

# ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Desmodium molliculum* EN EL MODELO MURINO DE ASMA

Bertha Acero-Carrión,<sup>1,2</sup> Emanuel Millones-Sánchez,<sup>1,2</sup>  
Daniel Iván Ticona-Rebagliati,<sup>1,3</sup> Laura Torres-Bravo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Estudiante de Medicina. Facultad de Medicina Humana "San Fernando", Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú

<sup>2</sup> Sociedad Científica San Fernando, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú

<sup>3</sup> Asociación para el Desarrollo de la Investigación Estudiantil en Ciencias de la Salud.

CIMEL 2012; 17(2): 62-67

## RESUMEN

**Objetivos:** Se investiga el efecto del extracto etanólico del *Desmodium molliculum* sobre el infiltrado leucocitario en tejido pulmonar y la medición de IgE sérica específica de alérgeno. Determinar el efecto de *Desmodium molliculum* en la inflamación alérgica. **Metodología:** Ratones hembra de la cepa BALB/c fueron inducidos mediante inyección intraperitoneal y nebulización con ovoalbúmina. El extracto liofilizado de *Desmodium molliculum* fue administrado por canulación orogástrica durante 7 días una semana después de la última nebulización. Se evaluaron los efectos del extracto sobre la inflamación leucocitaria en cortes de pulmón teñidos con Hematoxilina-eosina y los valores séricos de IgE. **Resultados:** Mediante la prueba de Tukey con  $p=0,05$  se obtuvieron valores de diferencia de medias respecto al blanco; para la dosis de 250mg/Kg fue -150,345 (significancia=0,001); para 500mg/Kg, -59,342 (0,019); y para 1000mg/Kg, -89,771 (0,001); la más efectiva fue 500mg/Kg. Se evaluó con la misma prueba diferencia de medias respecto a Dexametasona (2mg/Kg): para control negativo, -158,125 ( $p=0,001$ ); blanco, 66,95 (0,004); y 500mg/Kg, 7,607 (0,998). El infiltrado peribronquial fue similar para el control (+) y dosis de 250 y 500 mg/Kg; en el perivascular destacó la dosis de 500 mg/Kg. **Conclusión:** Según los valores de IgE e infiltrado peribronquial y perivascular en el pulmón, *Desmodium molliculum* tiene un efecto en la inflamación alérgica, efecto similar al obtenido con Dexametasona. **Palabras clave:** asma, *Desmodium molliculum*, dexametasona, Inmunoglobulina E.

## INFLAMMATORY ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT OF *Desmodium molliculum* IN A MURINE MODEL OF ASTHMA

### ABSTRACT

**Objectives:** We investigated the effect of ethanolic extract of *Desmodium molliculum* on leukocytes infiltration in the lungs and allergen-specific serum IgE. Determinate the effect of *Desmodium molliculum* on allergic inflammation. **Methodology:** Female BALB/c mice were induced by intraperitoneal injection and ovalbumin nebulization. Lyophilized extract of *Desmodium molliculum* was administrated by orogastric cannulation one week after the last nebulization, during 7 days. We evaluated the extract effect on leukocyte inflammation in lung sections stained with haematoxylin-eosin and serum IgE score. **Results:** With Tukey's test with a  $p=0.05$ , we got differences of means scores comparing white group: with 250mg/Kg dose, we got -150.345 (sig. = 0.001); with 500mg/kg dose, -59.342 (0.019) and with 1000mg/kg dose, -89.771 (0.001); the most effective dose was 500mg/kg. We evaluated with the same test the difference of means comparing dexamethasone group (2mg/kg): with negative control we got -158.125 (sig. =0.001), with white group, 66.95 (0.004) and with 500mg/Kg dose, 7.607 (0.998). Peribronchial infiltrate was similar with positive control and 250 and 500mg/kg doses; in perivascular infiltrate, 500 mg/Kg had less than the others. **Conclusion:** According to IgE scores, *Desmodium molliculum* has an effect on allergic inflammation; in addition, this effect is similar to Dexamethasone scores.

