



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CAMPUS MACAÉ  
CURSO DE FARMÁCIA



Atividade inibitória dos extratos das espécies vegetais *Tocoyena bullata* e *Vernonia crotonoides* coletadas na Restinga de Jurubatiba (Macaé), sobre a desgranulação de mastócitos *ex vivo* e a linfoproliferação *in vitro*.

YORHANA DE AZEVEDO SILVA

Macaé  
Julho de 2015

YORHANA DE AZEVEDO SILVA

Atividade inibitória dos extratos das espécies vegetais *Tocoyena bullata* e *Vernonia crotonoides* coletadas na Restinga de Jurubatiba (Macaé), sobre a desgranulação de mastócitos *ex vivo* e a linfoproliferação *in vitro*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elaine dos Anjos da Cruz

Macaé  
Julho de 2015

“Tente mover o mundo - o primeiro passo  
será mover a si mesmo.”

(Platão)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por sua vontade sempre se cumprir em minha vida;

Às minhas avós Concy e Oneyde pelo exemplo de determinação e sabedoria que foram;

Aos meus pais Ezequias e Geilza, por todo carinho, amor, compreensão e pelas palavras de estímulo que fizeram com que eu me tornasse quem sou. Por terem fornecido condições para que eu cumprisse mais esta meta em minha vida;

Aos meus irmãos Fernanda, Gustavo e Mariana pelo companheirismo e incentivo em todos os momentos durante minha graduação;

A Prof. Dr<sup>a</sup> Elaine dos Anjos da Cruz pela orientação, pois repartiu seu conhecimento com dedicação, paciência e amizade. Minha gratidão porque me ensinou a arte de construir um hoje comprometido com um amanhã;

Aos mestres meus agradecimentos pela vontade e didática. Obrigada por fazer desta, uma proveitosa experiência;

Aos meus amigos de graduação, que pelo convívio harmonioso, horas de estudo e momentos de descontração, tornaram meus dias mais felizes durante esta jornada;

Aos meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPBio);

A FAPERJ pelo apoio financeiro que colaborou para execução deste trabalho;

Ao Laboratório de Produtos Naturais (LAPRON) por ceder as preparações dos extratos para utilização neste estudo.

## RESUMO

A alergia pode ser definida como uma resposta exacerbada do sistema imunológico aos alérgenos, que resulta da resposta das células T auxiliares tipo 2. Esta reação é chamada de hipersensibilidade imediata envolvendo anticorpos do tipo IgE, os quais se ligam ao seu receptor de alta afinidade (FcεRI) presente na superfície do mastócito. A ativação de FcεRI nos mastócitos, resulta na liberação de mediadores inflamatórios e na reação alérgica. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito dos extratos das espécies vegetais *Tocoyena bullata* (TB) e *Vernonia crotonoides* (VC) da Restinga de Jurubatiba sobre a desgranulação de mastócitos *ex vivo* e a linfoproliferação *in vitro*. Primeiramente, a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de liberação da enzima lactato desidrogenase por macrófagos peritoneais, *in vitro*, após tratamento com os extratos. Os extratos brutos não apresentaram toxicidade nas concentrações de 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL, em comparação com a liberação máxima de LDH (Triton 10%). Membranas do mesentério de ratos Wistar foram sensibilizadas com IgE anti-DNP (0,001 mg/mL) e tratadas com os extratos de TB (caule, flor e folha) e VC nas concentrações de 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL. A desgranulação foi induzida pela adição do antígeno DNP (0,0001 mg/mL) e a contagem de mastócitos desgranulados ou intactos foi feita após coloração com Azul de Toluidina e visualização em microscópio ótico. Observou-se que apenas os tratamentos com TB inibiram significativamente a desgranulação dos mastócitos, sendo o controle positivo = 87,2±1,0% e 93,1 ±1,4% de mastócitos desgranulados, TBcaule = 6,5±0,7; 8,8±1,6 e 9±1,4, TBflor = 4,5±0,7; 7,5±0,7 e 9,5±0,7, TB folha = 6 ± 2,8%; 9±1,4%; 21±1,4% para as concentrações de 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL respectivamente. Para avaliar o efeito dos extratos sobre a inibição da proliferação de linfócitos, células de linfonodos inguinais de camundongos suíços (4x10<sup>5</sup> células/poço) foram estimuladas com concanavalina A (2,5µg/mL) e tratadas com os extratos de TB e VC nas concentrações de 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL. A linfoproliferação foi medida pela técnica de MTT. Os extratos de TB (caule, flor e folha) apresentaram valores de 62,7±16,5 e 141,6±5,5; 73,3±22 e 57,7±18,8; 79,4±5,5 e 148,8±22, nas concentrações de 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL respectivamente. Já a espécie VC apresentou 101,1±6,2 e 156,1±5,5 para as concentrações de 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL respectivamente. Ambas as espécies demonstraram efeitos significativos sobre a inibição da linfoproliferação, em relação ao grupo controle positivo (40,5±14,9). Os resultados obtidos são promissores e podem contribuir para o direcionamento de testes futuros com as espécies estudadas em modelos experimentais de respostas alérgicas.

**Palavras-chave:** Alergia, hipersensibilidade imediata, desgranulação, mastócitos, linfoproliferação, *Tocoyena bullata*, *Vernonia crotonoides*, Restinga de Jurubatiba.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Sequência de eventos nas reações de hipersensibilidade imediata.....	11
<b>Figura 2</b> - Efeitos biológicos dos mediadores de hipersensibilidade imediata.....	14
<b>Figura 3</b> - Espécies vegetais estudadas.....	18
<b>Figura 4</b> - Imagens da Restinga de Jurubatiba.....	19
<b>Figura 5</b> - Esquema representativo do ensaio de avaliação da citotoxicidade dos extratos através da dosagem de LDH <i>in vitro</i> .....	22
<b>Figura 6</b> - Esquema representativo do ensaio de desgranulação dos mastócitos.....	23
<b>Figura 7</b> - Esquema representativo do ensaio de avaliação da inibição da proliferação de linfócitos.....	24

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Teste de citotoxicidade dos extratos brutos.....	25
<b>Gráfico 2</b> - Curva concentração dependente do extrato bruto de <i>Tocoyena bullata</i> folha.....	27
<b>Gráfico 3</b> - Curva concentração dependente do extrato bruto de <i>Tocoyena bullata</i> caule.....	28
<b>Gráfico 4</b> - Curva concentração dependente do extrato bruto de <i>Tocoyena bullata</i> flor.....	29
<b>Gráfico 5</b> - Curva concentração dependente do extrato bruto de <i>Vernonia crotonoides</i> .....	30
<b>Gráfico 6</b> - Teste de proliferação de linfócitos.....	32

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ANOVA** - Análise de variância

**CD4+** - *Cluster of differentiation 4*

**Con A** - Concavalina A

**DMEM** - Meio Eagle Modificado por Dulbecco

**DMSO** - Dimetilsufóxido

**DNP** - 2,4 Dinitrofenol

**D.O.** - Densidade Ótica

**FMS** - Fenasina Metosulfato

**FcεRI** - Receptor de alta afinidade para IgE

**IgE** - Imunoglobulina E

**IL** - Interleucina

**LDH** - Lactato desidrogenase

**MTT** - 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazol

**NAD** - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

**(NF)-κB** - Fator nuclear capa B

**PBS** - Tampão fosfato-salino

**PNRJ** - Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba

**PGD2** - prostaglandina D2

**QE** - Quercetina

**SFB** - Soro Fetal Bovino

**TB** - *Tocoyena bullata*

**TH**- Célula T auxiliar (*T helper*)

**TNF-α** - Fator de necrose tumoral α

**Treg** - Células T reguladoras



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Reações de hipersensibilidade imediata.....	10
1.2. Mastócito: célula efetora da alergia.....	12
1.3. Alguns tipos de reações alérgicas.....	14
1.4. Tratamentos convencionais das alergias.....	15
1.5. Busca por novas alternativas terapêuticas.....	16
1.6. Espécies vegetais estudadas.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. Objetivos gerais.....	19
4. Objetivos específicos.....	19
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
5.1. Animais.....	20
5.2. Preparação do extrato bruto das plantas.....	20
5.3. Ensaio <i>in vitro</i> .....	21
5.3.1 Ensaio da citotoxicidade dos extratos através da dosagem de LDH <i>in vitro</i> .....	21
5.3.2 Ensaio de desgranulação de mastócitos <i>ex vivo</i> .....	22
5.3.3 Ensaio de proliferação de linfócitos <i>in vitro</i> .....	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
6.1. Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto de <i>Tocoyena bullata</i> (caule, folha e flor) e <i>Vernonia crotonoides</i> .....	25
6.2. Teste de desgranulação de mastócitos.....	26
6.2.1. Avaliação do extrato bruto das folhas de <i>Tocoyena bullata</i> .....	26
6.2.2. Avaliação do extrato bruto do caule de <i>Tocoyena bullata</i> .....	27
6.2.3. Avaliação do extrato bruto das flores de <i>Tocoyena bullata</i> .....	28
6.2.4. Avaliação da atividade do extrato bruto das folhas de <i>Vernonia crotonoides</i> sobre a inibição da desgranulação nos mastócitos.....	30
6.3. Avaliação da proliferação de linfócitos.....	31
7. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças alérgicas têm um impacto clínico notável, sua prevalência tem aumentado significativamente nas últimas décadas e tem afetado parte considerável da população em países industrializados. A alergia pode ser definida como uma resposta exacerbada do sistema imunológico a antígenos ambientais conhecidos como alérgenos (URRA *et al.*, 2014), sendo desencadeada após a interação entre um hospedeiro susceptível e um ambiente permissivo, ambos contribuindo para o desenvolvimento da doença (WU E ZARRIN, 2014). A doença alérgica resulta da resposta das células T auxiliares 2 (do inglês “*T helper 2*”, TH2) aos alérgenos (URRA, *et al.*, 2014).

Os linfócitos T virgens (ou *naïves*) migram para os órgãos linfóides secundários onde podem encontrar antígenos apresentados por células dendríticas maduras ligados às moléculas MHC classes I e II, desta forma, ativados. As respostas das células T a antígenos e co-estimuladores englobam a síntese de citocinas e moléculas efectoras, proliferação celular, diferenciação em células efectoras e desempenho de funções efectoras (ABBAS *et al.*, 2008).

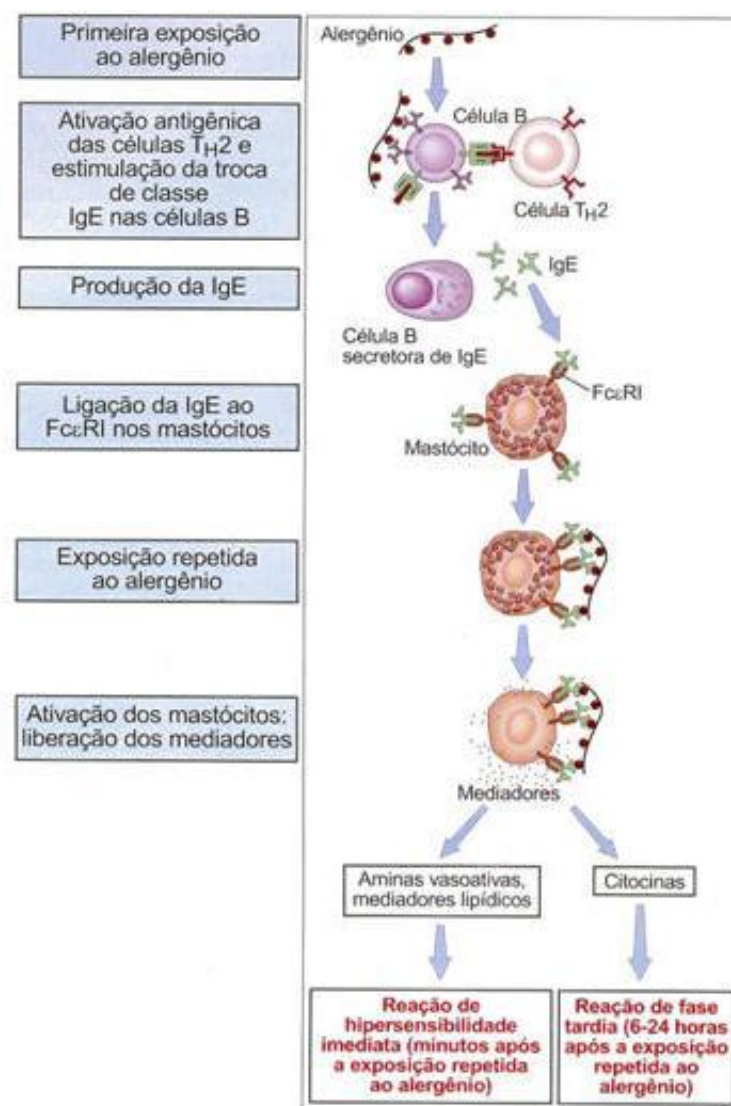
A função fisiológica do sistema imunológico é a defesa contra microrganismos infecciosos. Os mecanismos que comumente protegem os indivíduos das infecções e eliminam substâncias estranhas, são por si só, capazes de gerar dano tecidual e doença em algumas situações (ABBAS *et al.*, 2008).

