

Ministério da saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

“Estudo dos efeitos dos extratos de *Nidularium procerum* Lidman no modelo de inflamação alérgica pulmonar em camundongos.”

Alessandra Mendonça Siqueira

Rio de Janeiro

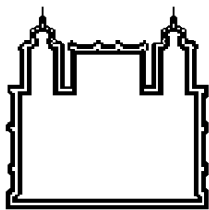
2008

TESE MBCM – IOC A.M. SIQUEIRA 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Alessandra Mendonça Siqueira

“Estudo dos efeitos dos extratos de *Nidularium procerum* Lidman no modelo de inflamação alérgica pulmonar em camundongos.”

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Biologia Celular e Molecular.

Orientações: Prof. Dr.: Valber da Silva Frutuoso

Prof. Dr^a.: Kátia Costa de Carvalho Sabino

Rio de Janeiro

2008

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ – RJ

S618

Siqueira, Alessandra Mendonça

Estudo dos efeitos dos extratos de *Nidularium procerum* Lidman no modelo de inflamação alérgica pulmonar em camundongos / Alessandra Mendonça Siqueira. – Rio de Janeiro, 2008.

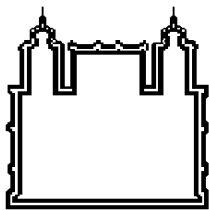
xvi, 63 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2008.

Bibliografia: f. 52-63

1. Produtos naturais. 2. Antialérgico. 3. *Nidularium procerum*. I. Título.

CDD 547 7



Ministério da saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Alessandra Mendonça Siqueira

“Estudo dos efeitos dos extratos de *Nidularium procerum* Lidman sobre no modelo de inflamação alérgica pulmonar em camundongos.”

Orientadores: Prof. Dr.: Valber da Silva Frutuoso

Prof. Dr^a.: Kátia Costa de Carvalho Sabino

Aprovada em: 22/09/2008

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a.: Adriana Ribeiro Silva

Prof^a Dr^a.: Marsen Garcia Pinto Coelho

Prof Dr.: Jorge Carlos Santos da Costa

Prof^a Dr^a.: Patrícia Alves Reis (Suplente)

Prof^a Dr^a.: Adriana Vieira de Abreu (Suplente)

Rio de Janeiro, ---- de ----- de 2008.

Agradecimentos

À Deus, por tudo que é na minha vida, pelas suas misericórdias e pelo seu imenso amor, por minha família e por aqueles que estão ao meu redor. Obrigada Senhor, por que quando elevei meus olhos a Ti, perguntando de onde me virá o socorro, Tu me disseste: O teu socorro vem de Mim. Á Ele toda Honra, toda Glória, e todo Louvor.

À minha família, especialmente aos meus pais, pelo apoio, nessa minha jornada. Não tenho palavras para agradecer tudo que vocês fazem por mim. Amo muito vocês.

Aos meus orientadores Dr. Valber da Silva Frutuoso e Dr^a Kátia Costa de Carvalho Sabino, por terem me permitido realizar esta dissertação em seus laboratórios e pela imensa paciência.

Ao Dr. Hugo Castro de Faria Neto e Dr^a. Patrícia Torres Bozza, por terem me permitido ingressar no laboratório e realizar este trabalho.

A todos os componentes do laboratório de Imunofarmacologia, em especial a galera dos produtos naturais, pelas dicas e pela ajuda preciosa durante este trabalho. Aos que já saíram ou se afastaram como Diogo e Renata, que me renderam uma ótima amizade. Ao Fábio Amendoeira, que me ajudou muito nos meus primeiros passos no laboratório.

A Dr^a. Maria Raquel Figueiredo e a MSe. Cristiane Cardoso dos Santos do laboratório de produtos naturais 3, em Farmanguinhos, pela colaboração e fornecimento dos extratos de *Nidularium procerum*. Muito obrigada e desculpas por tudo.

Ao laboratório de Inflamação, pelas dicas com os experimentos, por prontamente esclarecerem muitas dúvidas que tive.

Ao José Augusto, por ter me permitido abrigar meus animais no biotério do seu departamento, e às pessoas que cuidaram dos animais.

Aos meus amigos do LIA-BPPN, que me acompanham desde a graduação e continuaram ajudando durante o mestrado. À Dr^a. Marsen Garcia P. Coelho, aos técnicos, à galera, enfim a todos vocês, muito obrigada pela amizade.

Aos meus amigos, pela força, carinho e companheirismo.

À pós-graduação de Biologia Celular e Molecular, pelo ensino e apoio. A secretária Daniele Lobato e ao coordenador Dr. Milton Moraes, pela competência com relação aos alunos.

À CAPES, UERJ, FINEP, Fiocruz e as instituições de fomento, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para esse trabalho.

Que Deus abençoe a todos vocês, e mais uma vez muito obrigada!!!!

Um ao outro ajudou, e ao seu companheiro disse: Esforça-te. Isaías 41:6.

“Onde não há conselho fracassam os projetos, mas com os muitos conselheiros há bom êxito”.

Provérbios 15:22

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1 Classificação taxonômica de <i>Nidularium procerum</i> .	12
Tabela 2 Índices de inibição do extrato aquoso sobre a produção de citocinas por esplenócitos reestimulados <i>in vitro</i> com ovalbumina.	38
Tabela 3 Índices de inibição do extrato etanólico sobre a produção de citocinas por esplenócitos reestimulados <i>in vitro</i> com ovalbumina.	38
Tabela 4 Índices de inibição do extrato hidroalcoólico sobre a produção de citocinas por esplenócitos reestimulados <i>in vitro</i> com ovalbumina.	38

Lista de Figuras

		Página
Figura 1	Distribuição geográfica da família Bromeliaceae.	11
Figura 2	Distribuição geográfica do gênero <i>Nidularium</i> no Brasil.	12
Figura 3	<i>Nidularium procerum</i> .	12
Figura 4	Análise dos efeitos do extrato aquoso de <i>Nidularium procerum</i> na inflamação alérgica pulmonar.	22
Figura 5	Análise dos efeitos dos extratos aquoso, etanólico e hidroalcoólico de <i>Nidularium procerum</i> no lavado broncoalveolar.	24
Figura 6	Análise dos efeitos dos extratos aquoso, etanólico e hidroalcoólico de <i>Nidularium procerum</i> no sangue.	25
Figura 7	Análise dos efeitos dos extratos aquoso, etanólico e hidroalcoólico de <i>Nidularium procerum</i> na medula.	27
Figura 8	Efeito da dexametazona na proliferação de esplenócitos	28
Figura 9	Efeito da concentração de ovalbumina na proliferação de esplenócitos de camundongos Balb/C.	29
Figura 10	Comparação da proliferação espontânea de esplenócitos de animais submetidos a diferentes protocolos de sensibilização e aerolização.	30
Figura 11	Efeito do extrato aquoso de <i>Nidularium procerum</i> na atividade redutora mitocondrial e proliferação de esplenócitos.	31
Figura 12	Efeito do extrato etanólico de <i>Nidularium procerum</i> na atividade redutora mitocondrial e proliferação de esplenócitos.	32
Figura 13	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Nidularium procerum</i> na atividade redutora mitocondrial e proliferação de esplenócitos.	33
Figura 14	Efeito do etanol em esplenócitos não estimulados com ovalbumina.	35
Figura 15	Efeito do etanol nas células reestimuladas <i>in vitro</i> com ovalbumina.	36
Figura 16	Perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato aquoso de <i>Nidularium procerum</i> .	40

Figura 17	Perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato etanólico de <i>Nidularium procerum</i> .	40
Figura 18	Perfil químico por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato hidroalcoólico de <i>Nidularium procerum</i> .	41