**Keywords:** asthma, *Desmodium molliculum*, dexamethasone, Immunoglobulin E.

## INTRODUCCIÓN

El asma se ha convertido en un problema de salud mundial por su alta morbilidad y los elevados valores de prevalencia que se presentan actualmente. Se estima que el asma afectó a 300 millones de personas de todo el mundo en el año 2010, asimismo, la prevalencia de pacientes con asma a nivel mundial aumenta en 50% cada década<sup>(1)</sup>.

De acuerdo al International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC), en el Perú, la prevalencia de personas con asma es tan alta como en los países desarrollados, pero

presenta una mayor severidad de la enfermedad.<sup>(2)</sup> Este trastorno inflamatorio de las vías aéreas se caracteriza por presencia de infiltrado leucocitario, broncoconstricción, aumento de reactividad de las vías aéreas y secreción de moco<sup>(3)</sup>.

La patogenia del asma alérgica incluye el proceso de sensibilización sistémica, la cual consiste en la captación y procesamiento del alérgeno por las células presentadoras del antígeno (CPA) a las células TCD4+, las que se activan y diferencian a un tipo especial de células T cooperadoras: Th2 (polarización)<sup>(4)</sup>. Esta activación a Th2 promueve la maduración y el reclutamiento de eosinófilos en la vía respiratoria, así como la

generación de IgE por las células B mediante la secreción de interleucinas (IL) tipo 4, 5 y 13. Las IgE se anclan en la membrana de los mastocitos que liberan mediadores inflamatorios luego de reacción cruzada con el alérgeno <sup>(1)</sup>.

Los tratamientos actuales no resuelven la enfermedad y se centran en contrarrestar los episodios de broncoespasmo y controlar la inflamación subyacente en el proceso crónico, con la finalidad de reducir la morbilidad asociada a la enfermedad <sup>(5)</sup>.

En ese sentido, *Desmodium molliculum* (manayupa), planta oriunda del Perú y de crecimiento en la región andina, es conocida por sus propiedades antiinflamatorias, antisépticas y curadora de heridas <sup>(6)</sup>. Presenta, entre sus compuestos, saponinas, las cuales han demostrado tener propiedades inmunomoduladoras a nivel de las células T cooperadoras, promoviendo una respuesta inmune dominante a Th1 y suprimiendo las reacciones inmunes mediadas por IgE <sup>(7)</sup>; además presenta flavonoides, los que reducen la secreción de histamina e inhiben la síntesis de leucotrienos. Los flavonoides también influirían en la expresión de citocinas tipo Th2 (interleuquinas 4, 5 y 13) <sup>(8,9)</sup>.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto antiinflamatorio comparativo del extracto etanólico liofilizado de *D. molliculum* tres diferentes dosis en el modelo murino del asma caracterizado por infiltrado leucocitario en tejido pulmonar y la medición de IgE sérica, frente a la dexametasona.

## MATERIALES Y METODOS

### Materiales

Se desarrolló un estudio de tipo experimental incompleto con ensayos controlados en los que se utilizaron 65 ratones hembra de la cepa Balb/c 53 de entre 6 a 8 semanas de edad y peso de 25±2 g mantenidas a una temperatura ambiental regulada entre 22° a 24 °C, la humedad relativa entre el 60% y 70% y un ciclo de 12h luz /12h oscuridad; fueron alimentados con 10gr de ración (UNALM) por cada ratón; fueron aclimatados por una semana a las condiciones mencionadas. Se utilizó el extracto etanólico liofilizado de *D. molliculum* (manayupa) para el tratamiento, con el que se garantizaba un daño mínimo a los principios activos que se buscaban conservar.