A fisiopatologia das doenças alérgicas é complexa, pois é influenciada por diversos fatores, incluindo a suscetibilidade genética, a dose de alérgeno e tempo de exposição aos mesmos (AKDIS, 2014).

### 1.1 Reações de hipersensibilidade imediata

A reação de hipersensibilidade imediata conforme ilustrada na figura 1 consiste em uma sequência de eventos que ocorrem quando um indivíduo entra em contato com o antígeno (alérgeno) e, desta forma, tem-se a ativação de células TH2 e linfócitos B específicos para o antígeno. Os alérgenos entram no organismo através do trato respiratório, intestino, conjuntiva ou pele (AKDIS, 2014). Sob influência do ligante CD40 e de citocinas (especialmente interleucina 4) produzidas por células TH2, os linfócitos B passam por troca do isótipo de cadeia pesada e produzem

anticorpos do tipo IgE. A produção de anticorpo IgE, a ligação do mesmo a receptores Fc dos mastócitos e o estímulo dos mastócitos por reexposição ao antígeno resulta na liberação de mediadores presentes nos mastócitos que são responsáveis pelas reações patológicas da hipersensibilidade imediata. Esta ligação da IgE aos mastócitos também é conhecida como sensibilização, pois ao serem revestidos por IgE os mastócitos estão prontos para serem ativados ao encontro com um antígeno (ABBAS *et al.*, 2008).



**Figura 1-** Sequência de eventos nas reações de hipersensibilidade imediata (ABBAS *et al.*, 2008).

Os indivíduos suscetíveis a reações de hipersensibilidade imediata são chamados atópicos e costumam ter maior concentração de anticorpos da classe

Imunoglobulina E (IgE) no sangue e mais receptores FcεRI (específicos para IgE) nas superfícies dos mastócitos, do que indivíduos não atópicos (WU E ZARRIN, 2014).

Os anticorpos IgE atuam contra uma ampla variedade de antígenos e estão presentes em pequenas quantidades na corrente sanguínea. Apesar da IgE constituir uma primeira linha de defesa contra parasitas, como helmintos, respostas imunes mediadas por IgE a antígenos ambientais normalmente inofensivos podem contribuir para patologias tais como asma, rinite alérgica e dermatite atópica (WU & ZARRIN, 2014). A presença de altos níveis de IgE total geralmente tem correlação com a alergia do tipo I que incluem anafilaxia tanto sistêmica quanto localizada (FRANSEN *et al.*, 2013). Dentro do mecanismo imunológico que desencadeia a resposta alérgica, o anticorpo IgE é responsável por sensibilizar os mastócitos e pelo reconhecimento do antígeno (WU & ZARRIN, 2014).

Durante a reação de hipersensibilidade imediata há o desenvolvimento de um processo inflamatório caracterizado pelo acúmulo de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e células T CD4<sup>+</sup> do tipo TH2. Nestas reações são dominantes as respostas vasculares e do músculo liso aos mediadores. As células T CD4<sup>+</sup> do tipo TH2 possuem influência não só na indução da alergia, mas também na inflamação nasal alérgica de fase tardia (OGASAWARA; ASAKURA, KATAURA, 1998).

## **1.2 Mastócito: célula efetora da alergia**

Os mastócitos são células derivadas da medula óssea e estão presentes em diversos tecidos do trato respiratório, trato gastrointestinal e nos tecidos conjuntivos ao longo dos vasos sanguíneos, onde sofrem sua maturação final. Os mastócitos expressam receptores de alta afinidade para IgE (FcεRI). No indivíduo atópico altos títulos de IgE são produzidos e estes anticorpos se ligam aos receptores FcεRI presentes na superfície dos mastócitos sensibilizando estas células. Quando o indivíduo atópico tem um segundo contato com o alérgeno, ocorre uma ligação cruzada ao anticorpo IgE ligado aos mastócitos (HOCAOGLU *et al.*, 2012).

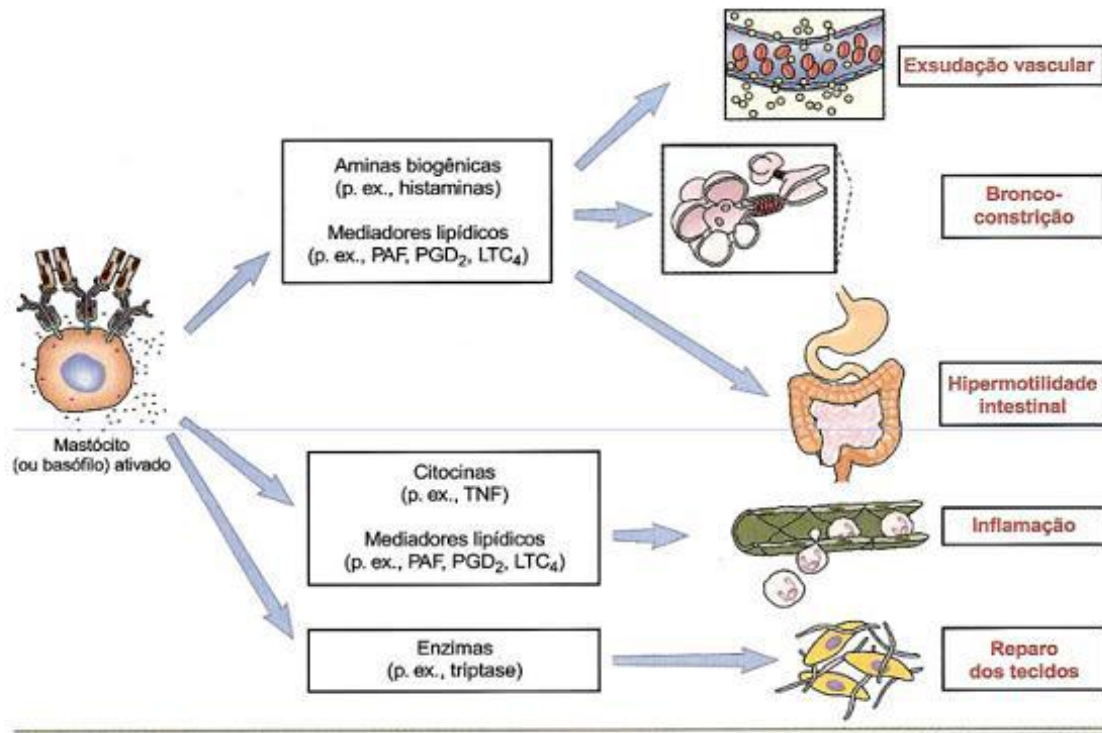
A ativação dos mastócitos via a ligação cruzada Antígeno-IgE-Receptores FcRI induz a fosforilação da tirosina quinase, a mobilização de cálcio intracelular, ativação do fator nuclear (NF)-κB, ativação das células T e a liberação de citocinas inflamatórias (KIM, *et al.*, 2014). O fator NF-κB regula genes responsáveis pela

imunidade inata e adaptativa. A ativação do NF- $\kappa$ B é acionada por uma variedade de agentes, incluindo a citocina do fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ . A citocina TNF- $\alpha$  é liberada pelos mastócitos e induz a ativação de células T, está envolvida na inflamação e na resposta imune que ocorre na pele (LEE *et al.*, 2013). A ativação de Fc $\epsilon$ RI nos mastócitos por alérgenos resulta na liberação de mediadores que são pré-formados nos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos. Devido à liberação de tais mediadores pró- inflamatórios os mastócitos e basófilos têm sido associados com a indução de sintomas da alergia. Dois dos principais mediadores liberados durante a ativação dos mastócitos é a histamina e os leucotrienos. A histamina é um mediador pré-formado nos mastócitos. Já os leucotrienos são mediadores recém-sintetizados derivado do ácido araquidônico pela via da lipoxigenase. Estes mediadores são fatores importantes na causa e tratamento da alergia e são comumente alvos terapêuticos na prática clínica, como o uso de fármacos anti-histamínicos e anti-leucotrienos (HARVIMA *et al.*, 2014).

Os mastócitos possuem importante ação na reação de hipersensibilidade do tipo I e em muitos processos fisiológicos e patológicos, como por exemplo, na cicatrização de feridas, remodelação de tecidos e homeostase (KIM *et al.*, 2014). Estas células medeiam suas ações por meio de mediadores químicos em resposta a diferentes estímulos incluindo alérgenos, infecções bacterianas, virais e fúngicas (SALUJA *et al.*, 2014).

A concentração de IgE em torno dos mastócitos durante sua maturação final influencia na capacidade de produzir e liberar mediadores como histamina, leucotrienos e prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) (FRANSEN *et al.*, 2013). A prostaglandina D<sub>2</sub> promove a vasodilatação e o eritema (KIM *et al.*, 2014). Já a histamina atua sobre as células do músculo liso vascular e conduz à vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. (THURMOND; GELFAND, DUNFORD, 2008). A ativação e desgranulação de mastócitos contribuem para a inflamação alérgica em diferentes tipos de alergia (tópica, respiratória, alimentar) (FRANSEN *et al.*, 2013).

Além disso, os fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas inflamatórias secretadas pelo mastócitos possuem o potencial de recrutar outras células do sistema imunológico seja diretamente ou indiretamente. Desta forma, contribuem tanto para a inflamação aguda quanto para a inflamação crônica (KIM *et al.*, 2014), conforme ilustrado na Figura 2.



**Figura 2-** Efeitos biológicos dos mediadores de hipersensibilidade imediata. Os mediadores dos mastócitos e basófilos incluem aminas biogênicas e enzimas armazenadas pré-formadas em grânulos, bem como citocinas e mediadores lipídicos, que são recém-sintetizados com a ativação celular (ABBAS et al., 2008).

### 1.3 Alguns tipos de reações alérgicas

A rinite alérgica é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas inferiores. Caracterizada pelos sintomas clássicos como coriza, espirros e congestionamento nasal. Os pacientes também podem ter fadiga diurna, falta de concentração, sonolência diurna e inquietação durante o sono (ERDOGAN *et al.*, 2014).

A asma é uma inflamação crônica das vias aéreas inferiores que se caracteriza por episódios recorrentes de falta de ar, aperto no peito e tosse. A inalação de alérgenos por pacientes com asma atópica induz algumas manifestações da asma, incluindo obstrução reversível do fluxo de ar, hiper-responsividade das vias aéreas, eosinofilia e inflamação das vias aéreas (GAUVREAU *et al.*, 2014). Na asma, por exemplo, a liberação de mediadores químicos pelos mastócitos, resulta no aumento da permeabilidade vascular, na contração dos músculos lisos das vias aéreas (broncoespasmo) (FRANDSEN *et al.*, 2013). Os sintomas da alergia possuem

grande impacto no bem-estar geral e na qualidade de vida de uma proporção significativa dos pacientes, principalmente entre aqueles nos quais a doença é persistente (DEMOLY *et al.*, 2014).