Lista de siglas e abreviaturas

5-Lo	5-Lipoxigenase
AAS	Ácido acetil salicílico
Ag	Antígeno
AHR	Hiperreatividade das vias aéreas
Al(OH) ₃	Hidróxido de alumínio
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AP-1	Ativador de proteína 1
APC	Células apresentadoras de antígeno
ARM	Atividade redutora mitocondrial
BAL	Lavado bronco alveolar
CCL	Ligante de quimiocinas
CCR	Receptores de quimiocinas
CD	"Cluster Designation", que seguido de um número, determina diferentes moléculas ou arranjo das mesmas na superfície das células
CisLT	Cisteinil leucotrienos
CisLTR1	Receptor 1 de cisteinil leucotrienos
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COX ₂	Ciclooxigenase 2
cpm	Contagem por minuto
DC	Células dendríticas
Dexa	Dexametazona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DPM	Desvio Padrão da Média
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
EAFNp	Extrato aquoso de folhas de <i>Nidularium procerum</i>
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
ED ₅₀	Dose que produz efeito terapêutico em 50% dos indivíduos
EDN	Neurotoxina derivada de eosinófilo
ELISA	Ensaio imunoenzimático indireto
EPO	Peroxidase eosinofílica
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade

fMLP	Formil-Metionina-Leucina-Penilalanina
Fox P3	"Forkhead box" P3
GATA	Proteína 3 que se liga a sequência genética "GATA"
GM-CSF	Fator de estimulação de colônia granulócito/macrófago
H	Receptores de histamina
i. p.	Via intraperitoneal
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IRF	Fator de regulação 1 de interferon
LABA	Agonistas de receptor β_2 de vida longa
LPS	Lipolissacarídeo
LT	Leucotrieno
MBP	Proteína básica maior
MCP	Proteína quimioatratora de monócito
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MTT	Brometo 3(4,5- dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NK	Células matadoras naturais, do inglês "natural killers"
NpAq	Extrato aquoso de <i>Nidularium procerum</i>
NpEt	Extrato etanólico de <i>Nidularium procerum</i>
NpHa	Extrato hidroalcoólico de <i>Nidularium procerum</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVA	Ovalbumina
PAF	Fator de ativação de plaqueta
PDE	Fosfodiesterase
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PKA	Proteína quinase A
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
RANTES	Regulada sob ativação, normalmente expressa e secretada por células T normais, do inglês, "Regulated on activation, normal T expressed and secreted".
rpm	Rotações por minuto
SABA	Agonistas de receptor β_2 de vida curta

SCIT	Imunoterapia subcutânea
SIT	Imunoterapia alérgeno específico
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- β	Fator β de crescimento e transformação
T _h	Células T ajudadoras, do inglês "helper"
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TR	Tempo de retenção
T _{reg}	Células T regulatórias
TXA ₂	Tromboxano A ₂
TXS ₁	Tromboxano sintase
VCAM	Moléculas de adesão a células vasculares

Glossário de termos botânicos

Arbustos: Plantas com caule de tamanho médio, inferior a 5 metros, resistente e lenhoso na parte inferior, e tenro e suculento na parte superior, sem um tronco predominante, por que ramifica a partir da base.

Brácteas: Estruturas foliáceas associadas às inflorescências das Angiospermas, com função original de proteger a inflorescência ou as flores em desenvolvimento.

Capítulo: Tipo de florescência, com flores usualmente diminutas, sésseis e inseridas em um eixo principal que alarga-se no ápice formando um receptáculo discóide ou globoso.

Espécie tipo: Espécie representante do grupo.

Epífita: Plantas que se apóiam em outro vegetal para obter mais luz e ventilação.

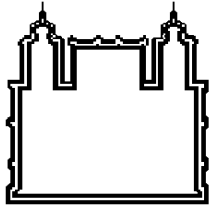
Folhas enciformes: Folhas em forma de espada.

Inflorescência: Agrupamentos de flores que em geral se inserem sobre o mesmo eixo.

Roseta: Arranjo circular de folhas, com todas em uma única altura. Embora as rosetas usualmente fiquem perto do solo, suas estruturas são um exemplo de um caule modificado.

Sub-bosque: Região abaixo das copas das árvores (dossel), onde crescem arbustos e tufos de mato. Nas florestas equatoriais o dossel espesso permite a passagem de alguns poucos feixes de luz, de modo que o sub-bosque contém relativamente pouca vegetação, com solo estéril e coberto por um tapete de folhas e plantas em decomposição.

Xerófitas: São plantas adaptadas ao clima seco. Estas adaptações podem ser: Caules carnudos para armazenagem de água, folhas menores e cobertas com cera para evitar a evaporação, além de raízes longas. Dentre outras adaptações.



Ministério da saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

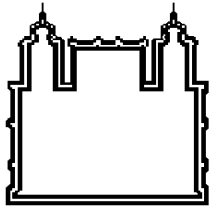
Estudo dos efeitos dos extratos de *Nidularium procerum* Lidman no modelo de inflamação alérgica pulmonar em camundongos.

RESUMO

Dissertação de mestrado

Alessandra Mendonça Siqueira

A asma é uma desordem de carácter alérgico que vem atingindo muitas pessoas por todo mundo. Embora existam muitos tratamentos para essa doença, novas terapias são necessárias, pois muitos dos tratamentos típicos causam efeitos colaterais para o paciente. *Nidularium procerum* (Np) é uma Bromeliaceae, localizada principalmente no estado do Rio de Janeiro. Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a *Nidularium procerum*, possui atividade antialérgica, antiinflamatória e antinociceptiva. Mas como o tratamento foi principalmente por via i. p., o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos extratos aquoso, etanólico e hidroalcoólico de Np na resposta alérgica por via oral. Quando analisamos os extratos no modelo de inflamação alérgica pulmonar observamos que todos foram capazes de inibir significativamente a migração de eosinófilos para a cavidade pulmonar, mas o extrato etanólico foi o que induziu um efeito mais pronunciado (77%). Quando analisamos o sangue desses animais, observamos que os extratos de *N. procerum* não alteraram a migração de nenhum tipo celular nos animais tratados, em relação aos animais não tratados, entretanto, os eosinófilos, embora tenham variado muito, apresentaram uma tendência a diminuição (33%) nos animais tratados com o extrato etanólico de *N. procerum*. Não houve mudança no perfil celular na medula nos animais tratados com *N. procerum* em relação aos não tratados. Quando realizamos cultura de esplenócitos de animais sensibilizados, reestimulados *in vitro* com OVA, observamos que o extrato etanólico foi o que mais inibiu (90%), a proliferação e a sobrevivência das células assim como foi capaz de inibir a produção e/ou liberação de algumas das citocinas analisadas como IL-4 e IL-10, sendo ainda mais potente que a dexametasona. Com relação ao extrato aquoso, foi observado que, surpreendentemente, o mesmo estimula a proliferação dos esplenócitos, e que o extrato hidroalcoólico apresentou um efeito intermediário entre os extratos etanólico e aquoso. Também verificamos que esse efeito não foi dependente de etanol. Esses dados mostram que *N. procerum*, em especial seu extrato etanólico, pode ser um bom candidato ao desenvolvimento de um fármaco antialérgico.



Ministério da saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Estudo dos efeitos dos extratos de *Nidularium procerum* Lidman no modelo de inflamação alérgica pulmonar em camundongos.

ABSTRACT

Dissertação de mestrado

Alessandra Mendonça Siqueira

Asthma is an allergic disorder that has increased incidence worldwide. Although many treatments are available, new therapies are necessary, because most of them cause strong side-effects to the patients. *Nidularium procerum* is a Bromeliaceae, localized mainly in Rio de Janeiro state. Studies performed in our laboratory have demonstrated that i. p. treatment of mice with *N. procerum*, inhibited allergy, inflammation and nociception. But as the treatment was i. p., the objective of this work was to evaluate the anti-allergic properties, of *N. procerum* aqueous, ethanolic and hidroalcoholic extracts, when administrated by oral route. When we analyzed the *N. procerum* extracts in a pulmonary allergic inflammation model, we could observe that all extracts were able to inhibit eosinophils migration to lungs, and that the ethanolic extract induced better effects than the aqueous and hidroalcoholic extracts (70%). Analyzing the blood, we saw that the *N. procerum* extracts did not change the leucocytes migration in relation to non treated animals. However, the eosinophils had varied from mice to mice, we could observe an inhibition tendency provided by ethanolic extract (33%). There was no change in bone marrow cells profile in *N. procerum* extracts treated animals in relation to untreated ones. When spleenocytes from sensitized animals, were restimulated *in vitro* with OVA and treated with *N. procerum* extracts, we could notice that the ethanolic extract was the most potent extract, decreasing (90%) the spleenocytes proliferation and surviving. Indeed, it reduced some cytokines release like IL-4 and IL-10. This effect was greater than dexametasone. It was observed aqueous extract stimulated the spleenocytes proliferation and the hidroalcoholic extract presented intermediate effects between ethanolic and aqueous extract. We verified that this inhibitory effect was not due to ethanol. Taking these observations we can suggest that *N. procerum*, especially the ethanolic extract, is a good candidate for a future anti-allergic therapy.