### Inducción de asma

De entre los numerosos antígenos utilizados en la inducción de asma en ratones, el más común ha sido la Ovoalbúmina

(OVA) al ser este un potente antígeno natural que causa respuestas inflamatorias inmunitarias, predominantemente rica en linfocitos Th2 que son los principales desencadenantes de las reacciones de hipersensibilidad tipo I. Se utilizó el protocolo básico de inducción de asma <sup>(10)</sup> que consiste en dos fases que son:

### Fase de sensibilización sistémica:

Se realizó mediante dos inyecciones por vía intraperitoneal de una solución que contenía OVA, disuelta en buffer fosfato de potasio (50 mM) a pH 7, al 40% (400 mg en 1ml) mezclada con una solución del coadyuvante hidróxido de aluminio (Al(OH)<sub>3</sub>) al 4% (40 mg/ml de agua destilada, de igual cantidad que el buffer). Se aplicó 0,1 mL de esta solución a cada ratón de tal manera que a cada uno le correspondía 20mg de OVA y 2mg de Al(OH)<sub>3</sub>. Las inyecciones se aplicaron los días 1 y 14 del proceso de inducción.

### Fase de activación a nivel de las vías aéreas:

Los ratones fueron expuestos durante 20 minutos a una solución de OVA con suero fisiológico al 1 % (10 mg de OVA en 1 mL de suero), los días 28, 29 y 30 según el protocolo de inducción.

### Tratamiento

Los ratones fueron divididos en grupos experimentales numerados para la administración del tratamiento del extracto de *D. Mollicum*; o Dexametasona, o Suero Fisiológico Grupo N° 1, administración de 250mg/Kg; Grupo N° 2, administración de 500mg/Kg y Grupo N° 3, administración de 1000mg/Kg; Grupo N° 4 control positivo se le administró Dexametasona a dosis de 2mg/kg y Grupo N° 5 control negativo se le suministró 3 ml de suero fisiológico. Grupo N° 6 blanco no se le indujo la enfermedad y por lo tanto no requería de ningún tipo de tratamiento. A todos los grupos se les administraron los tratamientos diariamente mediante canula orogástrica Grupo N°1, 2 y 3 a las 18:30 horas durante 7 días; las cantidades administradas fueron proporcionales a los pesos (100mg/ml de extracto) con excepción del grupo control negativo al que se le administró invariablemente 0,3 ml de suero fisiológico.

### Sacrificio

Se utilizó la técnica de dislocación cervical <sup>(11-13)</sup> al día siguiente del último día de tratamiento. Se procedió a la apertura de la caja torácica, extracción de costillas con la tijera para presentar el corazón y el seno venoso libres, se procedió a la extracción de sangre con los dos tubos capilares (25 µl). Para la extracción del pulmón inicialmente se separó la tráquea de

las demás estructuras (esófago, arterias, venas, timo, glándula tiroides, etc.) y luego se las extrajo de su lugar anatómico, realizando un corte a nivel medio de la tráquea para extraer completamente el pulmón e inmediatamente después se los enjuagó con suero fisiológico.

### Análisis bioquímico

A partir de la sangre extraída (25 µl) se midió la IgE específica para alérgeno (s IgE) mediante la técnica de quimioluminometría directa; se realizó un inmuno ensayo, del tipo sándwich, de captura de IgE con anticuerpos monoclonales de ratón anti-IgE humana fijada con alérgenos; estos están unidos a un compuesto nitilado que hace posible la unión con una molécula luminiscente para su posterior análisis e interpretación. Se compararon todos los grupos tomando como basal el grupo blanco.

### Análisis histopatológico

Se sumergió a los pulmones en formol al 10 % por un periodo aproximado de 24 h para fijar las estructuras; posteriormente se procedió a ubicar el nacimiento de los bronquios tras la bifurcación de la tráquea, luego se realizó un corte a nivel de la inserción del bronquio en el parénquima pulmonar izquierdo y otro corte longitudinal desde la zona apical hasta la basal; la parte que contenía el nacimiento del bronquio fue colocada en casetes para su inclusión en parafina.

La inclusión en parafina se realizó en un procesador automático a 56°C; este molde se cortó con un micrótopo a 2µm de espesor, colocándose dos cortes consecutivos por lámina. Se les extrajo la parafina usando xilol y se rehidrató con alcoholes de 96° y 100° para luego aplicar la tinción de hematoxilina y posterior eosina.

