Bostwick C, Wulff H, Amrani Y, Bradding P, 2015. Human lung myofibroblast TGFβ1-dependent Smad2/3 signalling is Ca(2+)-dependent and regulated by KCa3.1K(+) channels. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 8:5.

<http://dx.doi:10.1186/s13069-015-0022-0>

Rossari J R F., 2004. Fibrose pulmonar induzida por bleomicina intratraqueal em ratos wistar: uso do interferon-2b em um modelo experimental de síndrome da Distrição respiratória aguda–SDRA –. Porto alegre. Dissertação [Mestrado em medicina: pneumologia]. Universidade Federal do Rio Grando do Sul.

Santos BA, Roman-Campos D, Carvalho MS, Miranda FM, Carneiro

DC, Cavalcante PH, Cândido EA, Filho LX, Cruz JS, Gondim AN, 2011.

Cardiodepressive effect elicited by the essential oil of *Alpinia speciosa* is related

to L-type Ca(2+) current blockade. *Phytom.* 7,539-543.

<http://dx.doi:10.1016/j.phymed.2010.10.015>

Santos-Junior, L., 2013. Avaliação do efeito do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, Zingiberaceae no processo cicatricial após tenotomia parcial no tendão do calcâneo de ratos. Aracaju. Dissertação [Mestrado em Saúde e Ambiente]. Universidade Tiradentes.

Selman M, King TE, Pardo A; American Thoracic Society; European Respiratory Society; American College of Chest Physicians, 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med.* 2,136-51.

<http://dx.doi:10.7326/0003-4819-134-2-200101160-00015>

Shanmugam T, Shanmugam S, Venugopalan R, 2011. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of *Alpinia speciosa* K. Schum rhizomes. *J Pharm Res.* 3,728.

Smith MR, Gangireddy SR, Narala VR, Hogaboam CM, Standiford TJ, Christensen PJ, Kondapi AK, Reddy RC, 2010. Curcumin inhibits fibrosis-related effects in IPF fibroblasts and in mice following bleomycin-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 5, 616-625.

<http://dx.doi:10.1152/ajplung.00002.2009>

Souza ICL, Nascimento MF, Neta RGS, Santos JC, Costa LP, Cardoso JC, Albuquerque-Júnior RLC, 2013. Effect of the maltodextrin-induced chemical reticulation on the physical properties and healing potential of collagen-based membranes containing Brazilian red propolis extract. *Int. J. Med. Med. Sci.* 12, 514:524. <http://dx.doi:10.5897/IJMMS2013.0950>

Stefanov AN, Fox J, Depault F, Haston CK, 2013. Positional Cloning Reveals Strain-Dependent Expression of Trim16 to Alter Susceptibility to Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *PLoS Genet.* 1, e1003203. <http://dx.doi:10.1371/journal.pgen.1003203>

Swigris JJ, Brown KK, 2006. Fibrose Pulmonar idiopática: uma década de progressos. *J Bras Pneumol.* 3, 249-260. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132006000300012>