1- Introdução

1.1- Alergia

Reações alérgicas são respostas sintomáticas a um antígeno ambiental normalmente inócuo. Doenças alérgicas são altamente indivíduo-específicas e incluem asma, rinoconjuntivite, sinusite, alergia a alimento, drogas e/ou picadas de insetos, dermatite atópica, angioedema, urticária, e anafilaxia, todas essas podendo ocorrer sozinhas ou associadas (Holgate e Polosa, 2008).

O recente aumento de doenças alérgicas tem sido descrito como epidemia em muitas partes do mundo, e tem aumentado em associação com a vida ocidental. Neste contexto, podemos destacar em especial as doenças respiratórias, que representam um grave problema de saúde pública em todo o mundo e vem crescendo gradativamente, tendo este aumento nos últimos 20 anos atingido 40% em alguns países. Nos países industrializados essas doenças afetam mais de 5% da população (Umetsu e cols., 2002). No Brasil, a asma mata aproximadamente oito pessoas por dia, e é responsável por dois mil e quinhentos óbitos ao ano. Dados do Sistema Único de Saúde (SUS) revelam que a cada ano mais de 367 mil brasileiros dão entrada nos hospitais vitimados pelo problema. Aproximadamente 12% de todas as autorizações de internação hospitalar do SUS acontecem por diagnósticos de asma, pneumonia e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), o que representa gastos superiores a R\$ 600 milhões por ano aos cofres públicos, gastos estes, superiores aos da tuberculose e da Aids. A asma constitui-se assim, em um dos mais graves problemas de saúde pública para o Brasil. As razões dessa epidemia são pouco conhecidas (<http://portal.saude.gov.br>).

A asma é considerada uma doença inflamatória crônica dos pulmões caracterizada por uma sensibilidade aumentada ao estímulo (como a inalação de um alérgeno) que induz broncoconstrição. Sua etiologia é multifatorial, ou seja, envolve a interação de fatores genéticos e ambientais. A broncoconstrição é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, contração do músculo liso, grande eosinofilia tecidual, aumento na produção de muco pelas células globet com obstrução das vias aéreas. Perda do epitélio de superfície, espessamento da membrana basal, hipertrofia da musculatura lisa e aumento da massa das glândulas submucosas, são também, achados anátomos-patológicos importantes no quadro asmático (Busse e cols., 2001).

No quadro asmático a resposta inflamatória alérgica é precedida por uma reação de sensibilização do indivíduo com quantidades diminutas do alérgeno solúvel intacto na superfície mucosa do trato respiratório, favorecendo a captação deste alérgeno por células apresentadoras de antígeno (APC). Estes, por sua vez, são processados no compartimento endossomo-lisossomal e apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHCII). Ao mesmo tempo em que o antígeno (Ag) está sendo apresentado ocorre a estimulação das APCs para expressarem altos níveis de moléculas co-estimuladoras, tais como as proteínas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que enviam segundos sinais para a ativação da célula T através da ligação ao CD28. Ativadas, as células T passam a expressar CD40L, o qual se liga ao CD40 nas APCs, contribuindo para a ativação destas células. Além disso, ligantes de quimiocinas (CCL) como CCL19 e CCL21, interagem com receptor de quimiocinas (CCR) CCR7, nas APCs, direcionando-as, com o antígeno para os linfonodos drenantes, onde elas podem interagir com as células T “naive” específicas (Marsland e cols., 2005). As células dendríticas (DC) são as principais APC que interagem com o linfócito T, levando à diferenciação dos mesmos em T helper (T_h)1 ou T_h2.

A diferenciação das células T em T_h1 ocorre quando as APCs, estimuladas por produtos microbianos, secretam citocinas tais como interleucina (IL)-12 e interferon gama (IFN- γ). Estas citocinas induzem a expressão do fator de transcrição transdutor de sinal e ativador de transcrição do tipo 4 (STAT 4), estimulando a diferenciação das células T em T_h1. Estas células produzem linfotóxina- α e IFN- γ , que agem sobre os macrófagos estimulando suas funções microbicidas e aumentando a produção de IL-12. A IL-12 estimula a produção adicional de IL-2 pelo T_h1 aumentando a proliferação destas. Essa ativação celular ocorre pela interação CD40L-CD40, entre célula T e APC, repetitivamente, e pela citocina IFN- γ , que estimula a expressão dos fatores de transcrição fator nuclear κ B (NF- κ B) e Ativador de proteína 1 (AP-1), STAT-1 e fator de regulação 1 de interferon (IRF-1). As células T_h1, por seu perfil de secreção de citocinas, são características de doenças autoimunes como artrite reumatóide, diabetes mellitus imunodependente e outras (Dong e cols., 2000).

A diferenciação das células T em T_h2 é induzida principalmente pela IL-4, que ativa o fator de transcrição STAT-6, que conseqüentemente induz a expressão da proteína 3 que se liga a sequência genética “GATA” (GATA3). A IL-4 é produzida não só pelas próprias T_h2, mas também por outros tipos celulares como mastócitos, basófilos e células matadoras naturais (NK) (Dong e cols., 2000). Além da ligação CD40-CD40L, a ligação do CD28 nas células T com a molécula B7-2 nas APCs é essencial para o direcionamento da resposta em T_h2. As células T_h2 efectoras, em contraste com as T_h1, produzem as citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 etc. As citocinas IL-4 e IL-13, promovem a produção de imunoglobulina (Ig)E

(Pawankar e cols. 1997), agem diretamente no epitélio das vias aéreas para induzir hiperreatividade das vias aéreas (AHR) e metaplasia das células globet (Lutz e cols., 2002). A IL-13 também medeia a produção de fator β de crescimento e transformação (TGF- β) pelos macrófagos, transformando fibroblastos em miofibroblastos, alterações estas, cruciais para iniciar o processo de remodelamento das vias aéreas (Davies e cols., 2003). Sabe-se que IL-4, IL-9 e IL-13 recrutam mastócitos e IL-3, IL-5 e GM-CSF ajudam na maturação de eosinófilos ativando-os na função microbicida (combate a helmintos, por exemplo), estando ainda envolvida em reações alérgicas como a asma (Holgate e cols., 2008).

O desbalanço entre as respostas T_{h2} e T_{h1} , tem sido a base do entendimento da resposta imune alérgica por mais de 2 décadas (Romagnani S, 2006). Hoje em dia, a atopia também é caracterizada pelo desbalanço entre T_{h2} e T regulatórias (T_{reg}) (Bacchetta e cols., 2007 e Larché 2007). As T_{reg} , descritas recentemente, são outro tipo de célula T $CD4^+$, que tem participação não só na alergia, como também em outras reações inflamatórias. Estas células são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição “Forkhead box” P3 (Fox P3) e do receptor de IL-2 (CD25) (Wing e cols., 2006). Estudos com camundongos têm revelado a participação das T_{reg} na supressão de reações alérgicas, e tem sido descrito evidências mostrando que estas células também controlam a resposta alérgica em humanos através da secreção das citocinas IL-10 e TGF- β (Maloy e cols., 2003).