A asma é uma doença imunológica mediada por células TH2 essas células desempenham importante função nesta doença. Atuam na produção da IL-4, um fator chave para estimulação da produção de IgE; IL-5 um fator de diferenciação e crescimento de eosinófilos; IL-9 e IL-13 que podem provocar diretamente a hiperreatividade das vias aéreas (YU *et al.*, 2014). Além de citocinas produzidas por linfócitos TH2. As células T são essenciais para a ativação de células B e produção anticorpos IgE (URRA, *et al.*, 2014).

#### **1.4 Tratamentos convencionais das alergias**

A terapia medicamentosa antialérgica tem como objetivo inibir a produção dos mediadores dos mastócitos e bloquear ou se contrapor aos efeitos dos mediadores liberados nos órgãos-alvo. O objetivo da imunoterapia é impedir ou amenizar as respostas de linfócitos TH2 a alérgenos específicos e a produção de IgE (ABBAS *et al.*, 2008)

Os anti-histamínicos H1 são agonistas inversos e atualmente é o antialérgico mais utilizado em pacientes com dermatite atópica, urticária, rinite alérgica e também em pacientes asmáticos (HARVIMA *et al.*, 2014). Compostos anti-histamínicos H1 (ou H1A) são amplamente prescritos para prevenir ou aliviar sintomas nasais da rinite, oculares da conjuntivite alérgica. Devido aos efeitos secundários incômodos (sedação, funções cognitivas e psicomotoras prejudicadas) das primeiras medicações comercializadas, medicamentos de segunda geração foram desenvolvidos e aprovados ao longo dos últimos 25 anos. Tais medicações exibem baixo efeito sedativo, pois possuem baixa capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (DEMOLY *et al.*, 2014).

Existe uma série de agentes terapêuticos disponíveis para o tratamento das doenças alérgicas. No entanto, a maioria deles atua modulando as respostas Th1/Th2 e reduzindo a concentração de IgE. Os glicocorticóides são amplamente utilizados na terapia de doenças alérgicas, mas o seu uso em longo prazo conduz a efeitos secundários indesejáveis. Recentemente, os produtos naturais são propostos

como candidatos de drogas antialérgicas devido à sua grande eficácia imunomoduladora e segurança estabelecida. Algumas plantas medicinais tradicionais têm sido identificadas com efeitos antialérgicos ao suprimirem a desgranulação e ativação de mastócitos *in vitro* e *in vivo* (KIM *et al.*, 2014).

Os broncodilatadores são eficazes na redução da obstrução das vias aéreas. Atualmente recomenda-se o uso combinado de broncodilatadores de longa duração com corticosteroides. Entretanto o uso prolongado destes medicamentos leva a efeitos adversos os quais são indesejáveis (JUTEL, 2014) os vasoconstritores também podem ser utilizados como, por exemplo, no caso da anafilaxia. Em casos de anafilaxia em que se requer uma ação rápida os mesmos são de extrema importância, contudo a administração incorreta pode levar a efeitos graves (IZGI; CEVIK, NUGENT, 2010).

O cromoglicato dissódico é um composto terapêutico comercializado como um estabilizador de membrana de mastócitos, utilizado para reverter os sintomas da reação alérgica (WENG *et al.*, 2012).

### **1.5 Busca por novas alternativas terapêuticas**

Existe uma necessidade de desenvolver novas substâncias naturais que possam modular as doenças alérgicas que sejam eficazes e tenham menos efeitos adversos. Recentemente os produtos naturais são propostos como candidatos de drogas antialérgicas devido à sua grande eficácia imunomoduladora. Algumas plantas medicinais tradicionais têm demonstrado efeitos antialérgicos devido causarem a supressão da ativação e desgranulação dos mastócitos *in vitro* e *in vivo* (KIM *et al.*, 2014). As indústrias farmacêuticas tem demonstrado interesse no estudo de plantas para o desenvolvimento de fitoterápicos com eficácia e segurança comprovada. Entretanto a aceitação de fitofármacos e a integração de fitoterapia com o conceito de medicina clássica só pode ser alcançado desde que se cumpram os mesmos critérios de qualidade como dos produtos farmacêuticos sintéticos (MACHADO *et al.*, 2005). Deve-se levar em consideração fontes inexploradas e pouco exploradas da diversidade biológica na busca de compostos biologicamente ativos (GUIMARÃES *et al.*, 2007).

Dentre as diferentes classes de substâncias químicas presentes nas espécies vegetais têm-se os flavonóides que são substâncias polifenólicas derivadas de plantas que apresentam diferentes atividades farmacológicas já descritas na



literatura. O flavonoide quercetina da família Liliaceae (FARHADI *et al.*, 2014) e seus derivados possuem efeitos anti-inflamatórios e propriedades antioxidantes (LEE *et al.*, 2013). Abundantemente encontrado na cebola, amora, e muitos frutos, este flavonoide demonstra potencial terapêutico em estudos realizados com modelos animais para o tratamento de doenças alérgicas das vias respiratórias ao ser administrado por via oral ou por inalação apresentando atividade antiasmática. Os efeitos inibitórios dos compostos polifenólicos tais como os flavonóides nos mastócitos e basófilos foram extensivamente relatados (HATTORI *et al.*, 2013). A quercetina inibe a liberação de histamina, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  pelos mastócitos (WENG *et al.*, 2012).

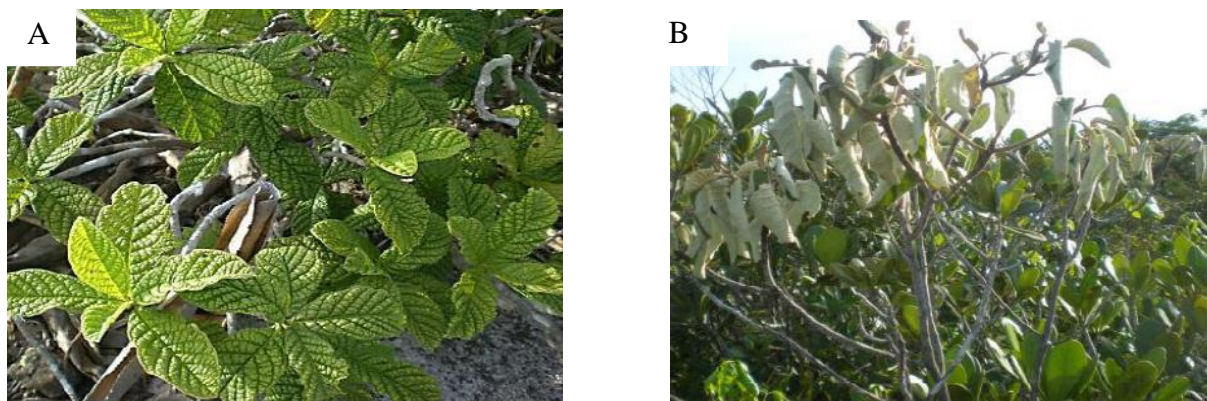
## 1.6 Espécies vegetais estudadas

O Estado do Rio de Janeiro possui uma grande diversidade de ecossistemas que inclui restingas. As restingas foram formadas ao longo da costa brasileira como um resultado de transgressões e regressões consecutivas do mar. O bioma de restinga possui uma vegetação característica devido a uma combinação de fatores físicos e químicos destas regiões. Devido tal diversidade de condições físicas origina uma vasta diversidade de habitats que são colonizados por uma grande variedade de comunidades vegetais. O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ) possui uma vegetação abundante e bem preservada incluindo algumas espécies em extinção. Esta restinga está localizada no Rio de Janeiro estendendo-se por Macaé, Carapebus e Quissamã. O município de Quissamã abriga a maior parte do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (KELECOM *et al.*, 2001).

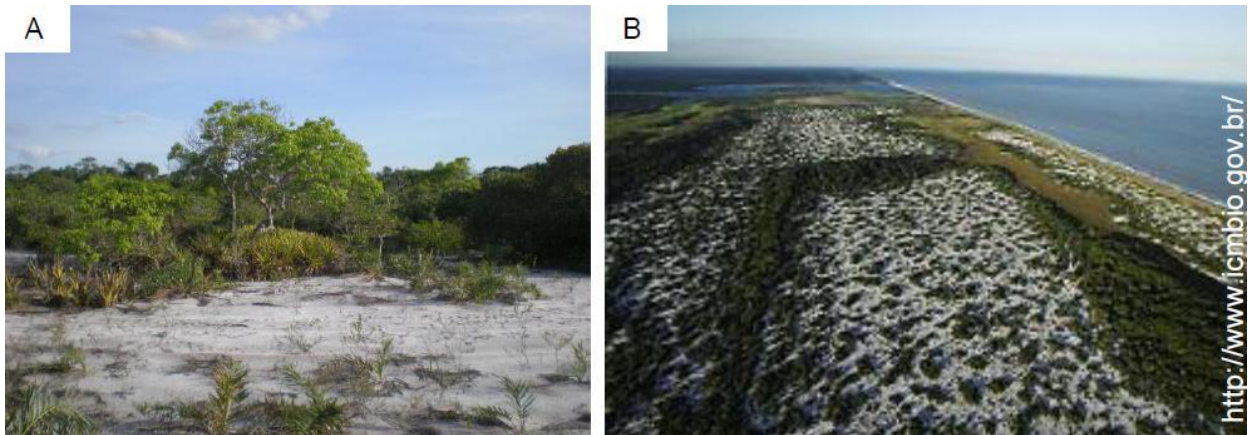
Dentre a variedade de gêneros que podem ser encontrados na Restinga de Jurubatiba estão *Vernonia* e *Tocoyena*. O gênero *Vernonia*, o mais importante gênero da família Asteraceae, apresenta aproximadamente 1.500 espécies distribuídas em regiões tropicais e sub-tropicais, sendo a África e a América do Sul, os principais centros de dispersão. A espécie vegetal *Vernonia crotonoides* possui nome popular de papel higiênico das índias. Pode-se isolar desse gênero compostos bioativos como glicosídeos esteroidais os quais apresentam atividade anti-inflamatória, lactonas sesquiterpênicas que possuem atividade anticâncer e sesquiterpenoides citotóxicos. As plantas pertencentes a este gênero possuem glândulas oleíferas numa quantidade significativa e muitos dos seus óleos

essenciais apresentam atividades biológicas, como inseticida e antimicrobiana. As espécies deste gênero crescem em uma ampla gama de habitats em diferentes condições climáticas, incluindo floresta tropical, pântanos, planícies secas e savanas tropicais (GLEASON, 1923; KEELEY E JONES, 1979).

O gênero *Tocoyena* é um gênero da família Rubiaceae e subfamília Ixoroideae nesta subfamília iridóides glicosilados são comumente encontrados. Os iridóides são considerados seu principal marcador quimiotaxonômico. As espécies do gênero *Tocoyena* são típicas do Cerrado, mas também ocorrem em florestas com clima quente e úmido, como a Floresta Amazônica. Todos os representantes de *Tocoyena* são árvores de pequeno porte ou arbustos. Esta espécie vegetal possui o nome popular de araçá-da-praia ou marmelada-da-praia. Para a espécie *Tocoyena bullata* existe apenas um registro na literatura a cerca de seus constituintes químicos, sendo o gardenosido, da família dos iridóides, o constituinte químico isolado e identificado a partir do extrato aquoso das folhas (VON POSER *et al.*, 1997). Não existem estudos farmacológicos atribuídos a essa espécie tendo apenas o gardenosido identificado. Foram alvos de estudo neste trabalho, as espécies *Tocoyena bullata* e *Vernonia crotonoides* (Figura 3), as quais podem ser encontradas na Restinga de Jurubatiba (Figura 4).