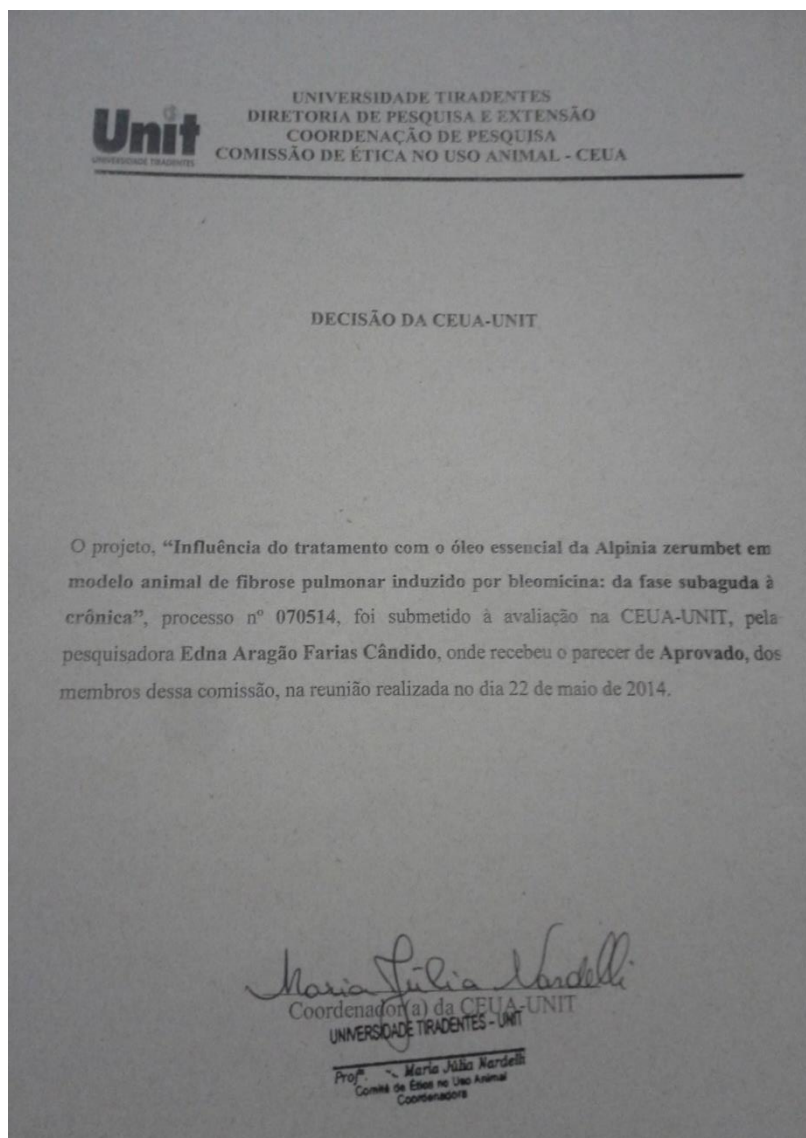
Todd NW, Scheraga RG, Galvin JR, Iacono AT, Britt EJ, Luzina IG, Burke AP, Atamas SP, 2013. Lymphocyte aggregates persist and accumulate in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Inflamm. Res.*, 6, 63–70. <http://dx.doi:10.2147/JIR.S40673>

Veiga-Junior FV, 2008. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev Bras Farmacogn.* 2, 308-313. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200027>

8 CONCLUSÃO GERAL

- Com o novo método foi possível verificar a possibilidade de indução de FP sem necessidade de cirurgia para acesso da traqueia, seguido de instilação de bleomicina. Assim, diminui-se os riscos de morte em procedimento invasivo de difícil execução em menor tempo comparado as administrações intratraqueais cirúrgicas mais utilizadas.
- Valores médios expressivamente menores de células inflamatórias observados no grupo OEAz, são indícios sugestivos da ação protetora do óleo contra a agressão pulmonar induzida pela injeção intratraqueal da bleomicina.
- A área de interstício septal do grupo OEAz apresentou-se com lesões menos intensas pela provável diminuição do tecido fibroso, menor deposição de colágeno e maior equilíbrio na remodelação da matriz extracelular. Uma vez que a hidroxiprolina produzida no grupo OEAz foi igual ao grupo Sham nos três tempos de tratamento.
- Houve diminuição da citocina TGF- β_1 na fase aguda no grupo OEAz, menor deposição de colágeno (hidroxiprolina) na fase subaguda e menor grau de fibrose na fase crônica. Isso evidencia que o OEAz apresentou ação em todas as fases da inflamação.
- A partir desses resultados pode-se abrir novas perspectivas do OEAz como um alvo terapêutico em doenças pulmonares fibro-proliferativas.