Uma vez que um indivíduo é sensibilizado a um alérgeno em particular, o encontro subsequente com o mesmo causa a ligação da IgE ao seu receptor de alta afinidade (Fc ϵ RI), encontrado nos mastócitos e basófilos, para promover a liberação de mediadores presentes nos grânulos. Esses mediadores são responsáveis pela reação alérgica imediata, que ocorre de 1 a 30 min. após o estímulo, junto com a liberação de citocinas e quimiocinas que recrutam macrófagos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e basófilos, o que compreende uma fase mais tardia (6 a 72 horas) (Cockcroft e cols., 2007). Os mediadores autacóides (compostos endógenos que participam na inflamação) como histamina e cisteinil leucotrienos (CisLTs) aumentam a expressão endotelial de P-selectina e E-selectina, para iniciar a adesão e rolamento dos leucócitos, seguida pela expressão de ICAM-1 e VCAM-1, que interagem com os receptores de integrinas para permitir a passagem dos leucócitos entre as células endoteliais, em direção ao espaço perivascular. Quimiocinas, atualmente chamadas de CCL2, CCL8, CCL7 e CCL13, anteriormente conhecidas como proteína quimioatratadora de monócito (MCP) 1 a 4, CCL11, CCL24 e CCL26, que são as eotaxinas 1 a 3 e CCL5 conhecida como RANTES – “Regulated on activation, normal T expressed and secreted”, direcionam e ativam os leucócitos, principalmente os eosinófilos (Palmqvist e cols., 2007), as principais células efetoras da resposta inflamatória alérgica.

Os eosinófilos são leucócitos com núcleo bilobado (humanos), cromatina altamente condensada e vários grânulos nos seu citoplasma. Estas células participam em vários processos inflamatórios como invasão helmíntica, infecções bacterianas e virais, danos teciduais, imunidade tumoral e doenças alérgicas (Rothenberg, 1998). Eles se desenvolvem e maturam na medula óssea a partir de células progenitoras mielóides CD34⁺. Em resposta a um estímulo eles são liberados no sangue periférico e trafegam para o tecido alvo, atraídos por moléculas como CCL11, CCL5, fator de ativação de plaquetas (PAF), leucotrieno B₄ (LTB₄), e IL-5, dentre outras, tendo a meia-vida no sangue periférico de 8 a 18h. Embora em quantidades menores que os linfócitos, os eosinófilos também são capazes de produzir várias citocinas como: IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-12, IL-13, TGF- β , TNF- α , CCL11, CCL5, fatores de crescimento e fibrinogênicos, espécies reativas de oxigênio e mediadores lipídicos como CisLT como LTC₄ e PAF (Kay, 2005).

O citoplasma dos eosinófilos contém quatro tipos de organelas secretórias: grânulos cristalóides, grânulos primários, grânulos pequenos e vesículas secretórias. As maiores organelas secretórias são os grânulos cristalóides que estocam a maioria das proteínas presentes nos eosinófilos. Destas proteínas podemos citar a proteína básica maior (MBP), peroxidase eosinofílica (EPO), proteína catiônica eosinofílica (ECP) e neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN) (Egesten e cols., 1986). A maioria delas compartilham propriedades citotóxicas e importantes no mecanismo do dano tecidual (Butterworth e cols 1984, Lehrer e cols, 1989, Ackerman e cols., 1985, Rosenberg e Domachowske, 2001 e Wang e Slungaard, 2006), porém todas apresentam atividades específicas.

A proteína MBP corresponde a mais de cinquenta por cento dos grânulos e está relacionada a hiperreatividade e broncoconstricção (Uchida e cols., 1993), ativação de fatores de remodelamento (Pégorier e cols., 2006), estimulação de mastócitos, neutrófilos e basófilos (Shenoy e cols., 2003) e citotoxicidade das vias aéreas, que pode ser parcialmente responsável pelo dano causado as mucosas brônquicas associada à infiltração de eosinófilos (Furuta e cols 2005).

Embora mais fraca do que o EDN (Slifman e cols., 1986), a ECP possui atividade ribonuclease, e promove a degranulação de mastócitos (Zheutlin e cols., 1984). O mecanismo de ação da ECP também está envolvido na formação de poros na membrana-alvo (Young e cols., 1986).

A EPO é tóxica para células de mamíferos, possui a capacidade de degradar tecido conjuntivo (Pégorier e cols, 2006) e induz dano oxidativo e mutagênese de DNA e RNA (Henderson e cols., 2001).

1.2 - Tratamento da asma

Os tratamentos mais comuns da asma e outras doenças alérgicas são realizados por duas classes principais de drogas: a) broncodilatadores: Agonistas de receptor β_2 de vida curta (SABAs) e de vida longa (LABAs), anticolinérgicos, inibidores de fosfodiesterase, metil-xantinas e moduladores de canais de potássio, e b) Antiinflamatórios: corticosteróides, antagonistas de bradicina, anti-histamínico, inibidores de fosfolipase A_2 (PLA_2), inibidores de tromboxano sintase (TXS_1), antagonista de receptores de tromboxano A_2 (TXA_2), antonista de PAF, inibidores de LTA_4 -hidrolase e inibidores de 5-lipoxigenase (5-Lo). Dentre estes podemos destacar alguns.

Agonistas de adrenoreceptores β_2 : SABAs inalados como salbutamol e turbutalina são os broncodilatadores mais disponíveis, atualmente, para alívio rápido dos sintomas da asma. Depois da ligação destes agonistas ao adrenoreceptor β_2 , a adenilato ciclase é estimulada, através da proteína G transdutora de sinal, para aumentar a produção de 3' 5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), ativando então a proteína kinase A (PKA). Este processo medeia o relaxamento do músculo liso pela fosforilação da miosina e abertura dos canais de Ca^{2+} dependente de K^+ , aliviando a broncoconstrição. Os LABAs são preferencialmente usados associados quando a asma não é controlada por corticosteróides inalados, uma vez que sua monoterapia não é recomendada pois pode mascarar uma piora na inflamação.

Inibidores de fosfodiesterase: Teofilina é uma xantina com atividade inibidora de fosfodiesterase (PDE) de AMPC e um antagonista do receptor de adenosina. A Teofilina tem sido usada para tratar broncoconstrição, mas seus efeitos colaterais cardíacos e no sistema nervoso central, têm levado a uma redução no seu uso (Boswell-Smith e cols., 2006).

Corticosteróides: A supressão das reações alérgicas inflamatórias pelos corticosteróides ocorre pela inibição da expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (Barnes e cols., 1998), cujos genes são regulados por fatores de transcrição como NF κ B e AP1. Os corticosteróides livres passam pela membrana celular, interagem com receptores citoplasmáticos, resultando na sua translocação para o núcleo, onde a atividade transcricional dos genes alvo é modulada por vários mecanismos diferentes, incluindo genes de transativação e transrepressão gênicas (Barnes e cols., 2003). Os corticosteróides são muito eficientes, mas podem acarretar vários efeitos colaterais como imunodepressão e síndrome de Crushing, e são ineficazes em exacerbações induzidas por vírus e em asmáticos fumantes. Além disso, nem a biossíntese nem a ação dos CisLTs, são inibidos por corticosteróides. E ainda podemos citar que alguns indivíduos desenvolvem resistência aos glicocorticóides (Gyllfors e cols., 2006).

Anti-histamínicos: São antagonistas de receptores de histamina 1 (H_1) e foram os primeiros fármacos usados para tratar reações alérgicas, em exemplo Clorfeniramina. Estes controlam bem os sintomas da alergia, mas seu efeito sedativo e anti-colinérgico são problemáticos, entretanto uma nova geração de drogas tem sido desenvolvida como Cetirizine, Loratadine, entre outros, diminuindo os efeitos tóxicos (Del e cols., 2006).

Antagonistas de cisteinil leucotrienos: Os CisLTs são os mais potentes contratores dos músculos das vias aéreas, apresentando também efeitos em microvasos, glândulas produtoras de muco, nervos e eosinófilos, por agir no receptor 1 de CisLTs (CisLTR1). Os antagonistas de leucotrienos orais disponíveis atualmente são antagonistas de CisLTR1, entre eles podemos citar Montelukast, Zafirlukast e Pranlukast, mas apesar de muitas tentativas, somente o inibidor de 5-lipoxigenase, Zileuton e o Montelukast encontra-se em fase de triagem clínica até o momento (Kemp, 2003 e Amirav, 2008).