**Figura 3-** Espécies vegetais estudadas. A) *Tocoyena bullata* e B) *Vernonia crotonoides*.



**Figura 4-** Imagens da Restinga de Jurubatiba. Fotografias retiradas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, na região do município de Macaé. A) Vista terrestre e B) Vista aérea.

## 2 JUSTIFICATIVA

Os medicamentos atualmente utilizados no tratamento de doenças alérgicas conduzem a efeitos adversos indesejáveis. Devido o impacto das doenças alérgicas, este projeto foi baseado no estudo de plantas presentes na região norte-fluminense, como fontes de produtos naturais com possível atividade antialérgica e como potenciais agentes terapêuticos.

## 3 OBJETIVOS GERAIS

Investigar o efeito antialérgico dos extratos das espécies vegetais *Tocoyena bullata* e *Vernonia crotonoides* da região norte-fluminense (restinga de Jurubatiba).

## 4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a citotoxicidade dos extratos brutos das plantas *Tocoyena bullata* (caule, folha e flor) e *Vernonia crotonoides* (folha) sobre células de mamíferos através da dosagem de lactato desidrogenase *in vitro*.
- 2) Avaliar a possível atividade inibitória dos extratos das plantas *Tocoyena bullata* e *Vernonia crotonoides* sobre a desgranulação de mastócitos do mesentério dos ratos *ex vivo*.
- 3) Avaliar a atividade imunossupressora dos extratos das plantas *Tocoyena bullata* e *Vernonia crotonoides* sobre a proliferação de linfócitos *in vitro*.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Ratos Wistar fêmeas com aproximadamente 10 meses de vida foram utilizados no ensaio de citotoxicidade dos extratos brutos e na avaliação da desgranulação de mastócitos. Os mesmos foram cedidos pelo biotério do pólo universitário *Campus* UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira. Camundongos suíços fêmeas com 3 meses de vida foram utilizados no ensaio de inibição de proliferação de linfócitos e cedidos pelo biotério do pólo Barreto do *Campus* UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira. Os animais foram mantidos com ração peletizada, água filtrada e maravalha esterilizada de acordo com as Normas da Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa do *Campus* UFRJ Macaé Professor Aloísio Teixeira - protocolo CEUA MACAÉ06.

### 5.2 Preparação do extrato bruto das plantas

A coleta dos materiais vegetais de *Tocoyena bullata* (Rubiaceae) e *Vernonia crotonoides* (Asteraceae) foram realizadas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e as espécies vegetais foram identificadas pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Ungaretti Paleo Konno (UFRJ-Macaé) e as exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O código botânico (exsiccatas) das espécies *Tocoyena bullata* e *Vernonia crotonoides* foram RFA38974 e RFA38749 respectivamente. O material coletado foi envolvido em jornal e armazenado em caixa de isopor para o seu transporte. Inicialmente as folhas de *Vernonia crotonoides*, foram separadas dos caules, secas em estufas de ar circulante e pulverizadas em liquidificador para o processo extrativo. O processo de decocção, para a extração das folhas, foi realizado adicionando-se em um béquer, 50 g da planta e 1000 mL de água destilada (5% p/v). A mistura foi levada à fervura em placa de aquecimento por 10 minutos. Após esse processo o decocto foi inicialmente filtrado com uma peneira e posteriormente com papel filtro pregueado, para que houvesse uma completa separação das folhas e extrato. O extrato foi congelado e liofilizado resultando no extrato bruto. Já na preparação do extrato bruto de TB caule, TB flor e TB folha o material do caule, flores e folha foi seco, pulverizado e submetido a um processo de

extração por maceração à temperatura ambiente em etanol absoluto por aproximadamente 5 dias. O macerado obtido foi filtrado e posteriormente concentrado em rotaevaporador. Estes procedimentos foram realizados pelo grupo do Laboratório de Produtos Naturais do *Campus* UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira, sob orientação das professoras Denise Oliveira Guimarães e Michelle Frazão Muzitano. As amostras foram diluídas à 1mg/mL em tampão fosfato salino (PBS) e 0,25% de dimetilsulfóxido (DMSO) e estocadas a -20°C.

### 5.3 Ensaio *in vitro*

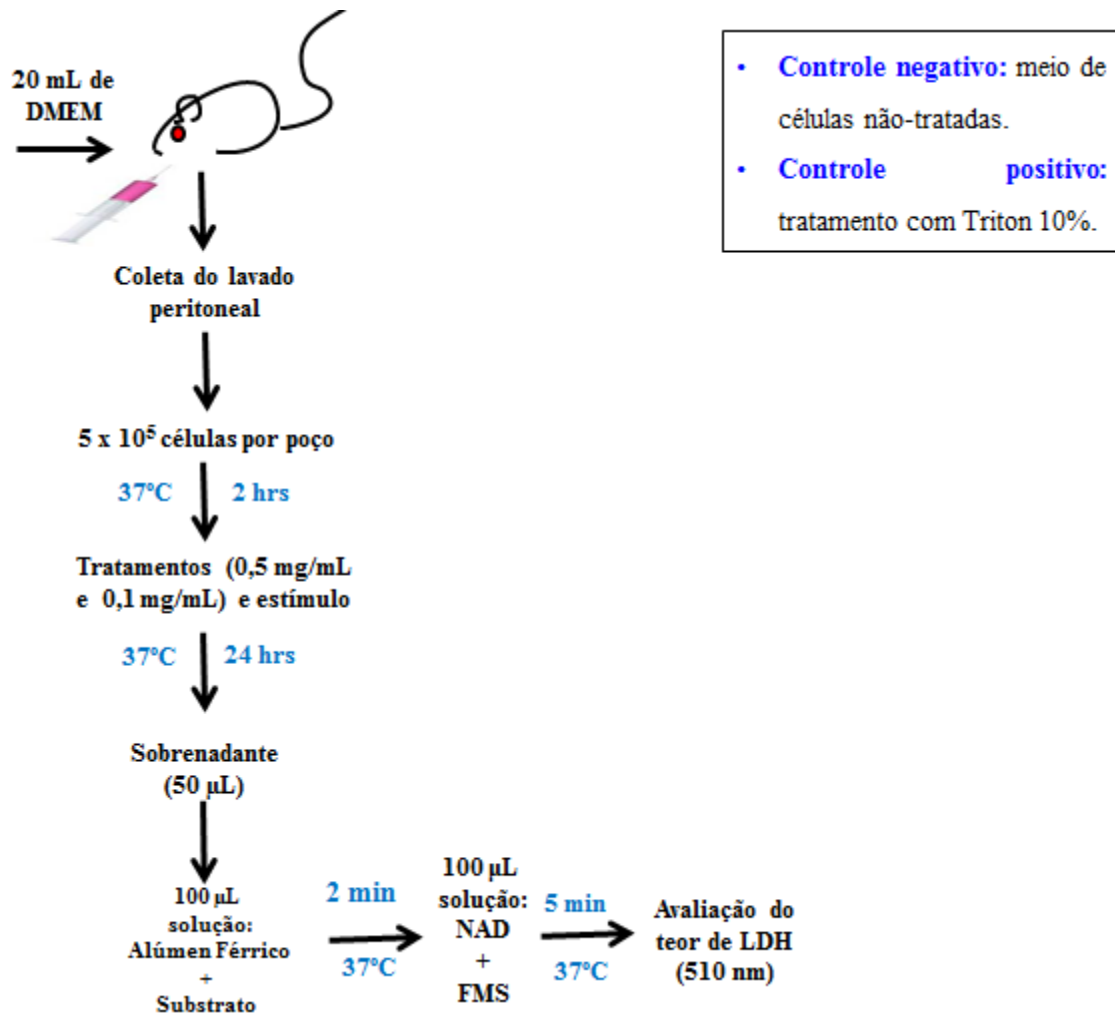
#### 5.3.1 Ensaio da citotoxicidade dos extratos através da dosagem de LDH *in vitro*

Neste ensaio foi utilizado o kit colorimétrico comercial Doles, modificado para uso em microplaca, para analisar o teor da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada no sobrenadante da cultura de macrófagos. O lavado peritoneal foi obtido através da injeção de 20 mL de meio DMEM gelado no peritônio dos ratos. O número de células totais e viáveis foram contadas com azul de Trypan (Sigma) e a concentração das células foi ajustada para  $5 \times 10^5$  células por poço, plaqueando-se 200µL por poço. As células foram mantidas a 37°C por 2 horas, para adesão dos macrófagos. Em seguida, os extratos de *Tocoyena bullata* caule, folha e flor e de *Vernonia crotonoides* foram adicionados nas concentrações de 0,5 mg/mL e 0,1mg/mL. Utilizou-se como controle negativo, lise mínima obtida no sobrenadante de cultura de macrófagos não tratados e como controle positivo 10% de Triton X-100 (Sigma) para obtenção da lise máxima.

O sobrenadante das células foi separado 24 h após o tratamento com os extratos e a dosagem da LDH foi realizada através da reação enzimática com uma mistura de Alúmen Férrico e Substrato e posterior reação com a solução de difosfopiridino nucleótido (NAD) e Fenasina Metosulfato (FMS) conforme adaptação do kit colorimétrico Doles. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 510 nm (figura 5).

O resultado foi expresso em % relativo a liberação de LDH, em relação ao controle de lise máxima Triton (10%).

% liberação relativa de LDH =  $(D.O.amostra - D.O.controle\ negativo) * 100 / (D.O.Triton - D.O.controle\ negativo)$



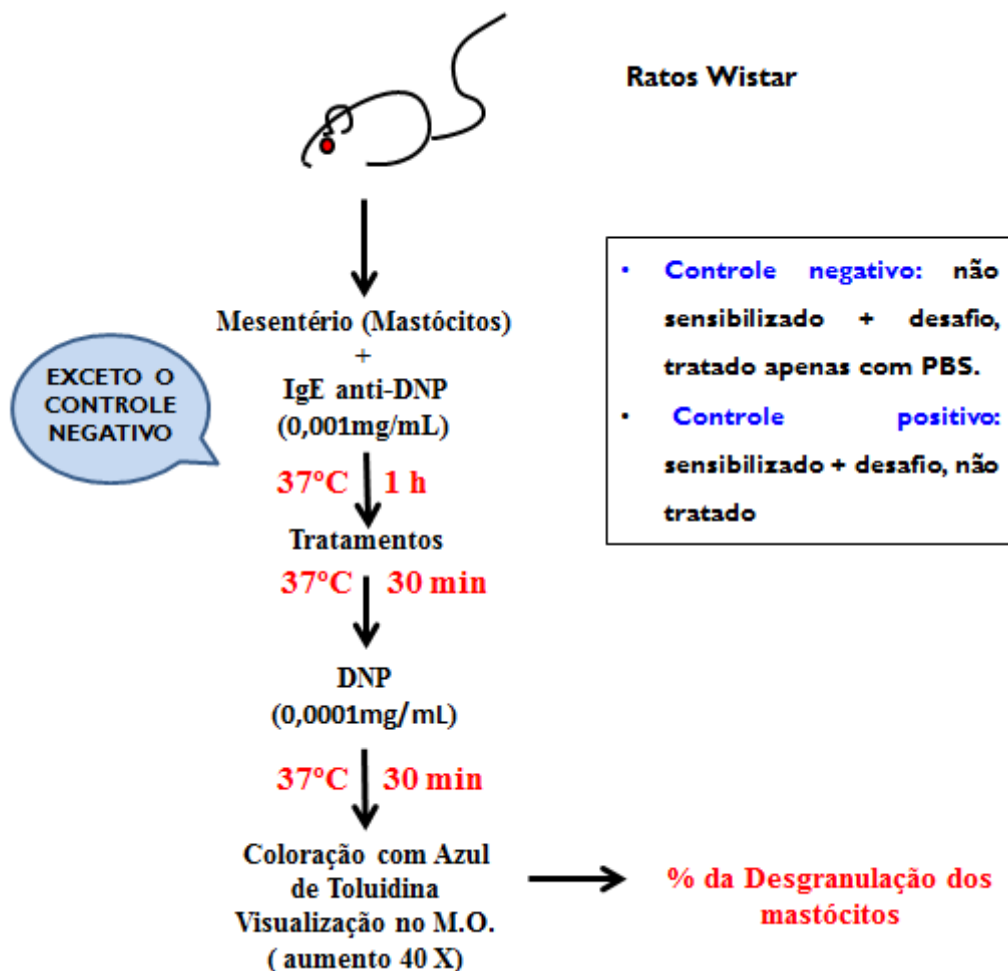
**Figura 5-** Esquema representativo do ensaio de avaliação da citotoxicidade dos extratos através da dosagem de LDH *in vitro*.