Los cortes histológicos se observaron en microscopios marca Zeiss® y se seleccionaron las áreas donde se encontraban bronquiolos y vasos sanguíneos y se observó el infiltrado linfocitario alrededor de cada uno de ellos; se sacó el promedio de la infiltración en los bronquiolos y vasos sanguíneos encontrados, dichos valores fueron categorizados mediante la escala de Enander et al (Tabla 1) <sup>(14-15)</sup>.

### Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se utilizó el paquete de análisis estadísticos PASW (antes SPSS) versión 18.0 para Windows y Microsoft Office Excel 2007; los valores obtenidos tras la medición de las variables fueron sistemáticamente ordenados, clasificados y codificados según la prueba de SHAPIRO-WILK (muestra menor de 50) para analizar si la

**Tabla 1. Escala de medición de infiltrado linfocitario (Enander et al, 1983)**

Sección	Niveles			
	0	1	2	3
Alrededor de bronquiolos	Ninguna célula alrededor.	Menos de 10 capas de células alrededor del bronquiolo.	Más de 10 capas de células alrededor del bronquiolo.	Anillo de más de 10 capas de células rodeando el bronquiolo.
Alrededor de vasos sanguíneos	Ninguna célula alrededor.	Menos de 3 capas de células alrededor del vaso.	De 4 a 10 capas de células alrededor del vaso.	Más de 10 capas de células alrededor del vaso.

variable IgE sérico presenta una distribución normal. Posteriormente se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) para la comparación de las medias de los valores entre los grupos y determinar si hay o no diferencia significativa entre estos. Seguidamente, se realizaron las pruebas post hoc de Tukey y Scheffé para la comparación de medias dos a dos entre grupos y finalmente determinar si hay o no diferencia significativa.

## RESULTADOS

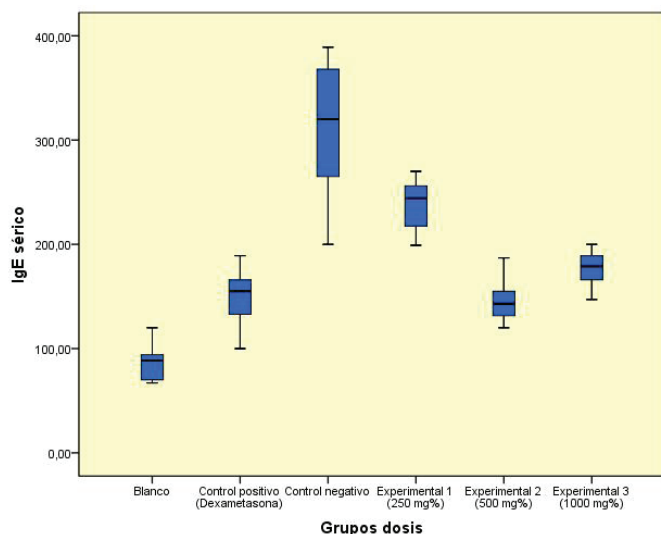
### Medición sérica de IgE

Tras comprobar la normalidad de los valores de IgE (prueba de normalidad de Shapiro-Wilk) y aplicar la prueba análisis de varianza (ANOVA, sig: 8,56 x 10<sup>-15</sup>), mediante la prueba post hoc de Tukey para un nivel de significancia de 0.05 se obtuvieron los valores de diferencia de medias mostrada en la tabla 2. La dosis en la que se aprecia mayor disminución de los valores séricos de IgE fue la de 500mg/Kg. En el Gráfico 1 se aprecian las distribuciones de cada uno de los grupos, asimismo las relaciones que existen entre ellos.