Podemos ainda citar algumas terapias atualmente propostas como novas estratégias para o tratamento da asma. Merecem destaque:

- Imunoterapia alérgeno específico (SIT): É uma terapia modificadora da resposta imune que tem sido usada na asma moderada, dentre outras doenças alérgicas. SIT diminui o recrutamento dos mastócitos, basófilos e eosinófilos depois da exposição natural ou experimental ao alérgeno, além de induzir a formação de T_{reg} (Wu e cols., 2007). A imunoterapia subcutânea (SCIT) envolve a injeção regular de extrato de alérgenos ou alérgenos recombinantes, com a indução da tolerância variando de vários dias a vários meses. O fator limitante na SCIT é o efeito colateral da anafilaxia que pode acometer 0,1-5% dos indivíduos, dependendo da severidade (Williams e cols., 2004).
- Terapia anti-IgE: Omalizumab, uma IgG_1 que se liga especificadamente a IgE humana, oitem sido desenvolvida para o tratamento da asma severa. Estudos têm demonstrado uma melhora no quadro de asma em indivíduos tratados subcutaneamente com este fármaco, embora seus efeitos na hiperreatividade sejam modestos (Holgate e cols., 2005).

Além dos tratamentos citados anteriormente, existem ainda pesquisas com inibidores de mastócitos e imunoterapias baseadas no uso de anticorpos contra citocinas como IL-4, IL-13, IL-5, dentre outras.

Baseado nos dados acima fica em evidência, o grande interesse clínico e farmacêutico na busca de novas alternativas de tratamento, já que os glicocorticóides, drogas esteroidais com emprego consagrado na terapêutica antiinflamatória e antiasmática, tem sua utilização limitada em função da gravidade dos efeitos colaterais. As demais terapias possíveis também não atendem à toda a demanda terapêutica, fazendo com que a descoberta e desenvolvimento

de potenciais medicamentos para o controle da asma sejam ainda uma prioridade (Ying e cols., 2006).

1.3 - Plantas medicinais

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do globo terrestre, grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua saúde, fato este reconhecido pela OMS. Sabe-se que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas. Aliás, o uso de plantas medicinais pelo homem data de pelo menos 60.000 anos, segundo dados fósseis (Solecki e cols., 1975).

O número de plantas superiores (Angiospermae e Gymnospermae) neste planeta é estimado em 250.000 (Ayensu e cols., 1978) variando entre 215.000 (Cronquist A. 1981) e 500.000 (Cronquist A. 1988). Destas, apenas 6% foram avaliadas quanto às suas atividades biológicas e somente 15% foram avaliadas em estudos fitoquímicos (Verpoorte e cols., 2000), porém estima-se que este número aumente devido aos avanços tecnológicos.

Os objetivos do estudo de plantas medicinais são: A) isolar substâncias bioativas para o uso direto como drogas, por exemplo: morfina e reserpina, B) buscar substâncias bioativas novas ou usar estruturas conhecidas como modelos para semi-síntese e assim produzir substâncias com maior atividade e/ou baixa toxicidade, como metformina, nabilona e outros analgésicos narcóticos, C) usar substâncias isoladas como ferramentas farmacológicas, como, ácido lisérgico dietilamida (LSD), usado como alucinógeno e D) usar toda a planta ou parte dela como fitoterápico, como, por exemplo, a *Gincko biloba*.

Em 1991, a OMS valorizou a importante contribuição da medicina tradicional na prestação de assistência social, especialmente às populações que têm pouco acesso aos sistemas de saúde, e solicitou a interação entre os praticantes de medicina tradicional e da assistência sanitária moderna, principalmente no tocante ao emprego de remédios tradicionais de eficácia científica demonstrada, a fim de reduzir os gastos com medicamentos. Sugeriu, também, que todos esses remédios fossem aproveitados plenamente e que os produtos naturais, em particular os derivados de plantas, poderiam conduzir ao descobrimento de novas substâncias terapêuticas.

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim divididos: 25% de plantas, 12% de microorganismos e 3% de animais (Calixto, 2001). Das 252 drogas

consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originadas de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (Rates, 2001). As plantas têm uma vantagem nesta área, baseado no uso pelo homem durante vários anos. Além disso, nas últimas décadas, o interesse populacional pelas terapias naturais tem aumentado significativamente nos países industrializados (WHO, 2003).

No Brasil, estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões do faturamento da indústria farmacêutica, no ano de 1996, foram originados de medicamentos derivados de plantas (Guerra e cols, 2001). Considera-se também que as vendas nesse setor crescem 10% ao ano, com estimativa de terem alcançado a cifra de US\$ 550 milhões no ano de 2001 (Knapp, 2001). Embora nosso país possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas (Prance, 1977), apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos ativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (Guerra e cols., 2001).

A pesquisa com fontes naturais deve ser seguida por alguns passos básicos. A primeira etapa consiste na pesquisa sobre a planta a ser estudada, seu uso terapêutico pela medicina popular, informações sobre efeitos tóxicos, uso de pesticidas, formas de preparo, dose utilizada etc. (Yunes e cols., 2001).

Durante a coleta é necessário ter cuidado com parasitas, doenças, além de anotar data, local, hora, já que a produção dos metabólitos das plantas é influenciada pela época do ano, tipo de solo e hora do dia (Simões e cols., 2000). Após a coleta, deve-se avaliar e identificar a planta por uma nomenclatura segundo a literatura botânica para prevenir duplicação desnecessária e confusão devido a sinônimos. (Waller e cols., 1993).

Após a coleta, o material pode ser preparado para armazenagem e/ou para realização de testes posteriores. Após secagem ao ar livre, à sombra ou em estufa, com finalidade de retirada de água, o material pode ser moído, o que reduz mecanicamente o material vegetal, aumentando a superfície de contato para facilitar a extração (Simões e cols., 2000).

Para obtenção do extrato bruto, o método considerado mais adequado é a preparação de um extrato aquoso ou hidroalcoólico, se assemelhando ao chá ou mistura de plantas com bebida alcoólica, respectivamente, segundo a medicina popular. (Yunes e cols., 2001).

Dentre os vários métodos de extração, podemos citar a infusão, onde o material vegetal é colocado na água em fervura, depois o recipiente é tampado e deixado em repouso até voltar à temperatura ambiente; a decocção, quando se coloca o material vegetal em água fria, e em seguida, aquece-se até a ebulição, deixando ferver por alguns minutos, percolação que consiste em passar o solvente lentamente, sob pressão, através do material vegetal para fazer a extração de substâncias do mesmo, e a turbolização, que consiste em bater a planta

com o solvente extrator em um liquidificador, embora existam equipamentos próprios para isso como o moinho (Simões e cols., 2000).

Após obtenção do extrato bruto e realização de alguns testes biológicos de interesse, o extrato deverá ser submetido ao fracionamento através de diferentes técnicas cromatográficas, tais como: partições líquido-líquido, filtração, cromatografias de adsorção, eletroforese, etc... O processo de fracionamento e isolamento de substâncias bioativas é monitorado por testes biológicos para saber qual fração possui maior efeito e, geralmente, a que possui efeito mais pronunciado é a escolhida para seguir as etapas seguintes no processo de fracionamento, isolamento e identificação. A elucidação das estruturas das substâncias biologicamente ativas são estudadas por técnicas como radiação ultravioleta, infravermelho, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C . A substância isolada pode ser ainda modificada, através da retirada ou incorporação de novos grupos, visando otimizar a atividade biológica relacionada e/ou reduzir a toxicidade (Yunes e cols., 2001).