### 5.3.2 Ensaio de desgranulação de mastócitos *ex vivo*

As membranas de mesentérios de ratos Wistar foram isoladas e incubadas *ex vivo*. Após a preparação da amostra e do controle em suas concentrações ótimas, pipetou-se o volume calculado em cada um dos mesentérios e seguiu-se um período de tempo para ação do tratamento sobre os mesmos, mantidos armazenados na estufa. As membranas foram sensibilizadas com 1 mL do anticorpo anti-DNP (0,001 mg/mL), exceto o grupo controle negativo que recebeu somente o PBS e foram levados para estufa onde permaneceram por 1 hora à 37 °C. Passado o tempo as membranas foram retiradas da estufa e cada grupo foi tratado com seu

respectivo extrato bruto das espécies vegetais em três diferentes concentrações (0,5 mg/ml, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL) e foram incubadas à 37°C por 30 minutos.

Conforme a figura 6, posteriormente todos os grupos foram desafiados com o antígeno DNP (0,0001mg/mL) e foram levados para estufa onde ficaram por mais 30 minutos. Finalizada esta etapa as amostras foram coradas com azul de toluidina e levadas para visualização no microscópio. A análise da desgranulação foi feita através da contagem do número de mastócitos intactos ou desgranulados, em microscópio óptico.



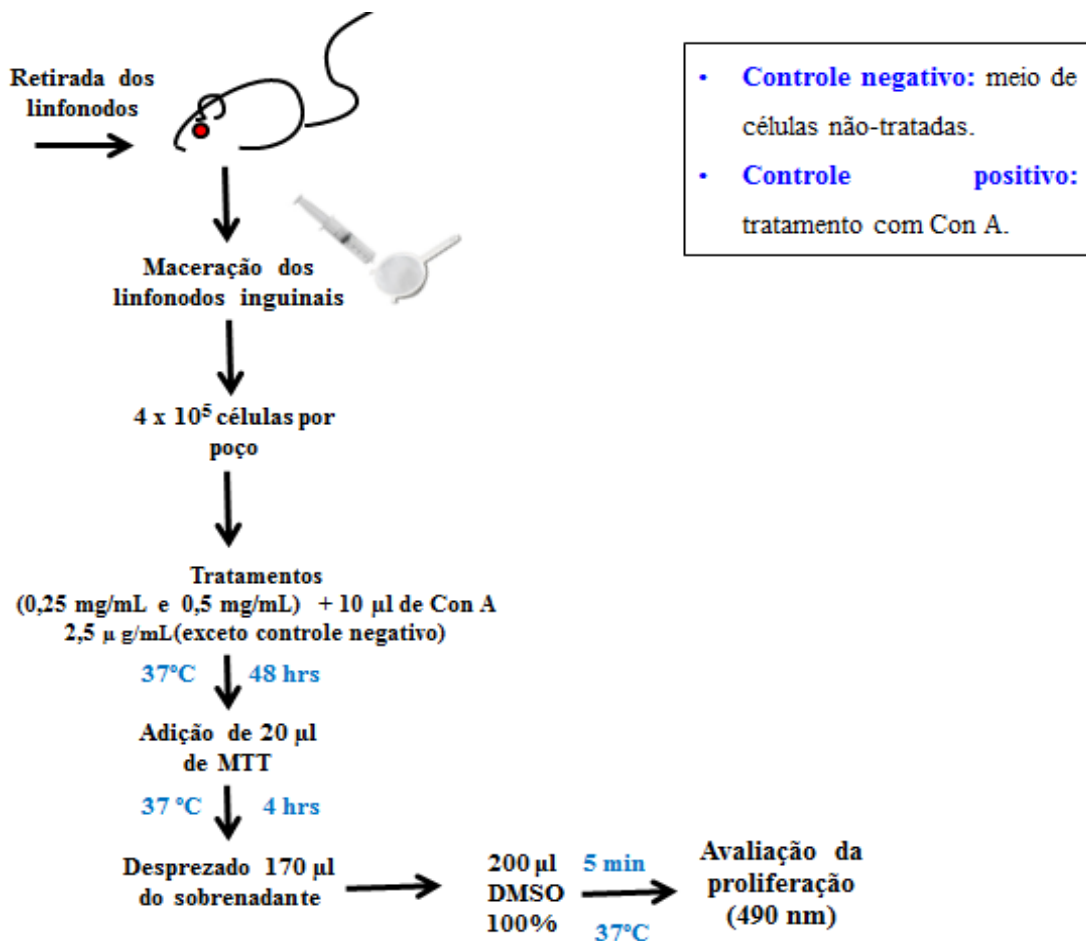
**Figura 6-** Esquema representativo do ensaio de desgranulação dos mastócitos.

### 5.3.3 Ensaio de proliferação de linfócitos *in vitro*

Neste ensaio foi analisada a proliferação de linfócitos. Os linfócitos foram obtidos através da maceração dos linfonodos inguinais de camundongos suíços. O número de células totais e viáveis foram contadas com azul de Trypan (Sigma) e a



concentração das células foi ajustada para  $4 \times 10^6$  células/mL, plaqueando-se 100  $\mu$ L em cada poço. Posteriormente foram adicionados 100 $\mu$ L de meio DMEM com 7,5% de soro fetal bovino (SFB) e suplementado com 2-Me nos controles negativos e positivos. Foi adicionado 100 $\mu$ L dos tratamentos com os extratos de *Tocoyena bullata* (TB) caule, folha e flor e de *Vernonia crotonoides* (VC) nas concentrações de 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL. Em seguida, foi adicionado 10 $\mu$ L de concavalina A (Sigma) em uma concentração de 2,5  $\mu$ g/mL em todos os poços exceto no controle negativo. A placa foi incubada na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 48 horas, para proliferação dos linfócitos. Após esse período, adicionou-se 20  $\mu$ L por poço de uma solução 5 mg/mL de sal de tetrazol 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazol (MTT) (Sigma) em tampão fosfato salino (PBS) estéril. Quatro horas depois, 170  $\mu$ L do sobrenadante foram desprezados e adicionou-se 200  $\mu$ L de DMSO 100% (Vetec). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 490 nm.



**Figura 7-** Esquema representativo do ensaio de avaliação da proliferação de linfócitos.

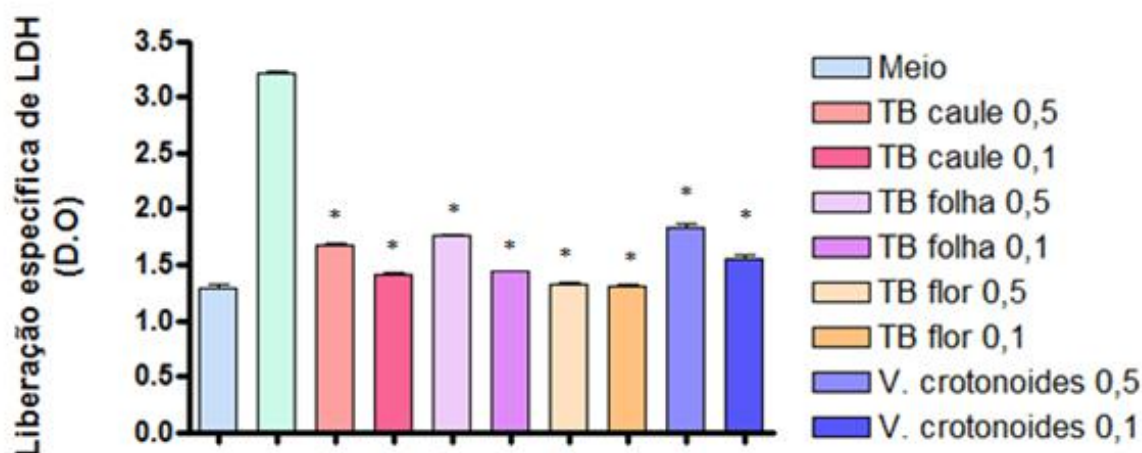


## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto de *Tocoyena bullata* (caule, folha e flor) e *Vernonia crotonoides*

De acordo com dados do Sistema Nacional de Informações Toxicológicas no ano de 2010, no Brasil foram registrados 1.132 casos de intoxicação humana por uso de plantas sendo que desses, 5 levaram a óbito. Como exemplo de espécies que possuem uso popular e podem apresentar partes tóxicas pode-se citar o cambará (*Lantana camara*). Na medicina popular é utilizado como diurético, expectorante, antirreumático e anticonvulsivante. No entanto, seus frutos são considerados tóxicos (COSTA, 2009), demonstrando desta forma, a importância da avaliação da citotoxicidade dos extratos.

A liberação específica de LDH ocasionada pelos tratamentos com TB (caule, folha e flor) apresentaram valores de  $1,66 \pm 23,33$ ;  $1,76 \pm 21,92$ ;  $1,33 \pm 6,36$  e  $1,42 \pm 10,60$ ;  $1,43 \pm 16,97$ ;  $1,31 \pm 16,97$  com as concentrações de 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL respectivamente. O tratamento com VC apresentou valores de  $1,83 \pm 31,11$  e  $1,55 \pm 36,76$  para as concentrações de 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL respectivamente. Esses resultados foram estatisticamente diferentes do controle de liberação máxima de células com Triton 10%  $3,21 \pm 35,35$   $P < 0,001$ . Sendo assim, os extratos não apresentaram citotoxicidade em ambas as concentrações utilizadas, 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL (gráfico 1).



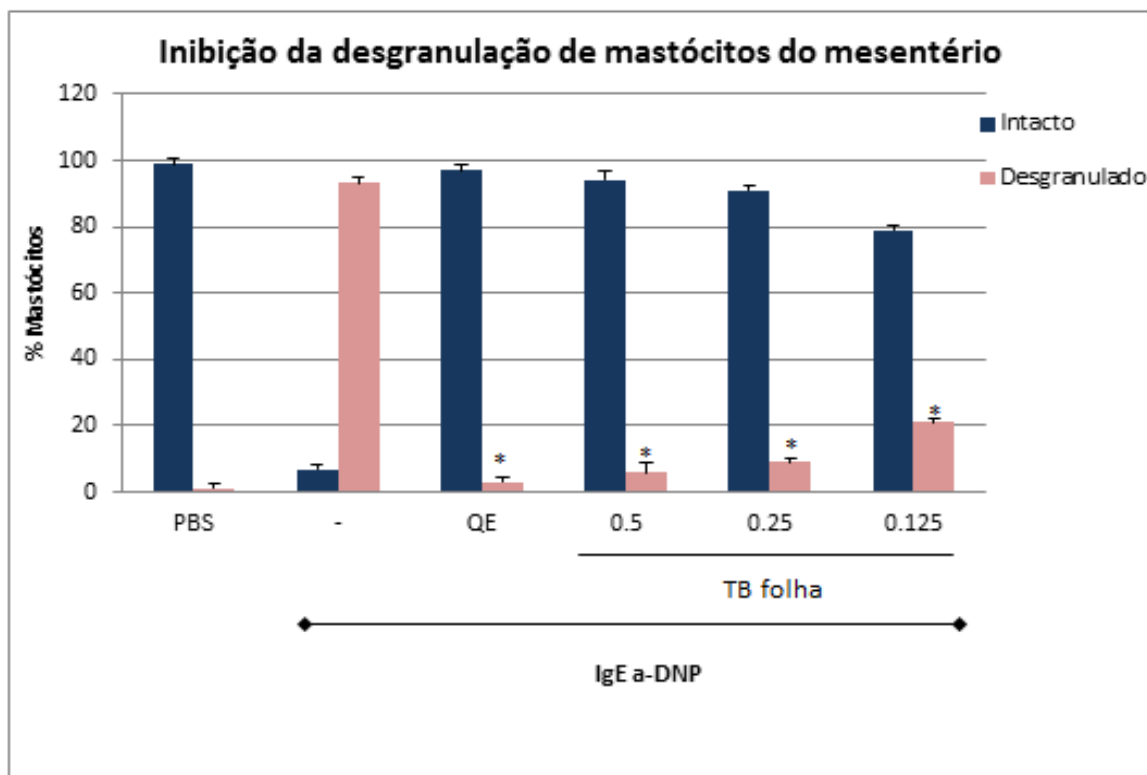
**Gráfico 1.** Teste de citotoxicidade dos extratos brutos. Macrófagos peritoniais de ratos Wistar foram cultivados com os extratos brutos das plantas *Tocoyena bullata* (caule, folha e flor) e *Vernonia crotonoides* (VC) nas concentrações de 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL durante 24 hrs. A citotoxicidade foi avaliada pelos níveis de liberação de LDH em relação ao controle de liberação máxima (triton 10%). O controle de liberação basal de LDH foi mantido apenas com o meio de cultura (Meio). Média  $\pm$ D.P., \* $P < 0,001$  em relação ao grupo controle triton 10%.