**Tabla 2. Diferencia de medias de valores de IgE según grupo de dosis.**

Grupo dosis		Diferencia de medias	p
<b>Grupo blanco</b>	Control positivo	-62.06	0.01
	Control negativo	-225.08	0.00
	Experimental1	-150.34	0.00
	Experimental2	-59.34	0.02
	Experimental3	-89.77	0.00
<b>Control positivo</b>	Control negativo	-163.02	0.00
	Experimental1	-88.29	0.00
	Experimental2	2.71	1.00
	Experimental3	-27.71	0.69

**Gráfico N°1. Distribución de los valores de Ig E según grupos de dosis.**



### Análisis histopatológico

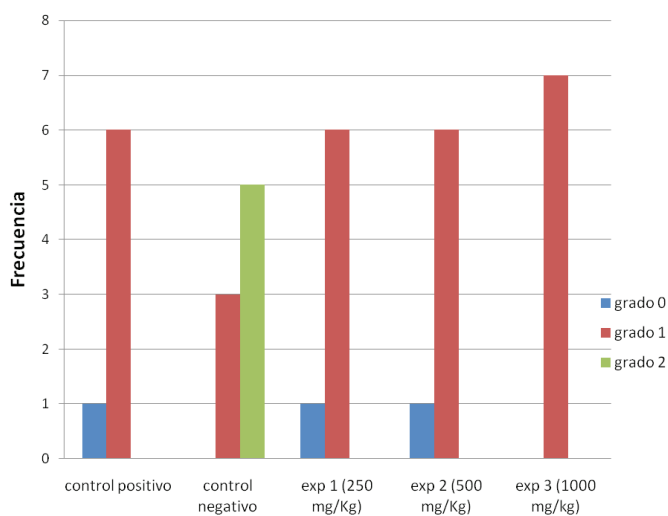
En el Gráfico 2 se presentan las frecuencias del grado de infiltración peribronquiolar encontradas en los grupos dosis; se observa mayor incidencia de grado 2 en el grupo control negativo, asimismo se encuentran incidencias semejantes de grado 0 y 1 en los grupos control positivo, experimental 1 y experimental 2. En el Gráfico 3, se presentan las frecuencias de infiltración perivascular; la incidencia de grado 2 en el control negativo es notoria; la frecuencia de grados 0 y 1 es similar en los grupos control positivo y experimental 2. Se observa presencia de un solo caso de tercer grado en el grupo experimental 3.

En total ocurrieron 15 muertes durante el proceso de inducción, 14 de ellas ocurrieron minutos después de la aplicación intraperitoneal de OVA y una de ellas al día siguiente del fin de la nebulización. En los cortes histológicos de hígado se encontró necrosis y congestión hepáticas, mientras que en el pulmón se encontró elevada infiltración linfocitaria alrededor de vasos y bronquios, a la vez de una marcada congestión, hemorragia y necrosis de algunas paredes alveolares.

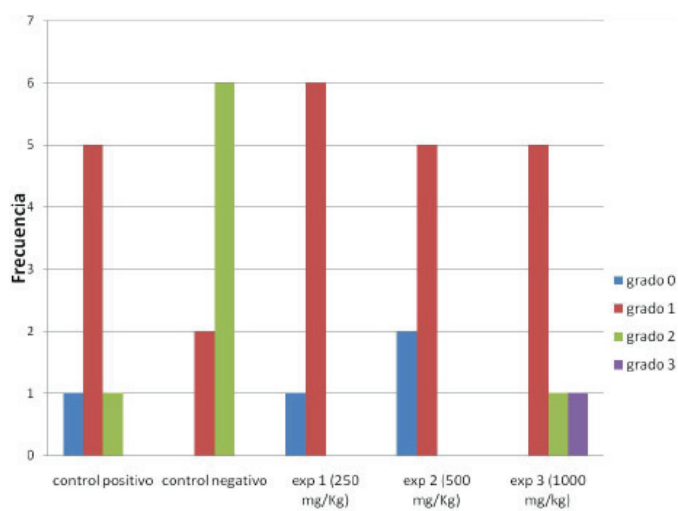
### DISCUSIÓN

En el presente trabajo se encontró que la dosis de 500mg/Kg de *Desmodium molliculum* logra una mayor disminución de los valores séricos de Ig E incluso mayor que la de la Dexametasona. Este resultado es muy importante ya que es ampliamente conocido que IgE es un mediador fundamental en la fisiopatología del asma<sup>(16)</sup>. El número de células que expresan receptores de IgE es grande e incluye células estructurales