1.3.1 – Estudos farmacológicos

Nos estudos pré-clínicos avalia-se a via de administração adequada, velocidade de absorção, distribuição no organismo, metabolização, vias de excreção, veículos a serem utilizados, efeitos farmacológicos, a relação dose-efeito satisfatória, efeitos de associação com anti-depressivos, anti-hipertensivos dentre outros, toxicidade aguda, que ocorre quando os animais são tratados uma única vez ou parceladamente e observados por no máximo 24h, toxicidade sub-aguda (de 24h a 30 dias), sub-crônica (de 30 a 60 dias) e crônica, quando o fármaco é administrado em intervalos maiores de 60 dias. Esses estudos *in vivo* são realizados inicialmente em camundongos. Estudos *in vitro*, onde é utilizada principalmente cultura de células, precedem os estudos com experimentação animal e estes por sua vez precedem os testes pré-clínicos realizados em humanos (Simões e cols., 2000). Após os estudos pré-clínicos seguem os estudos clínicos, realizados inicialmente em indivíduos saudáveis, e depois em pacientes.

1.4- Metabólitos de plantas

São vários os metabólitos encontrados em extratos de plantas com efeitos biológicos já demonstrados cientificamente. Os óleos voláteis são obtidos de diferentes partes da planta

através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. As principais substâncias extraídas são da classe dos fenilpropanóides e terpenóides (Simões e cols., 2000). Como exemplo, podemos citar os óleos voláteis extraídos de espécies de Eucalipto, que possuem atividade anti-tumoral e anti-microbiana (Remenazi, 2006).

Os polissacarídeos são polímeros de alto peso molecular resultante da polimerização de um grande número de moléculas de aldoses e cetoses. Podem ser extraídos não só de plantas, mas também de bactérias e algas. Têm sido descobertos, entre os polissacarídeos, atividades antitumoral, imunoestimulante, antiinflamatória, anti-viral, dentre outras (Chattopadhyay, 2008, Wack e cols, 2008, e Jin e cols, 2008).

As substâncias fenólicas simples e heterosídeos representam uma classe de substância que possui, pelo menos, um hidrogênio substituído por um grupo hidroxila (OH) no anel aromático. Dentro dessa classe são encontrados os ácidos fenólicos, os derivados da cumarina, ligninas, e os taninos. Os taninos são substâncias fenólicas solúveis em água e são classificados em hidrolisáveis e condensados. São famosos por curar feridas, queimaduras e inflamações. Eles também possuem a propriedade de se ligar a proteínas e vários atuam como captadores de radicais. Outras propriedades têm sido descobertas como, por exemplo, antioxidante (Zhang e cols., 2008). Para alguns componentes dessa classe têm sido relatadas atividades antioxidante, antibacteriana, antiviral e inibição seletiva da 5-lipoxigenase (Simões e cols., 2000).

Os flavonóides representam importante classe de polifenóis que tem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros). São indicados no tratamento de doenças circulatórias, cardíacas, câncer. Além disso, muitos possuem atividade imunomodulatória.

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou terpenos policíclicos. Possuem uma parte lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares). Sua característica marcante é a formação de espuma em solução aquosa. Algumas saponinas têm ação sobre membranas celulares, principalmente de hemáceas, possuem ação antifúngica, e redutora de colesterol sérico, e anticancerígena (Simões e cols., 2000).

Os Alcalóides são substâncias nitrogenadas, na sua maioria de caráter alcalino. São substâncias orgânicas cíclicas contendo um nitrogênio em estado de oxidação negativa. Os alcalóides verdadeiros são aqueles que contêm um átomo de nitrogênio em anel heterosídeo. Alguns alcalóides são bastante conhecidos como a cafeína (estimulante do sistema nervoso central), a morfina (analgésico) e a codeína (antitussígeno) (Simões e cols., 2000).

Estes metabólitos secundários estão amplamente distribuídos nas diferentes famílias vegetais e constituem-se em uma rica fonte para o estudo e obtenção de novos agentes com atividade terapêutica importante, de modo a atender a demanda atual de busca e desenvolvimento de novos fármacos.

1.5 – Bromeliaceae

A família Bromeliaceae compreende 46 gêneros, com aproximadamente 2.500 espécies, subdivididas em 3 subfamílias: Bromelioideae, Pitcainoideae e Tillandsioideae. A maioria das plantas são nativas da América tropical com apenas 1 gênero no oeste da África (figura 1). A maioria das Bromeliaceae são plantas epífitas, mas algumas são xerófitas, encontradas basicamente em três grandes regiões da América tropical: nos Andes, do México às Antilhas, no Planalto das Guianas e na Mata Atlântica do leste brasileiro (Smith e Dows, 1974). A floresta Pluvial Costeira é o habitat preferido de Bromeliaceae (81,8% do total de táxons). Nesse habitat encontram-se diversos gêneros, com seu maior grau de endemismo (26,4%) (Chedier e Kaplan, 1996).

Uma das plantas mais conhecidas desta família e de maior importância econômica é o abacaxi *Ananas comosus* e *Ananas sativus*, deste último foi isolado a bromelina, uma cisteína protease, que em diversos estudos demonstrou atividade anti-alérgica (Secor e cols., 2008), antiinflamatória (Fitzhugh e cols., 2008), cardioprotetora (Juhasz e cols., 2008), dentre outras.

Entre os metabólitos encontrados na família Bromeliaceae destacam-se os terpenóides e flavonóides, sendo encontrados em estudos feitos principalmente com plantas do gênero *Tillandsia*. Podem ainda ser encontrados, neste grupo de plantas, derivados do ácido cinâmico diterpenóides, triterpenóides e esteróides (Raffauf e cols., 1981; Takata e cols., 1976a; Harbone e cols., 1982; Harbone, 1988; Atallah e cols., 1971; Takata e cols., 1976b; Marker e cols., 1943; Borin e cols., 1993).



<http://en.wikipedia.org/wiki/Image:WorldBromeliadDistribution.PNG>

Figura 1: Distribuição geográfica da família Bromeliaceae.

1.5.1- Nidularium



Figura 2: Distribuição geográfica do gênero *Nidularium* no Brasil (pontos em vermelho).

É um gênero pertencente à subfamília Bromelioideae, cujo nome descreve a característica de ninho de sua inflorescência, do latim: *nidulus*=pequeno ninho. O gênero *Nidularium* tem como seu habitat exclusivo o sub-bosque da mata atlântica, numa área compreendida entre os estados da Bahia e Rio Grande do Sul, passando por todos os estados da região sudeste do Brasil. Pode ainda ser encontrado ao nível do mar, na restinga ou em áreas de transição da Mata Atlântica com manguezais, como a espécie *Nidularium procerum*. Este gênero foi descrito pela primeira vez pelo francês Charles Antonie Lemaire em 1854, sendo *Nidularium fulgens* a espécie-tipo deste gênero coletada em 1849 na cidade imperial de Petrópolis, no Rio de Janeiro.

As duas espécies mais abundantes são a *N. procerum* e *N. innocenti*. O estado que possui maior concentração de espécies é o Rio de Janeiro, com o número de espécies diminuindo a medida que se afasta do estado que é o pólo geográfico de irradiação e especiação do gênero (figura 2).

1.5.1.1- *Nidularium procerum*

Reino:	Plantae
Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Liliopsida
Ordem:	Poales
Família:	Bromeliaceae
Sub-família:	Bromelioideae
Gênero:	<i>Nidularium</i>
Espécie:	<i>Nidularium procerum</i>

Tabela 1: Classificação taxonômica de *Nidularium procerum*



Figura 3: *Nidularium procerum*

O nome da planta objeto de estudo deste trabalho originou-se do latim *procerus*, que significa “alto” ou “esbelto”, tendo referência à sua inflorescência bem elevada acima da roseta foliar (Leme, 2000). É uma bromélia epífita com até 1,80m de comprimento podendo variar de coloração e tamanho. Não possui caule, suas folhas são dispostas em roseta,

composta de 10 a 20 folhas enciformes, grandes e agudas, podendo chegar até 90 cm de comprimento, sendo finamente dentadas nas margens, com coloração esverdeada. Esta planta possui escalpo floral alto, circundado de brácteas de cor púrpura, grandes e agudas. As flores são azul-pálido, em grande número, dispostas em capítulos. Esta espécie é conhecida por ser a maior do gênero (Corrêa, 1984).