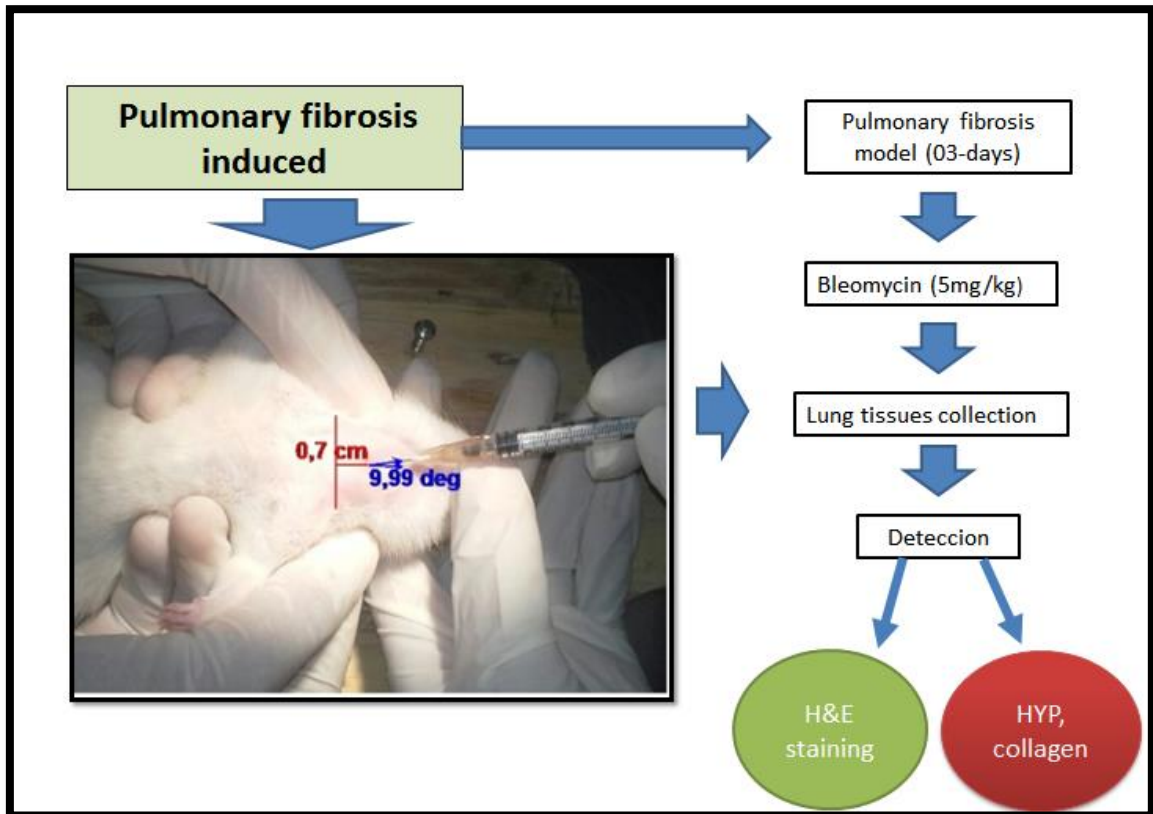
9 ANEXO I



10 ANEXO II

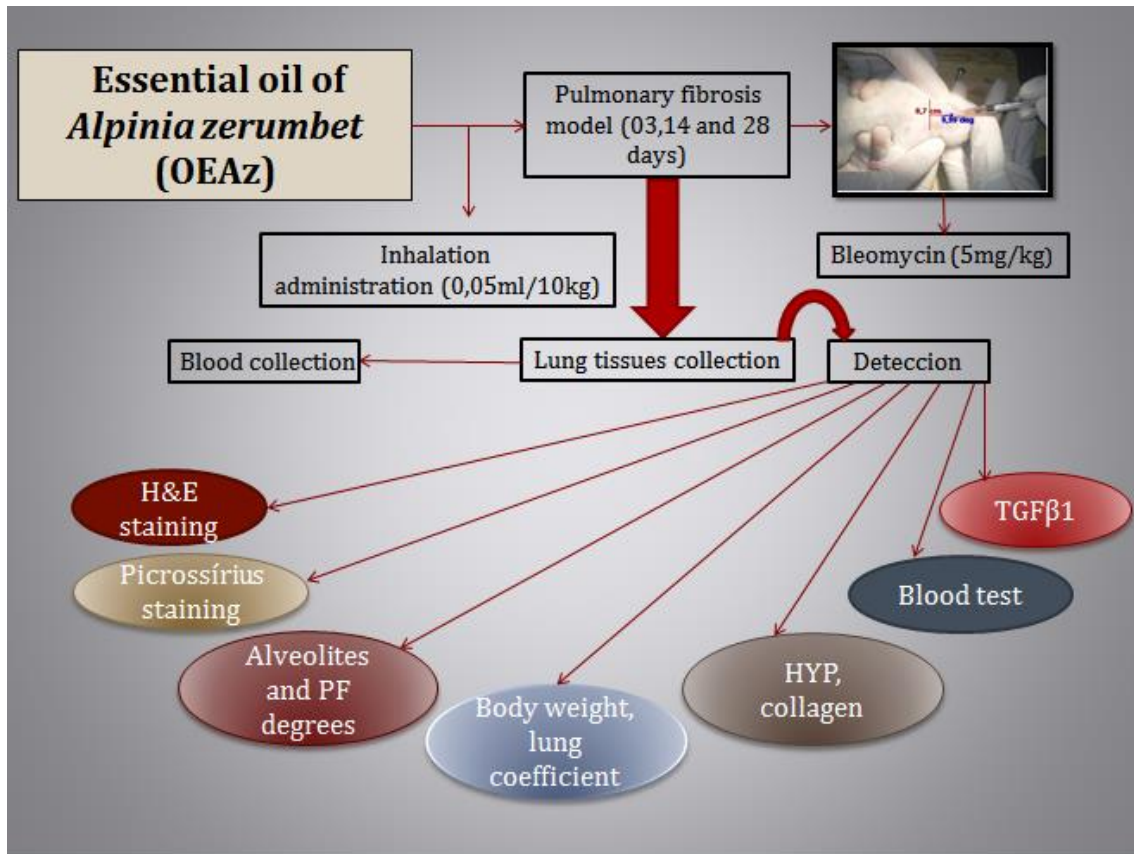
GRAPHICAL ABSTRACT –

“New method of pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice”.