**Gráfico N°2. Frecuencia de infiltrado inflamatorio peribronquiolar según grupos dosis.**

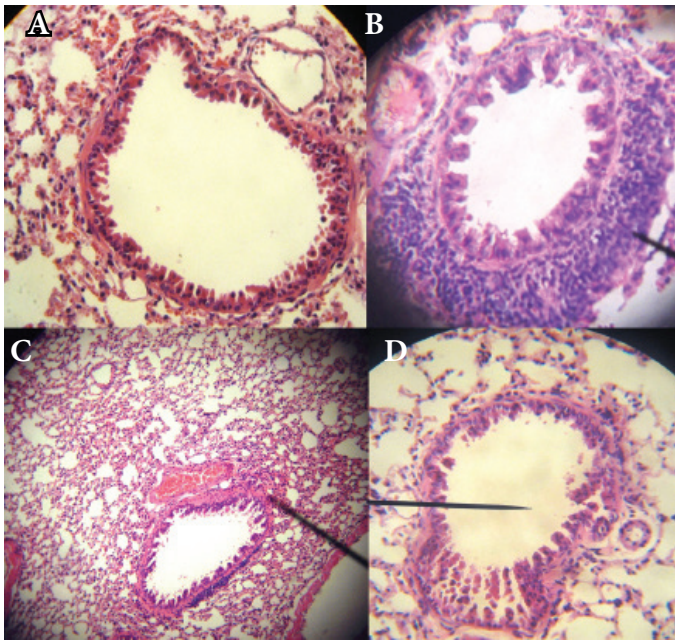


**Gráfico N°3. Frecuencia de infiltrado inflamatorio perivascular según grupos dosis.**



en las vías respiratorias, tales como células epiteliales y células musculares lisas además los mastocitos y los basófilos son consideradas células efectoras de la IgE y la activación de estas células por alérgenos conduce a la secreción de mediadores inflamatorios<sup>(17)</sup>. Así, los efectos biológicos de IgE son diversos y de gran alcance, y la disminución de sus niveles pueden inhibir múltiples mecanismos alérgicos y tener múltiples efectos anti-inflamatorios en el proceso asmático<sup>(18)</sup>.

De acuerdo a la escala histopatológica usada, se encontró valores de 0 en la categoría de infiltrado peribronquiolar en los grupos control positivo, dosis 250mg/kg y dosis 500mg/kg, lo que no se correlacionaba con lo encontrado respecto a los valores de IgE, los que fueron menores en el grupo dosis 1000mg/kg respecto al grupo dosis 250mg/kg. A nivel del infiltrado perivascular, se encontró valores de 0 según nuestra