Recentes estudos demonstraram efeitos analgésicos, antiinflamatórios e antialérgicos desta planta. O efeito analgésico foi demonstrado em modelo de contorção induzida por ácido acético, onde o extrato aquoso das folhas de *Nidularium procerum* (EAFNp) reduziu o número de contorções com ED₅₀ de 0,2 mg/kg, por via intraperitoneal, tendo seu efeito máximo 1h antes do estímulo com a dose de 1 mg/kg (Amendoeira e cols., 2005).

O EAFNp inibiu a hiperalgesia em ratos por injeção de bradicinina na pata, na dose de 140 mg/kg, dose na qual a droga controle ácido acetil salicílico (AAS) não foi capaz de inibir. EAFNp não possui ação de efeito central, demonstrado pelo modelo de placa quente. Foi observado que a administração oral de EAFNp apresentou efeito dose dependente entre 0,1 e 10 mg/kg no modelo de contorção induzida por ácido acético. A fração metanólica do extrato EAFNp, mostrando atividade semelhante a este, enquanto que as frações metanólica e aquosa dos rizomas não demonstraram efeito analgésico no modelo de contorção. O efeito analgésico observado parece não ocorrer através do receptor opióide, reforçando a hipótese de que o efeito não ocorre via sistema nervoso central, mas um dos mecanismos parece ser pela inibição da síntese de Prostaglandina E₂ (PGE₂) dependente de ciclooxigenase 2 (COX₂), demonstrado pelo uso das células EcR-293 (Amendoeira e cols., 2005a).

Foi verificado que o EAFNp não é tóxico para os camundongos, já que o tratamento por 8 dias consecutivos na dose de 100 mg/kg, dose 500 vezes maior do que o ED₅₀, por via intra peritoneal, não alterou o peso, a celularidade sanguínea, peritoneal e da medula óssea, se comparado aos animais tratados com salina.

A migração de neutrófilos para a cavidade pleural pelo estímulo com LPS, também foi inibida significativamente pelo EAFNp na dose de 20 mg/kg, via i.p. Esta dose também inibiu a liberação de citocinas como IL-1 e IL-6. Todas as doses testadas neste modelo, (0,2, 2 e 20 mg/kg) foram capazes de inibir a formação de corpúsculo lipídico (compartimentos intracelulares responsáveis pela síntese de vários mediadores inflamatórios). O EAFNp, além de ter reduzido a migração de neutrófilos pelo estímulo de LPS, apresentou o mesmo efeito com estímulos pelo Formil-Metionina-Leucina-Penilalanina (fMLP) e PAF. PAF também foi utilizado para verificar o efeito do EAFNp na quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*, sendo o extrato capaz de inibir a quimiotaxia na concentração de 0,01 mg/mL (Amendoeira e cols., 2005).

Para a verificação do efeito antialérgico, foi utilizado o modelo de inflamação alérgica pulmonar, onde observou-se que o EAFNp, administrado via i.p. na dose de 2 mg/kg, inibiu a migração de eosinófilos para a cavidade torácica após 6h e 24h de estímulo com ovalbumina (OVA). O EAFNp também foi capaz também de inibir a formação de corpúsculos lipídicos nos eosinófilos, 24h após o estímulo e liberação de eotaxina e IL-13. Este efeito antialérgico parece não ser pela via de inibição da enzima COX. *In vitro*, o extrato foi capaz de inibir a diretamente a motilidade dos eosinófilos, pois o tratamento com o EAFNp inibiu a migração destas células induzida por PAF e eotaxina. (Vieria-de-Abreu e cols., 2005).

Entretando, embora tenha sido demonstrado o efeito antialérgico do EAFNp quando administrado por via intraperitoneal, como o uso popular das plantas medicinais geralmente consiste na administração oral de preparados da mesma, tais estudos se fazem necessários.

2 - Objetivos

2.1 -Objetivo geral:

Avaliar a atividade antialérgica da espécie *Nidularium procerum* e estudar possíveis mecanismos de ação envolvidos nesta bioatividade.

2.2 - Objetivos específicos:

- a. Avaliar o efeito antialérgico dos extratos aquoso, etanólico e hidroalcoólico de *N. procerum* através da análise da migração de leucócitos para os pulmões;
- b. Avaliar o efeito dos extratos na produção e circulação de leucócitos, avaliando-se o perfil celular na medula óssea e no sangue;
- c. Avaliar possíveis efeitos *in vitro* dos extratos na função de linfócitos, analisando proliferação celular e liberação de citocinas.

3 – Métodos

3.1 – Animais

Camundongos Balb/C fêmeas de 6 a 8 semanas obtidos no biotério central da FIOCRUZ foram utilizados nos diferentes modelos experimentais. Os animais foram mantidos com comida e água *ad libitum*, em uma sala com temperatura entre 22-24°C e um ciclo de 12h de claro e escuro, no biotério de experimentação do Pavilhão Osório de Almeida do IOC/FIOCRUZ. Os procedimentos experimentais foram devidamente registrados e autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FIOCRUZ sob o Certificado de Licença número L-0002/08.

3.2 - Preparo dos extratos

Este trabalho faz parte de um Projeto de colaboração desenvolvido pelo laboratório de imunofarmacologia e o laboratório de Produtos Naturais 3 (PN-3), de Farmanguinhos/FIOCRUZ. Todos os extratos foram então preparados por Cristiane Cardoso dos Santos responsável pelo estudo químico de *Nidularium procerum*, sob a supervisão da Dra. Maria Raquel Figueiredo, Chefe do Laboratório PN-3. As folhas de *N. procerum* foram secas em estufa a 41°C com circulação de ar. Após a secagem as folhas foram trituradas em liquidificador, uma porção de cada vez, alternando entre as velocidades alta e baixa.

3.2.1 - Extrato aquoso: O material triturado foi adicionado a um recipiente com água fervente na proporção de 1:15. Após chegar à temperatura ambiente, o infuso foi filtrado em papel de filtro, obtendo-se o extrato aquoso, que foi posteriormente liofilizado.

3.2.2 - Extrato etanólico: Ao material vegetal triturado foi adicionado etanol absoluto, na proporção de 1:15, após quinze dias a solução teve o etanol evaporado em rotavapor.

3.2.3 - Extrato hidroalcoólico: Ao triturado foi adicionado água e etanol (50:50), na proporção de 1:20, após quinze dias o extrato foi evaporado em rotavapor e posteriormente liofilizado.

3.2.4 – Análise Cromatográfica

Para análise do perfil químico dos extratos, utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa em coluna Shim-pack CLC-SIL 250x4,6 mm e pré-coluna Shim-pack CLC-G-ODS 10x4,0 mm (Shimpack Engineering Ltd, Southall, London), ambas com fase C₁₈. A composição da fase móvel variou em gradiente linear de acetonitrila-água nas proporções de 10:90 v/v a 70:30 v/v em 60 min. Ambas as fases continham 0,05% de ácido trifluoroacético. A vazão da fase móvel permaneceu a 1 mL/min. Detecção por varredura de comprimento de onda de 200 a 400 nm, com acompanhamento em 3 comprimentos de onda, 220nm, 260 nm e 340 nm.