## 6.2 Teste de desgranulação de mastócitos

Os testes foram realizados no mesentério de rato devido a este ser rico em mastócitos. Foram testados extratos brutos das plantas TB folha, TB caule, TB flor e VC folha. O flavonóide quercetina (QE), obtido comercialmente (Sigma) foi utilizado como controle de inibição da desgranulação, pois possui atividade inibitória já comprovada (HATTORI *et al.*, 2013).

### 6.2.1 Avaliação do extrato bruto das folhas de *Tocoyena bullata*

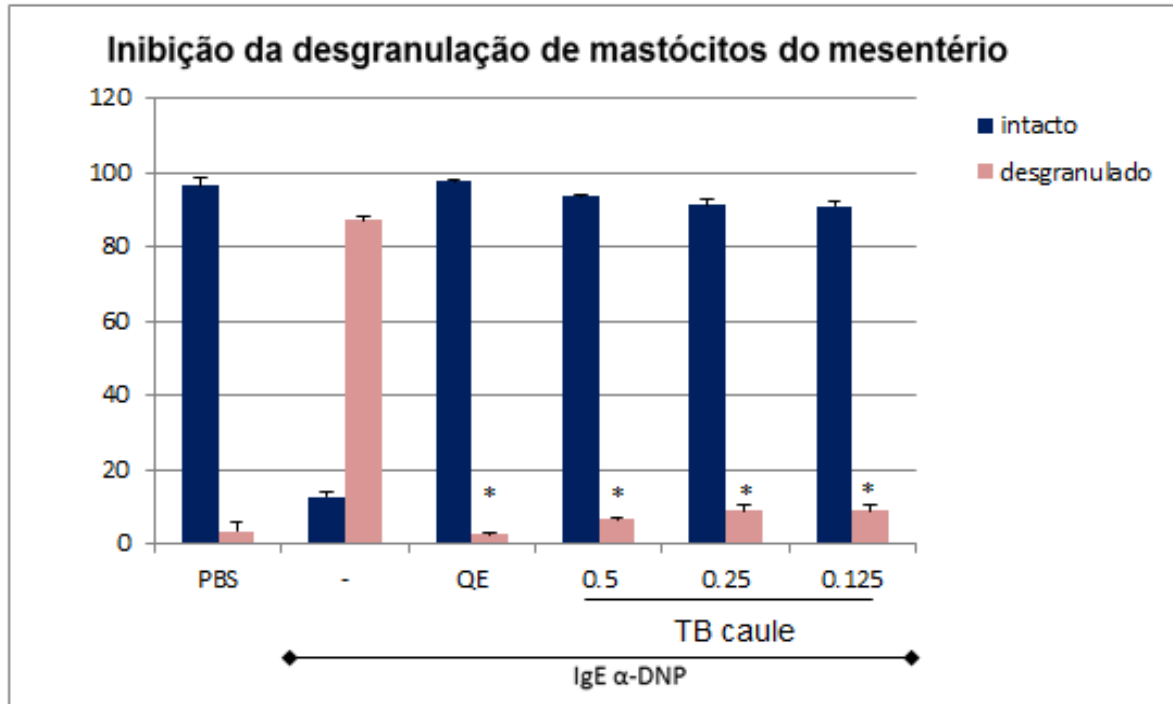
Foi observado que os grupos tratados com o extrato bruto de *Tocoyena bullata* folha apresentaram efeito inibitório significativo sobre a desgranulação dos mastócitos *ex vivo* e que este efeito era dependente da concentração utilizada (gráfico 2). O tratamento com TB folha na concentração de 0,5 mg/mL apresentou  $6 \pm 2,8\%$  de mastócitos desgranulados, ao utilizar 0,25mg/mL a desgranulação foi de  $9 \pm 1,4\%$  e com 0,125mg/mL a desgranulação foi de  $21 \pm 1,4\%$ , em comparação com o controle positivo de desgranulação que apresentou  $93,1 \pm 1,4\%$  de desgranulação mastocitária. Sendo assim, a inibição da desgranulação é concentração dependente. No tratamento com a quercetina a desgranulação foi de  $3 \pm 1,4\%$ .



**Gráfico 2.** Curva concentração dependente do extrato bruto de *Tocoyena bullata* (folha). Mastócitos de mesentério de rato Wistar foram sensibilizados com IgE anti-DNP (0,001mg/mL), tratados com os extratos em diferentes concentrações (0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL) de *Tocoyena bullata* (TB folha) e desafiados com DNP (0,0001mg/mL). O percentual de mastócitos desgranulados foi avaliado em microscópio óptico corando-se as células com azul de Toluidina. Os controles foram: não sensibilizado e tratado com PBS (controle Negativo de desgranulação), sensibilizado e não tratado (controle positivo de desgranulação) e Quercetina (QE). \*  $p < 0,01$  em relação ao grupo controle positivo de desgranulação (-) Média  $\pm$  DP (n=2).

### 6.2.2 Avaliação do extrato bruto do caule de *Tocoyena bullata*

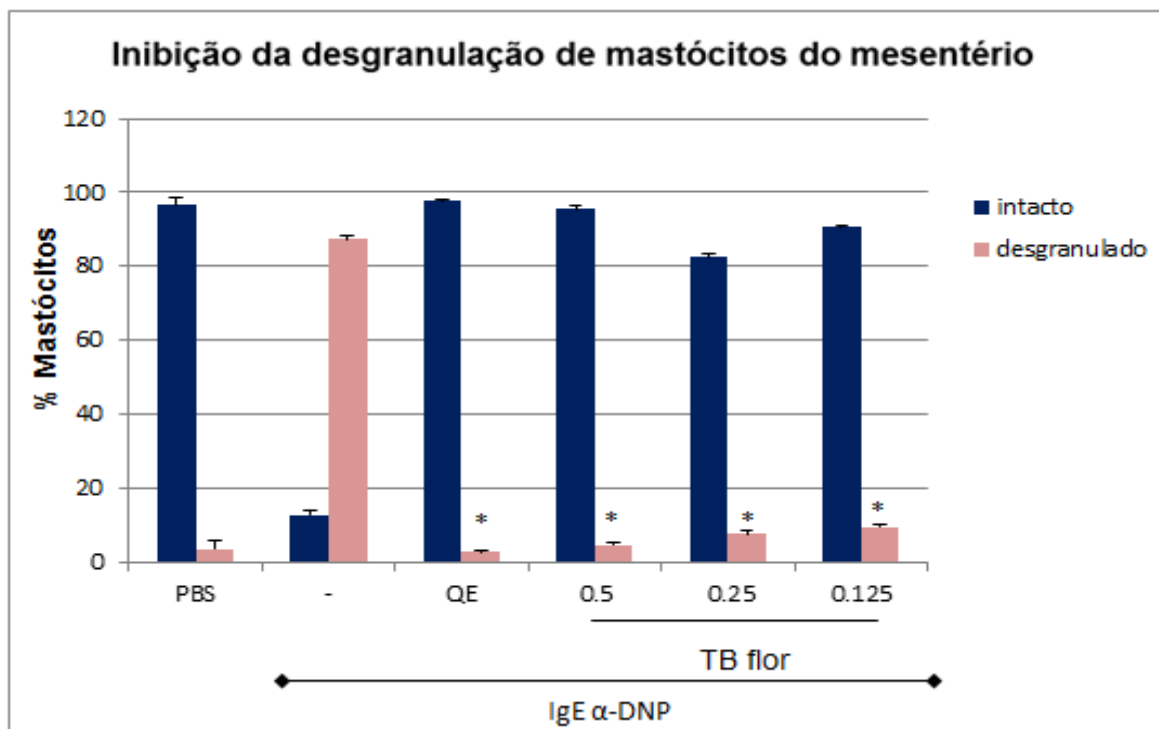
O mesmo efeito concentração dependente foi avaliado para TB caule o qual apresentou valores iguais a  $6,5 \pm 0,7$ ;  $8,8 \pm 1,6$  e  $9 \pm 1,4$  de desgranulação para os tratamentos com as concentrações de 0,5; 0,25 e 0,125 mg/mL respectivamente. O grupo controle positivo de desgranulação apresentou  $87,2 \pm 1,0\%$ . O grupo tratado com quercetina apresentou  $2,5 \pm 0,7\%$  de desgranulação mastocitária (gráfico 3).



**Gráfico 3.** Curva concentração dependente do extrato bruto de *Tocoyena bullata* caule. Mastócitos de mesentério de rato Wistar foram sensibilizados com IgE anti-DNP (0,001mg/mL), tratados com os extratos em diferentes concentrações (0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL) de *Tocoyena bullata* (TB) caule e desafiados com DNP (0,0001mg/mL). O percentual de mastócitos desgranulados foi avaliado em microscópio óptico corando-se as células com azul de Toluidina. Os controles foram: não sensibilizado e tratado com PBS (controle Negativo de desgranulação), sensibilizado e não tratado (controle positivo de desgranulação) e Quercetina (QE). \*  $p < 0,01$  em relação ao grupo controle positivo de desgranulação (-). Média  $\pm$  DP (n=2).

### 6.2.3 Avaliação do extrato bruto das flores de *Tocoyena bullata*

Já os grupos que foram tratados com o extrato de TB flor apresentaram valores de  $4,5 \pm 0,7$ ;  $7,5 \pm 0,7$  e  $9,5 \pm 0,7$  de desgranulação para os tratamentos com as concentrações de 0,5; 0,25 e 0,125 mg/mL respectivamente. O grupo controle positivo de desgranulação apresentou  $87,2 \pm 1,0\%$ . O grupo tratado com quercetina apresentou  $2,5 \pm 0,7\%$  de desgranulação mastocitária (gráfico 4).