GRAPHICAL ABSTRACT –

“Essential oil of *Alpinia zerumbet* partially reverts the bleomycin-induced pulmonary fibrosis in murine model”.



12 ANEXO IV

NORMAS DA REVISTA

PORTUGUESE JOURNAL OF PULMONOLOGY

Prepare your paper

YOUR MANUSCRIPT

Title

The title is the main advertisement for your article. A great title entices the audience to read on; a poorly-titled article may never reach its target readers.

Your article's title should reflect its content clearly, enabling readers to decide whether it's relevant for them. Make the title catchy and keep it specific. Leave out phrases such as 'a study of', 'investigations into', 'observations on'; and avoid using abbreviations and jargon.

Remember, too, that abstracting and indexing services depend on accurate titles; they extract keywords from them for cross-referencing.

Essentially, effective titles:

- identify the article's main issue
- begin with the article's subject matter
- are accurate, unambiguous, specific and (when possible) complete
- are as short as possible
- are enticing and interesting; they make people want to read further

Authors

Only authors who've made an intellectual contribution to the research should be credited; those who'll take responsibility for the data and conclusions, and who've approved the final manuscript. The order of credited names can vary between disciplines; the corresponding author may not always be the first author.

Keyword list

Most journals request a list of keywords; important words that, along with those in the title, capture the research effectively. Keywords are used by abstracting and indexing services; choosing the right ones can increase the chances of your article being found by other researchers. Many Elsevier journals also ask for a subject classification during the online submission process; this helps editors to select reviewers.

Abstract

The abstract is your chance to describe your research in 200 words – so use it wisely. Together, the title and abstract should be able to fully represent your article, including for use by indexing services. Many authors write the abstract last, so it reflects the content accurately.

The abstract should summarize the problem or objective of your research, and its method, results, and conclusions. Usually an abstract doesn't include references, figures or tables. It should mention each significant section of the article, with enough detail for readers to decide whether or not to read the whole paper. While it's great to make the abstract interesting, above all it should be accurate. Don't promise more than your article delivers.

The body of the text

Make the introduction brief. It should provide context and background, but not be a history lesson. It should state the problem being investigated, its contextual background, and the reasons for conducting the research. State the questions you're answering and explain any findings of others that you're challenging or furthering. Briefly and logically lead the reader to your hypotheses, research questions, and experimental design or method.

Method

(also called Materials and Methods or Experimental Methods)

This section should be detailed enough that readers can replicate your research, and assess whether the methods justify the conclusions. It's advisable to use the past tense – it's about what you did – and avoid using the first person, although this will vary from

journal to journal. Ultimately, you should explain how you studied the problem, identify the procedures you followed, and structure this information as logically as possible.

If your methods are new, you'll need to explain them in detail. If they've been published before, cite the original work, including your amendments if you've made modifications. Identify the equipment and the materials you used, specifying their source. State the frequency of observations and what types of data were recorded. Give precise measurements, stating their strengths and weaknesses when necessary. Name any statistical tests, so your quantitative results can be judged.

If your research involved human participants, animals, stem cells or other biohazard materials, you'll need to include certain information in the ethics statement, such as committee approvals and permission to publish. You should also explain your criteria for selecting participants.

Results

This section should present your findings objectively, explaining them largely in text. It's where you show how your results contribute to the body of scientific knowledge, so be clear and logical. And it's important not to interpret your results – that comes in the Discussion & Conclusions section.

You can base the sequence of this text on the tables, figures and graphs that best present your findings. Emphasize any significant findings clearly. Tables and figures must be numbered separately; figures should have a brief but complete description – a legend – that reveals how the data was produced.

Discussion & Conclusions

This is where you describe the meaning of your results, especially in the context of what was already known about the subject. You can present general and specific conclusions, but take care not to summarize your article – that's what the abstract is for.

You should link this section back to the introduction, referring to your questions or hypotheses, and cover how the results relate to your expectations and cited sources.

Do the results support or contradict existing theories? Are there any limitations? You can also suggest further experiments, uses and extensions.