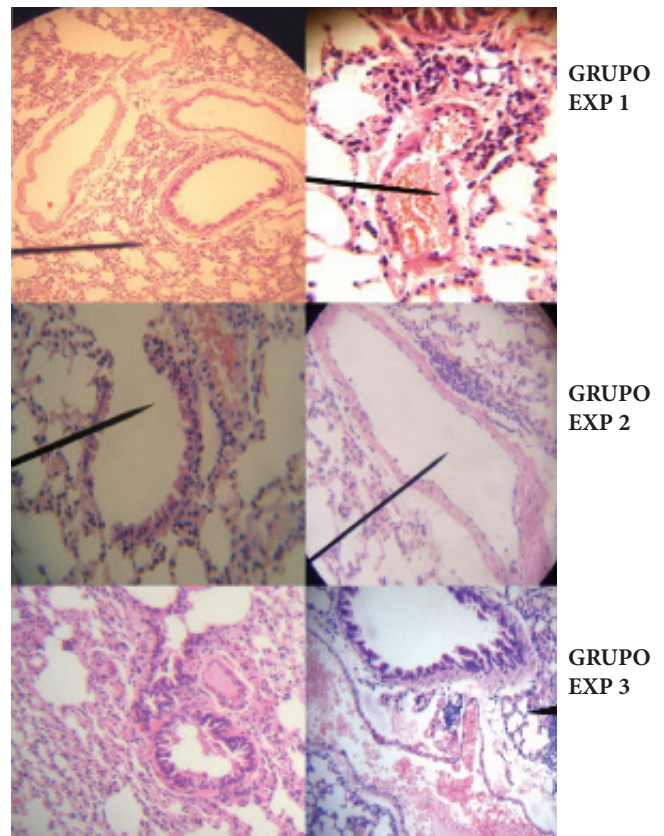


**Figura 1.**  
 A) Ratón del grupo blanco (sin injuria).  
 B) Ratón del control negativo (inducido con asma) la flecha señala infiltrado intersticial de grado 2 con predominio de linfocitos.  
 C) Ratón del grupo control positivo (tratado con dexametasona) se observa un infiltrado intersticial de tipo 1. D) Ratón del grupo experimental 3, se observa la hiperreactividad bronquial.

escala en los grupos control positivo, grupo dosis 250mg/kg y dosis 500mg/kg, lo que manifiesta la misma incongruencia que lo encontrado a nivel de infiltrado peribronquial.

Los flavonoides, presentes en *D. Molliculum*, son compuestos polifenoles de bajo peso molecular que han probado tener efectos contra la inflamación del árbol bronquial, disminuyen la respuesta de mastocitos, reducen en número de eosinófilos, factor de transcripción NFκB, inhibición de linfocitos Th2 y la concentración de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-8<sup>(19-20)</sup>; incluso algunos flavonoides presentes en diversos vegetales, como la quercetina tras ser probados contra Dexametasona demostraron mayor efectividad en la reducción de dichas interleuquinas<sup>(20)</sup>. Además una dieta rica en compuestos vegetales, que contiene flavonoides, es protectora contra el desarrollo de los síntomas de asma y otro diverso grupo de enfermedades crónicas tales como cáncer, diabetes mellitus tipo 2, entre otras<sup>(19,21)</sup>.

Los patrones histológicos encontrados en los órganos de los ratones fallecidos luego de la inducción nos indican anafilaxia en el hígado e infarto hemorrágico disperso en pulmón. Estos hallazgos pueden haber sido causados por la reinyección del alérgeno OVA tras una primera inyección en la que ya se podría haber formado una población de linfocitos memoria que con la reinyección de alérgeno desencadenarían una reacción



**Figura 2. Grupos experimentales.**

**Grupo experimental 1.** Se observa en infiltración intersticial de grado 0, e infiltración perivascular de grado 0. (Izquierda) Infiltrado perivascular de grado 1, congestivo y hemorrágico. (derecha)

**Grupo experimental 2.** Izquierda: Grado leve de lesión intersticial inflamatoria, focos leves de congestión con grado de infiltración 1. Derecha: grado 1 de infiltración perivascular.

**Grupo experimental 3.** Izquierda: Grado de lesión intersticial inflamatoria de grado 1. Derecha: Grado de lesión intersticial inflamatoria de grado 3

alérgica magnificada al ser una fase sistémica<sup>(10)</sup>. Se podría descartar como causa la dosis elevada de alérgeno ya que la dosis inyectada era la misma en ambos casos y la preparación de estas fue realizada por la misma persona y en las mismas instalaciones.

Podemos concluir en el presente estudio, que en un modelo murino de asma, según los valores de IgE e infiltrado peribronquial y perivascular en el pulmón y el extracto etanólico de *Desmodium molliculum* tiene un efecto en la inflamación alérgica, efecto similar al obtenido con Dexametasona. Asimismo, se hacen necesarios mayores estudios para determinar qué componente de dicho extracto es el responsable de dicha actividad antiinflamatoria.