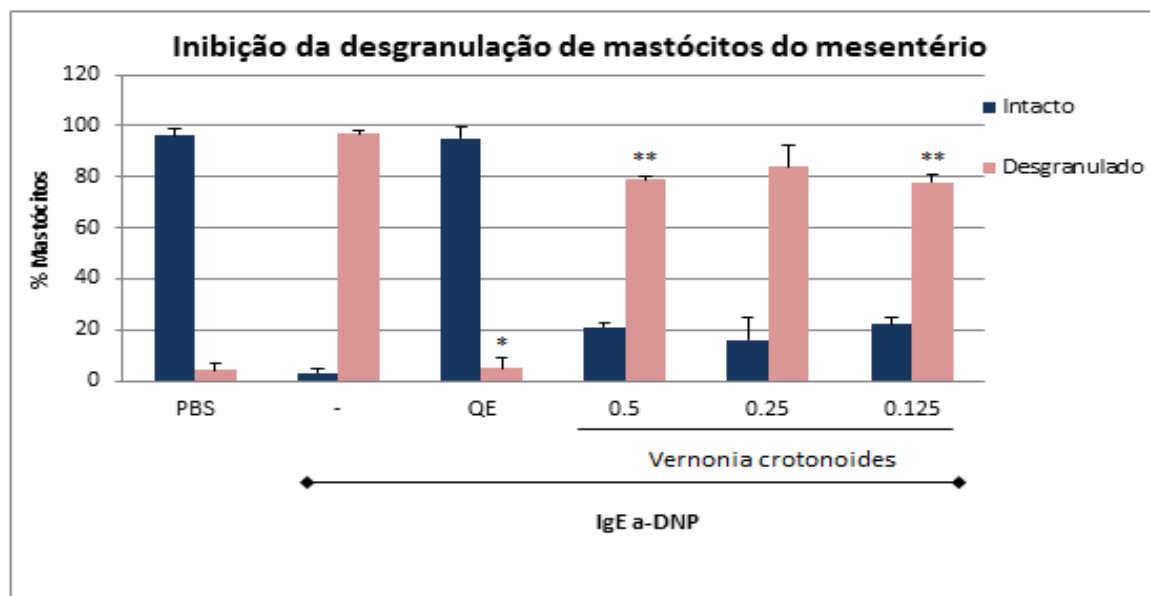
**Gráfico 4.** Curva concentração dependente do extrato bruto de *Tocoyena bullata* flor. Mastócitos de mesentério de rato Wistar foram sensibilizados com IgE anti-DNP (0,001mg/mL), tratados com os extratos em diferentes concentrações (0,5 mg/mL, 0,25 mg/ml e 0,125 mg/mL) de *Tocoyena bullata* (TB) flor e desafiados com DNP (0,0001mg/mL). O percentual de mastócitos desgranulados foi avaliado em microscópio óptico corando-se as células com azul de Toluidina. Os controles foram: não sensibilizado e tratado com PBS (controle Negativo de desgranulação), sensibilizado e não tratado (controle positivo de desgranulação) e Quercetina (QE). \*  $p < 0,01$  em relação ao grupo controle positivo (-). Média  $\pm$  DP (n=2).

Os tratamentos com os extratos brutos de TB (folha, caule e flor) se mostraram promissores na inibição da desgranulação de mastócitos, sendo dados inéditos, uma vez que não há descrição em literatura científica associando esta espécie com tal atividade biológica. Devido ao fato dos mastócitos desempenharem papel central na resposta alérgica, diferentes modelos experimentais envolvendo estas células são utilizados para avaliar a atividade antialérgica de plantas. Alguns exemplos são: desgranulação de mastócitos induzida pelo composto 48/80 *in vitro*, o qual age por via não imunológica levando ao aumento do cálcio intracelular; ou indução da desgranulação de mastócitos *in vitro* pela sensibilização com o anticorpo IgE. Tem-se descrito em literatura a atividade inibitória de *Acanthospermum australe* sobre a desgranulação de mastócitos após indução pelo composto 48/80 em modelo *in vitro* (FERREIRA, 2011). Já a espécie *Cleodendrum petasites* inibiu a desgranulação de mastócitos através da sensibilização com o anticorpo IgE em modelo *in vitro* (CORRÊA *et al.*, 2008). Neste trabalho foi utilizado o modelo de indução de

desgranulação de mastócitos pela via imunológica, *ex vivo*, modelo que foi utilizado devido a presença de um grande número de mastócitos presentes nas membranas do mesentério. Este modelo pode ser utilizado para o estudo da atividade de plantas e produtos naturais (CRUZ *et al.*, 2008).

#### 6.2.4 Avaliação da atividade do extrato bruto das folhas de *Vernonia crotonoides* sobre a inibição da desgranulação nos mastócitos

Foi observado que os grupos tratados com o extrato bruto de VC apresentaram efeito inibitório sobre a desgranulação dos mastócitos. Avaliou-se também se este efeito era dependente da concentração utilizada. Para isso, além da concentração 0,5 mg/mL, foram utilizadas as concentrações 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL. Foi observado que o tratamento com o extrato de VC não foi concentração-dependente. De acordo com o gráfico pode-se observar que se obteve  $79 \pm 1,4\%$ ;  $84 \pm 8,4\%$  e  $78 \pm 2,8\%$  de mastócitos desgranulados para os tratamentos com as concentrações de 0,5; 0,25 e 0,125 mg/mL do extrato de *Vernonia crotonoides* respectivamente. O grupo controle positivo apresentou  $97 \pm 1,4\%$  de mastócitos desgranulados. O grupo tratado com quercetina apresentou  $5 \pm 4,2\%$  de desgranulação, comprovando sua atividade inibitória na desgranulação de mastócitos (gráfico 5).



**Gráfico 5.** Curva concentração dependente do extrato bruto de *Vernonia crotonoides*. Mastócitos de mesentério de rato Wistar foram sensibilizados com IgE anti-DNP (0,001mg/mL), tratados com os extratos em diferentes concentrações ( 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL) de *Vernonia crotonoides* e desafiados com DNP (0,0001mg/mL). O percentual de mastócitos desgranulados foi avaliado em microscópio óptico corando-se as células com azul de Toluidina. Os controles foram: não sensibilizado e tratado com PBS (controle Negativo de desgranulação), sensibilizado e não tratado (controle positivo de desgranulação) e Quercetina (QE). \*  $p < 0,01$  , \*\*  $p < 0,005$  em relação ao grupo controle positivo de desgranulação (-). Média  $\pm$  DP (n=2).

Os terpenóides denominados de lactonas sesquiterpênicas são os compostos característicos da família Asteraceae (DELBÓN *et al.*, 2012). No gênero *Vernonia* a presença de terpenóides e flavonóides está relacionada a atividade anti-inflamatória. Diversos estudos têm demonstrado a atividade anti-inflamatória e antitumoral da subfração química diclorometano obtida através das folhas e inflorescências do gênero *Vernonia* (PAGNO *et al.*, 2006). Estudos biológicos de extratos brutos da espécie *Bidens pilosa* (família Asteraceae) demonstraram diversas propriedades biológicas, sendo que uma maior atividade antialérgica foi observada pelo teste de indução da liberação de histamina *in vitro* (HORIUCHI, 2009).

Acerca da atividade antialérgica de substâncias naturais, observou-se que os flavonóides são metabólitos secundários que apresentam diferentes funções biológicas. Estes compostos químicos atuam na estabilização membranas de mastócitos (MENGYING *et al.*, 2014). O flavonóide silimarina presente nos frutos de *Silybum marianum* (Asteraceae), inibe a produção e liberação de mediadores anti-inflamatórios como os metabólitos do ácido araquidônico (leucotrienos e prostaglandinas) em modelos *in vitro* (CORREA *et al.*, 2008). Sendo o gênero *Vernonia* pertencente a esta mesma família, pode-se sugerir que o efeito da inibição da desgranulação de mastócitos observada neste trabalho pode estar relacionado com a presença dos flavonóides na espécie VC.

Com base nos resultados aqui apresentados, pode-se sugerir testes futuros de avaliação da possível atividade inibitória dos diferentes extratos de plantas estudados sobre a liberação de histamina por mastócitos peritoneais de ratos, *in vitro* e a avaliação da desgranulação de mastócitos, em modelo de anafilaxia passiva cutânea *in vivo*.

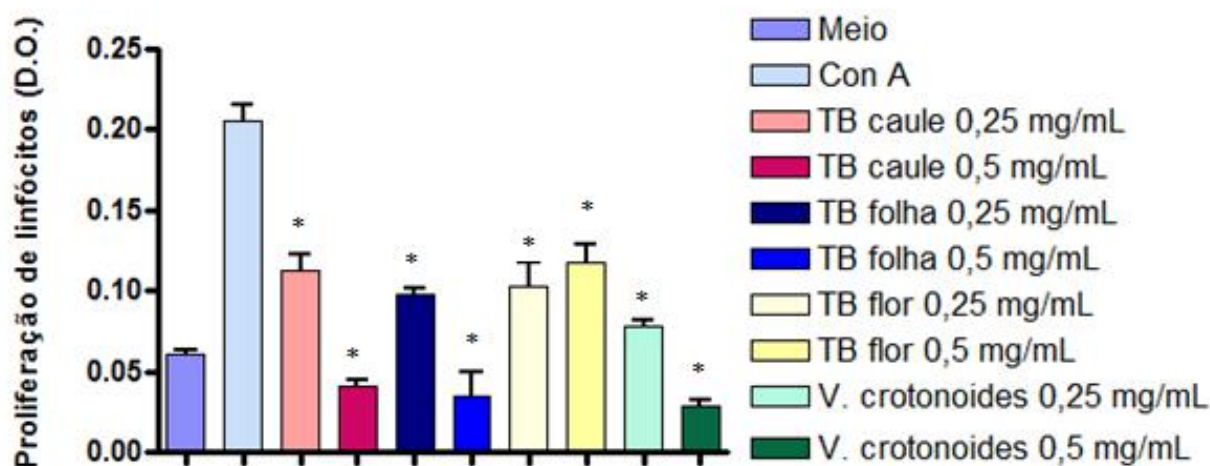
### **6.3 Avaliação da proliferação de linfócitos**

Para avaliar se os extratos das plantas aqui estudadas apresentariam atividade inibitória sobre outro tipo celular, o linfócito, importante no desenvolvimento das respostas alérgicas, foi utilizado no ensaio de linfoproliferação *in vitro*. Este ensaio foi realizado através do método colorimétrico com MTT, o qual se baseia na conversão do sal de tetrazólio solúvel (coloração amarela), por redutases (NADH-

MTT oxido-redutase), formando precipitados de cristais de formazan insolúveis (coloração púrpura) (PECK, 1985; GOMEZ-FLORES *et al.*, 1995).

Após o tratamento com os extratos brutos de todas as espécies vegetais foi possível observar a inibição da proliferação de linfócitos (gráfico 6), apresentando valor estatístico  $P < 0,001$ . Os extratos de TB (caule, flor e folha) apresentaram valores de  $62,7 \pm 16,5$  e  $141,6 \pm 5,5$ ;  $73,3 \pm 22$  e  $57,7 \pm 18,8$ ;  $79,4 \pm 5,5$  e  $148,8 \pm 22$ , nas concentrações de  $0,25 \text{ mg/mL}$  e  $0,5 \text{ mg/mL}$  respectivamente. Já o extrato bruto de VC na concentração de  $0,5 \text{ mg/mL}$  foi o que apresentou maior inibição da proliferação de linfócitos. Esta espécie vegetal apresentou  $101,1 \pm 6,2$  e  $156,1 \pm 5,5$  para as concentrações de  $0,25 \text{ mg/mL}$  e  $0,5 \text{ mg/mL}$  respectivamente de inibição da linfoproliferação em relação ao grupo controle positivo que apresentou  $40,5 \pm 14,9$ . Provavelmente, esse resultado para VC pode estar associado a diferentes substâncias bioativas presentes neste extrato, tais como alcaloides, saponinas, taninos, fenóis, flavonóides e outras, que podem estar agindo isoladamente ou conjuntamente (GEMECHU *et al.*, 2013).

A capacidade de inibição da proliferação de linfócitos foi concentração dependente para todos os tratamentos com extratos brutos exceto para o tratamento com a TB flor.



**Gráfico 6.** Teste de proliferação de linfócitos. Células de linfonodos inguinais de camundongos suíços foram cultivadas com os extratos brutos das plantas *Tocoyena bullata* (caule, folha e flor) e *Vernonia crotonoides* (VC) nas concentrações de  $0,25 \text{ mg/mL}$  e  $0,5 \text{ mg/mL}$  durante 48 hrs. A proliferação foi avaliada através do ensaio com MTT em relação ao controle de proliferação máxima (Con A  $2,5 \mu\text{g/mL}$ ). Média  $\pm$ D.P, análises estatísticas por comparação com o controle Con A \* $P < 0,001$ .