Above all, the discussion should explain how your research has moved the body of scientific knowledge forward. Your conclusions must be supportable and not extend beyond your results, so avoid undue speculation and bold judgments about impact. This is also a good place to suggest practical applications for your results, and to outline what the next steps in your research will be.

To summarize, make sure that:

- your results directly support your conclusions
- you use specific expressions and quantitative descriptions – ‘12 degrees higher’ instead of ‘a higher temperature’
- you only discuss what you defined early in the paper – don’t introduce the reader to a whole new vocabulary. If you missed an important term, go back to the introduction and insert it
- all interpretations and speculations are based on fact, not imagination

Acknowledgments

Keep acknowledgements brief, naming those who helped with your research; contributors, or suppliers who provided free materials. You should also disclose any financial or other substantive conflict of interest that could be seen to influence your results or interpretations.

References

New research builds on previously published work, which should always be acknowledged. Any information that isn’t ‘common knowledge’, or generated by your experiments, must be recognized with a citation; and quoted text should be within quotation marks, and include a reference. The format of citations and references varies, so you should refer to the Guide for Authors for the journal you’re submitting to.

13 ANEXO V

NORMAS DA REVISTA

PHYTOMEDICINE

Types of manuscript

Original papers

Articles should not exceed 12-15 typewritten pages or up to 5,000 words, including references, tables and figures. Previously reported methods should be referenced only. The number of references should not exceed 30 (except for review articles or reports on microarray data).

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

A section of abbreviations should precede the manuscript. Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. See "Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals" (1991) *New England Journal of Medicine* 324:424–428.

Pagination and line numbers

Only manuscripts with page and line numbers will be reviewed.

Introduction

Provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. State the objectives of the work. No results of the study should be described in this section.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. This section should contain some subsections common for almost all studies: Plant names and parts used (requirements see above) Study medication, herbal extracts (requirements see above) Chemical compounds (requirements see above) Statistical analysis (requirements see above) Assays (requirements see above) Animal studies (requirements see above) Study design (requirements see above).

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by \exp . Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

References

Citation in text Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/phytomedicine> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the

same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication. Examples:

Reference to a journal publication:

Wagner., H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16, 97–110.

Reference to conference proceedings:

Argyropoulos D, Kudadam J, Müller J, 2009. Color degradation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) as affected by the drying process. In: 5th International Technical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management, Potsdam, Germany, August 31– September 2, pp. 730–736.

Willcox, M.L., Graz, B., Falquet, J., Diakite, C., Giani, S., Diallo, D., 2011. A "reverse pharmacology" approach for developing an anti-malarial phytomedicine. *Malaria J.* 10 (Suppl. 1), S8.

Reference to a book:

Cramer, J.A., Spilker, B., 1998. *Quality of Life and Pharmacoeconomics. An Introduction.* LippincottRaven, Philadelphia.

Reference to a chapter in an edited book:

Cragg, G.M., Boyd, M., 1996. Drug discovery and development at the National Cancer Institute: the role of natural products of plant origin. In: Balick, M.J., Elisabetsky, E., Laird, S.A. (Eds.), *Medicinal Plant Resources of the Tropical Forest.* Columbia University Press, New York, pp. 101–136.

Journal abbreviations source Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2),

etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data deposit and linking

Elsevier encourages and supports authors to share raw data sets underpinning their research publication where appropriate and enables interlinking of articles and data. Please visit <https://www.elsevier.com/about/research-data> for more information on depositing, sharing and using research data.

Ensure that the following items are present:

1. One author has been designated as the corresponding author with contact details: Full postal address E-mail address Tel / fax number
2. All necessary files have been uploaded separately Author Agreement Cover letter Manuscript Tables Figures Graphical Abstract (mandatory) Supplementary material (if needed)
3. Correct order within the manuscript: Title Page (Heading, Author names (the superscripts behind the names which indicates the Institutes/affiliation of the authors have to be a,b,c,... and * for the corresponding author in addition), Institutes/affiliation, Corresponding Author with full address, Word count) Abstract: has to be structured into Background, Hypothesis/Purpose, Study

Design, Methods, Results, Conclusion Keywords not more than 6 Abbreviations
Introduction Materials and methods Results and discussion Conclusion
Acknowledgments Conflict of interest (mandatory) References Table legends
Figure legends Page and line numbers throughout the manuscript

4. References about 30 (have to be numbered) References are in the correct format for this journal References in alphabetical order All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa Citation according to our journal style

5. Choose the correct section for your article

6. Further considerations Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked' Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet) Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required. For reproduction in black-and-white, please supply blackand-white versions of the figures for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.