**Correspondencia:**

Emanuel Millones-Sánchez

E-mail: ejmillones@gmail.com

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramos-Barbón D. Asma. *Arch Bronconeumol*. 2007;43:3-14.
2. Lezana V, Arancibia JC. Consideraciones epidemiológicas del asma en Latinoamérica. *Neumol Pediatr*. 2006;1(2):45-8.
3. Fraga-Iriso R, Núñez-Naveira L, Brienza NS, Centeno-Cortés A, López-Peláez E, Vereá H, et al. Desarrollo de un modelo murino de inflamación y remodelación de vías respiratorias en asma experimental. *Arch Bronconeumol*. 2009;45(9):422-8.
4. Martínez-Ramírez I, Aviles-Salas A, Nava-Reyes H, Ramos-Godínez MdP, Carvajal-Sandoval G, Zamudio-Cortés P, et al. Alteración de la actividad inflamatoria regulada por T H1-T H2 en asma. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2006;19(2):136-42.
5. De Mora F, Torres R, Picado C. Descubriendo el asma de origen alérgico a través del ratón. Un repaso a la patogenia de los modelos de asma alérgica en el ratón y su similitud con el asma alérgica humana. *Arch Bronconeumol*. 2005;41(3):141-52.
6. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2003;88(2):199-204.
7. Katayama S, Mine Y. Quillaja saponin can modulate ovalbumin-induced IgE allergic responses through regulation of Th1/Th2 balance in a murine model. *J Agric Food Chem*. 2006;54(9):3271-6.
8. Tanaka T, Higa S, Hirano T, Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, et al. Flavonoids as potential anti-allergic substances. *Cur Med Chem-Anti-inflammatory & anti-allergy agents*. 2003;2(1):57-65.
9. Pelaia G, Gallelli L, Vatrella A, Grembale R, Maselli R, De Sarro G, et al. Potential role of potassium channel openers in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Life Sci*. 2002;70(9):977-90.
10. Porsolt RD. *Animal Models of Disease*. *Curr Protoc Pharmacol*. 2005;5.0.1-5.0.2.
11. Concepción Alfonso ÁR, De La Peña Pino R, García Capote J. Acercamiento al accionar ético-moral del científico que trabaja con animales de experimentación. *Acta bioeth*. 2007;13(1):9-15.
12. Close MB, Banister K, Baumans V, Bernoth E-M, Bromage N, Bunyan J, et al. Recomendaciones para la Eutanasia de los Animales de Experimentación: Parte 2.
13. Institute of Laboratory Animal Resources. *Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio: edición mexicana: National Academies Press; 1999.*
14. Enander I, Ahlstedt S, Nygren H, Björkstén B. Sensitizing ability of derivatives of picryl chloride after exposure of mice on the skin and in the lung. *Int Arch Allergy Immunol*. 1983;72(1):59-66.
15. Garssen J, Nijkamp F, Wagenaar SS, Zwart A, Askenase P, Van Loveren H. Regulation of delayed-type hypersensitivity-like responses in the mouse lung, determined with histological procedures: serotonin, T-cell suppressor-inducer factor and high antigen dose tolerance regulate the magnitude of T-cell dependent inflammatory reactions. *Immunology*. 1989;68(1):51.
16. Platts-Mills TA. The role of immunoglobulin E in allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(supplement\_1):S1-S5.
17. Gounni AS, Wellemans V, Yang J, Bellesort F, Kassiri K, Gangloff S, et al. Human airway smooth muscle cells express the high affinity receptor for IgE (FcεRI): a critical role of FcεRI in human airway smooth muscle cell function. *J Immunol*. 2005;175(4):2613-21.
18. Fahy JV. Anti-IgE: lessons learned from effects on airway inflammation and asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(6):1230-2.
19. Tanaka T, Takahashi R. Flavonoids and asthma. *Nutrients*. 2013;5(6):2128-43.
20. Pałgan K, Bartuzi Z. The role of flavonoids in asthma. *Post Dermatol Alergol*. 2011;28:396-401.
21. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(3):560-8.