Esse foi um ensaio preliminar para avaliação de uma possível atividade imunossupressora dos extratos brutos de VC e TB. Tais atividades podem estar relacionadas a substâncias bioativas presentes no gênero *Tocoyena* como os triterpenóides, uma vez que esta substância química apresenta atividade imunossupressora já relatada na literatura (MENGYING *et al.*, 2014). Já na espécie VC essa atividade pode estar relacionada com substâncias bioativas como alcaloides, taninos e flavonóides (ROCHA *et al.*, 2007).

Os alcaloides presentes na espécie *Chamomolla recutita* da família Asteraceae inibiram a expansão da população de linfócitos no ensaio por avaliação de citometria de fluxo em modelo *in vitro* (JUNIOR *et al.*, 2006).

Em modelos *in vitro* utilizando-se cultura de células foi observado que os flavonóides presentes na família Asteraceae atuam modulando células envolvidas com a inflamação (inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró- inflamatórias (por exemplo, TNF- $\alpha$  e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipooxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (COUTINHO *et al.*, 2009). É possível sugerir que a presença desses compostos no extrato bruto de VC pode ter promovido a inibição da linfoproliferação.

## 7 CONCLUSÕES

- ✓ Os extratos brutos das espécies vegetais *Tocoyena bullata* (caule, folha e flor) e *Vernonia crotonoides* (folhas) não apresentaram citotoxicidade nas concentrações de 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL.
- ✓ Os extratos brutos das folhas, caule e flor de *Tocoyena bullata* e das folhas de *Vernonia crotonoides* inibiram significativamente a desgranulação de mastócitos *ex vivo*.
- ✓ Os extratos brutos de *Tocoyena bullata* e *Vernonia crotonoides* foram capazes de inibir a proliferação de linfócitos *in vitro* nas concentrações de 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL, de forma concentração dependente (exceto para TB flor).
- ✓ Torna-se necessário a avaliação fitoquímica e fracionamento bioquímico para avaliar possíveis substâncias químicas associadas a atividade biológica.
- ✓ Através dos resultados inéditos obtidos neste trabalho fica evidente o quão promissora são as espécies vegetais *Tocoyena bullata* e *Vernonia crotonoides* obtidas na Restinga de Jurubatiba, confirmando a importância dos estudos envolvendo produtos naturais oriundos desta região.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. e PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier, ed. 6ª, 2008.

AKDIS, M. e AKDIS, C.A. **Mechanisms off allergen-specific immunotherapy: Multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens**, v.133, p. 621-631, 2013.

CORREA, M.F., MELO, O.G., COSTA, S.S. **Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma**, v. 18, p. 247-252, 2008.

COSTA, J. G. M. **Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de Lantana camara L. e Lantana sp.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 3, p. 710-714, 2009.

COUTINHO, A.S., MUZITANO, M.F., COSTA, S.S. **Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório**, v.1, n.3, p. 241-256, 2009.

CRUZ, E.A., DA-SILVA, S.A.G., MUZITANO, M.F., SILVA, P.M.R., COSTA, S.S. e ROSSI-BERGMANN, B. **Immunomodulatory pretreatment with Kalanchoe pinnata extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock**, v.8, p. 1616-1621, 2008.

DELBÓN, N., COSA, M.T. e BERNARDELLO, G. **Exomorfología y anatomia de órganos vegetativos aéreos en especies de *Flourensia* DC. (Asteraceae) con importância fitoquímica**, v.1, p. 2- 10, 2012.

DEMOLY, P., CHIRIAC, A.M., BERGE, B. e ROSTIN, M. **Reasons for prescribing second generation antihistamines to treat allergic rhinitis in real-life conditions and patient response**, v.10, p. 1-9, 2014.

ERDOGAN, B.A., SANLI, A., PAKSOY, M., ALTIN, G. e AYDIN, S. **Quality of life in patients with persistent allergic rhinitis treated with desloratadine**

**monotherapy or desloratadine plus montelukast combination**, v.24, p. 217-224, 2014.

FARHADI, L., MOTLAGH, H.M., SEYFI, P. e MOSTAFAIE, A. **Low Concentrations of Flavonoid – Rich Fraction of Shallot Extract Induce Delayed – Type Hipersensitivity and TH1 Cytokine IFN $\gamma$  Expression in BALB/c Mice**, v.3, n.1, p. 1-10, 2014.

FERREIRA, T.L. **Prospecção de inibidores da secreção de histamina a partir de espécies vegetais do Cerrado e da Mata Atlântica**. 2011. 81 f. Tese Mestrado. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011.

FRANSEN, P.M., KROHN, I.J.M.K., HOFFMANN, H.J. e SCHIOTZ, P.O. **The Influence of IgE on Cultured Human Mast Cells**, v.5, p. 409-414, 2013.

GAUVREAU, G.M., O'BYRNE, P.M., BOULET, L.P., WANG, Y., COCKCROFT, D., BIGLER, J., FITZGERALD, J.M., BOEDIGHEIMER, M., DAVIS, B.E., DIAS, C., GORSKI, K.S., SMITH, L., BAUTISTA, E., COMEAU, M.R., LEIGH, R. e PARNES, J.R. **Effects of an Anti-TSLP Antibody on Allergen-Induced Asthmatic Responses**, v.370, p. 2102-2110, 2014.

GEMECHU, A., GIDAY, M., WORKU, A., AMENI, G. In vitro anti-mycobacterial activity of selected medicinal plants against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 291, p. 1-6, 2013.

GOMEZ-FLORES, R., GUPTA, S., TAMEZ-GUERRA, R. e MEHTA, R.T. Determination of MIC's for *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 7, p. 1842-1846, 1995.

GUIMARÃES, D.O., BORGES, W.S., KAWANO, C.Y., RIBEIRO, P.H., GOLDMAN, G.H., NOMIZO, A., THIEMANN, O.H., OLIVA, G., LOPES, N. e PUPO, M.T.

**Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia***, v.52, p.134-144, 2008.

HARVIMA, I.T., SCHAFFER, F.L., DRABER, P., FRIEDMAN, S., POLAKOVICOVA, I., GIBBS, B.F., BLANK, U., NILSSON, G. e MAURER, M. **Molecular targets on mast cells and basophils for novel therapies**, 2014.

HATTORI, M., MIZUGUCHI, H., BABA, Y., ONO, S., NAKANO, T., ZHANG, Q., SASAKI, Y., KOBAYASHI, M., KITAMURA, Y., TAKEDA, N. e FUKUI, H. **Quercetin inhibits transcriptional up-regulation of histamine H<sub>1</sub> receptor via suppressing protein kinase C- $\delta$ / extracellular signal-regulated kinase/poly (ADP-ribose) polymerase-1 signaling pathway in HeLa cells**, v.15, p. 232-239, 2013.

HOCAGLU, A.B., KARAMAN, O., ERGE, D.U., ERBIL, G., YILMAZ, O., KIVCAK, B., BAGRIYANIK., H.A. e UZUNER, N. **Effect of Hedera Helix on Lung Histopathology in Chronic Asthma**, v.11, p. 316-323, 2012.

HORIUCHI, M. Improvement of the anti-inflammatory and antiallergic activity of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Scherff treated with enzyme (cellulosine). **Journal Ethnopharmacology**, v. 122, p. 379-383, 2009.

IZGI, C., CEVIK, C. e NUGENT, K. **Severe myocardial ischemia after concentrated epinephrine use for the treatment of anaphylaxis: Kounis syndrome or epinephrine effect?**, v.39, n. 2, p. 160-163, 2010.

JUNIOR, C.M.J., FLORÃO, A., MATTANA, F.V.R., ROCHA, F.H., SANTOS, A.M.W. **A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais**, v.16, p. 250-255, 2006.

JUTEL, M. **Allergen-Specific Immunotherapy in Asthma**, v.1, p. 213-219, 2014.

KIM, H.H., PARK, S.B., LEE, S., KWON, T.K., SHIN, T.Y., PARK, P.H., LEE, S.H. e KIM, S.H. **Inhibitory effect of putranjivain A on allergic inflammation through suppression of mast cell activation**, v.274, p.455-461, 2013.

KIM, M., LIM, S.J., KANG, S.W., UM, B.H. e NHO, C.W. ***Aceriphyllum rossii* Extract and Its Active Compounds, Quercetin and Kaempferol Inhibit IgE-mediated Mast Cell Activation and Passive Cutaneous Anaphylaxis**, v.62, p. 3750-3758, 2014.

LEE, C.S., JEONG, E.B., KIM, Y.J., LEE, M.S., SEO, S.J., PARK, K.H. e LEE, M.W. **Quercetin-3-O-(2''-galloyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside inhibits TNF- $\alpha$ -activated NF- $\kappa$ B-induced inflammatory mediator production by suppressing ERK activation**, v.16, p. 481-487, 2013.

MACHADO, T.B., LEAL, I.C.R., KUSTER, R.M., AMARAL, A.C.F., KOKIS, V., SILVA, M.G. e SANTOS, K.R.N. **Brazilian Phytopharmaceuticals – Evaluation Against Hospital Bacteria**, v.19, p. 519-525, 2005.

MENGYING, L.V., PING, X.U., YUAN, T. **Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Dictamnus* (Rutaceae)**, v.171, p. 247-263, 2014.

OGASAWARA, H., ASAKURA, K., SAITO, H. e KATAURA, A. **Role of CD4-Positive T Cells in the Pathogenesis of Nasal Allergy in the Murine Model**, v.118, p. 37-43, 1999.

OLIVEIRA, F.M.A., MEIRELLES, S.T. e SALATINO, A. **Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss**, v.4, p. 431-439, 2003.

PECK, R. A One-Plate Assay for Macrophage Bactericidal. **Journal of Immunological Methods**, v. 82, p. 131-140, 1985.

ROCHA, G.G., SIMÕES, M., LÚCIO, K.A., OLIVEIRA, R.R., KAPALN, M.A.C., GATTAS, C.R. **Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 7355-7360, 2007.

SALUJA, R., KETELAAR, M.E., HAWRO, T., CHURCH, M.K., MAURER, M. e NAWIJN, M.C. **The role of the IL-33/IL-1 RL1 axis in mast cell and basophil activation in allergic disorders**, 2014.

THURMOND, R.L., GELFAND, E.W. e DUNFORD, P.J. **The role off histamine H<sub>1</sub> and H<sub>4</sub> receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines**, v.7, p. 41-53, 2008.

URRA, J.M., CARRASCO, P., FEO-BRITO, F., ROCA, F.D.L., GUERRA, F. e CABRERA, C.M. **Immunotherapy Reduces CD40L Expression and Modifies Cytokine Production in the CD4 Cells of Pollen Allergy Patients** , v. 24, p. 98-105, 2014.

VON POSER, G.L; SEIBT, L.T. **Gardenoside from *Tocoyena bullata***, *Biochem.Systemat Ecol*, v. 26, p. 669-670, 1997.

WENG, Z., ZHANG, B., ASADI, S., SISMANOPOULOS, N., BUTCHER, A., FU, X., KATSARI, A.K., ANTONIOU, C. e THEOHARIDES, T.C. **Quercetin Is More Effective than Cromolyn in Blocking Human Mast Cell Citokyne Release and Inhibits Contact Dermatitis and Photosensitivity in Humans**, v. 7, p.1-10, 2012.

WU, L.C. e ZARRIN, A.A. **The production and regulation of IgE by the immune system** , v. 14, p. 247-257, 2014.

YU, S., KIM, H.Y., CHANG, Y.J., DEKRUYFF, R.H. e UMETSU, D.T. **Innate lymphoid cells and asthma**, v. 133, n. 4, p. 943-950, 2014.