3.3 - Estudos *in vivo* : Inflamação alérgica pulmonar

O protocolo foi realizado de acordo com Tsuyuki e colaboradores, 1997, com pequenas modificações. Animais foram sensibilizados via intraperitoneal (i. p.) com ovalbumina (OVA, grade III, Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo) 10 µg/camundongo e hidróxido de alumínio (Al(OH)₃ (Sanofin Synthelabo de Colômbia S. A., Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colômbia) a 10 mg/mL, em solução fisiológica estéril, no dia 1 e 10. Do dia 19 ao dia 24 após a sensibilização, os camundongos foram desafiados diariamente com OVA 2,5%, diluída em salina estéril a por 20 min. Aerolização com salina estéril foi realizada como controle negativo. Os tratamentos com os diferentes extratos e doses foram realizados uma hora antes de cada aerolização, sendo o extrato aquoso diluído em solução fisiológica e os extratos etanólico e hidroalcoólico dissolvidos em DMSO a 1%. Os animais foram divididos em grupos de n de no mínimo 6, de acordo com a tabela que se segue:

Grupo	Sensibilização	Aerolização	Tratamento
salina	OVA/ Al(OH) ₃	salina	salina
OVA	OVA/ Al(OH) ₃	OVA	salina
Dexa (Decadron, Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A, Guarulhos, SP)	OVA/ Al(OH) ₃	OVA	Dexametasona
NpAq - Extrato aquoso de <i>N. procerum</i>	OVA/ Al(OH) ₃	OVA	Extrato aquoso
NpHa - Extrato hidroalcoólico de <i>N. procerum</i>	OVA/ Al(OH) ₃	OVA	Extrato hidroalcoólico
NpEt - Extrato etanólico de <i>N. procerum</i>	OVA/ Al(OH) ₃	OVA	Extrato etanólico
DMSO (Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo)	OVA/ Al(OH) ₃	OVA	DMSO a 1%

Vinte e quatro horas após a última aerolização, o sangue dos animais foi recolhido via plexo orbital, para determinação da contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos (através de esfregaço sanguíneo) e obtenção do soro (por centrifugação do sangue a 10.000 rpm por 5 min, após 4h de coagulação). Posteriormente, para análise do lavado bronco alveolar (BAL) e da medula óssea, procedeu-se à eutanásia dos animais utilizando-se uma injeção intraperitoneal de 500 mg/kg de tiopental (cristália produtos químicos e farmacêuticos, Itapira, SP).

Para obtenção do BAL, a traquéia foi cirurgicamente exposta e canulada, o BAL recolhido injetando-se 750 µL de PBS com EDTA a 0,1mM, num total de 1,5 mL. Para análise da medula óssea, os fêmures das patas traseiras foram extirpados e lavados com 3 mL de meio RPMI 1640 (LGC Biotecnologia, Cotia, SP).

3.3.1 – Contagem de leucócitos

A contagem de leucócitos totais foi realizada em câmaras de newbauer, após a diluição de uma alíquota das amostras (sangue, BAL e medula), com solução Turk (ácido acético 2%). A contagem diferencial dos mononucleares (macrófagos e linfócitos), neutrófilos, e eosinófilos foi realizada usando citospin (Cytospin 3, Shandon Inc. Pitisburg, P. A.), para a contagem do BAL e medula, e realizado os esfregaço para o sangue. Todas as lâminas foram coradas com panótico (Laborclin, Pinhais, PR). Contagem foi descrita como número de células/mL.

3.4 - Estudos *in vitro*:

3.4.1. Obtenção de esplenócitos

Camundongos foram sensibilizados por via i. p. com ovalbumina (OVA)/camundongo e Al(OH)₃ a 10 mg/mL no dia 1 e no dia 10. No dia 18 os camundongos foram sedados e, logo após, sacrificados. Os baços foram retirados e macerados em meio RPMI 1640 completo contendo 10% de soro fetal bovino (Cutilab, Campinas, SP), 100 µg/mL de penicilina G, 70 µg/mL de estreptomicina, glutamina a 2 mM e 0,5% de β-mercaptoetanol (Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo). As células isoladas foram suspensas em solução hipotônica (cloreto de amônio a 145 mM, bicarbonato de potássio a 10 mM, ácido etilenodiaminotetracético a 2 mM) e meio de cultura RPMI (50:50), centrifugadas a 500 x g por 3 min. e o sobrenadante

descartado. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes, sendo a última vez realizada apenas com meio.

3.4.2 - Ensaio de citotoxicidade e proliferação de esplenócitos

As células foram suspensas em meio RPMI completo, as células viáveis foram contadas em câmara de newbauer por microscopia de contraste de fase e soluções celulares foram preparadas para concentração final de $1,25 \times 10^6$ células/mL na placa de cultura. As células foram, então, cultivadas em placas de 96 poços de fundo chato, com volume total de 200 μ L/poço (para os ensaios de citotoxicidade e de proliferação celular), com diferentes concentrações dos extratos de *Nidularium procerum* (10, 25, 50 e 100 μ g/mL), na presença ou não de OVA na concentração final de 50 μ g/mL, em atmosfera úmida com 5% de CO₂, a 37°C, por 72h. As soluções estoque dos extratos foram preparados em meio ou etanol a 70% e então, diluídas com meio completo para as concentrações finais desejadas. Experimentos controle contendo etanol nas concentrações finais na faixa de 0,00025% a 1% foram desenvolvidos. Também foram realizados experimentos com camundongos SWISS, sadios, utilizando concanavalina A (Con A, 2,5 μ g/mL) e dexametasona (Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo).

A citotoxicidade foi determinada pelo teste de MTT, conforme Mosman e cols., 1983. Nas últimas duas horas de cultura, foi adicionado a cada poço 10 μ L da solução de MTT (Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo) a 5 mg/mL (em PBS). A reação foi paralisada com a adição de 100 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo) a 10% com 0,01 M de HCl. A cultura permaneceu na estufa “overnight” para dissolução dos cristais de formazan. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro de microplacas no comprimento de onda de 570 nm.

A proliferação de esplenócitos foi avaliada através incorporação de metil-³H-timidina (Amersham Life science, Piscataway, NJ) nas últimas 24 h de incubação, numa cultura de 72h. Foram adicionados à placa de cultura 25 μ L/poço de solução de a 10 μ Ci/mL. Os ensaios foram feitos em triplicatas. A radioatividade foi determinada em cintilador líquido (modelo LS 100C e LS 6500, Beckman Instruments Inc. Fullerton, CA) em contagens por minuto (cpm).

3.4.3 - Dosagem de citocinas por ELISA

A dosagem das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, foi realizada em sobrenadantes de esplenócitos cultivados nas mesmas condições do item 3.4.2. em placas de 24 poços, com volume final de 1 mL. Após cultura dos esplenócitos por 72h, conforme citado no item 3.5, 700 µL dos sobrenadantes foram recolhidos e mantidos a -20°C para posterior análise das citocinas. Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS (pH 7,4), colocados em placa de 96 poço, (100 µL/poço) e deixados de um dia para o outro em geladeira. Depois as placas foram lavadas 4 vezes com 200 µL de PBS/tween 0,05%, bloqueadas com uma solução de PBS e BSA a 1% e incubadas a temperatura ambiente por 1h. Após esta incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS/tween 0,05%. As amostras e os padrões (diluídos em PBS/BSA 1%) foram adicionados a placa (100 µL/poço) e estas incubadas novamente de um dia para o outro, a 4°C. Após este procedimento as placas foram lavadas 4 vezes com PBS/Tween e os anticorpos de detecção, biotinilados, foram adicionados à placa (100 µL/poço). Após incubação por 1h a temperatura ambiente e mais algumas lavagens, a avidina peroxidase foi diluída (1:200) em PBS/BSA/Tween, 100 µL/poço foram adicionados à placa e esta foi incubada por 30 min a temperatura ambiente. A placa foi revelada com dihidrocloro o-fenilenediamina (OPD) Sigma, chemical Co. St, Louis, Mo). A reação foi paralisada com 50 µL de HCl 3N. A placa foi lida em espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax, Molecular devices, Sunnyvale, CA) no comprimento de onda de 450 nm.

3.5 -Análise estatística

A análise de variância dos resultados entre os grupos foi realizada pelo teste One-way ANOVA, sendo a significância das diferenças entre os grupos, avaliada pelo teste de Newman-Kewls-Student para os experimentos *in vivo*. Para os experimentos *in vitro*, foram utilizados os métodos de Tukey para as análises de citotoxicidade (MTT) e proliferação (incorporação de timidina tritiada) e test *t* de Student para as análises de liberação de citocinas. As diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

4 – Resultados

4.1 – Estudos *in vivo*: Inflamação alérgica pulmonar

Vieira-de-Abreu e cols. (2005) demonstraram anteriormente que o pré-tratamento por via intraperitoneal com o extrato aquoso de *N. procerum*, na dose de 2 mg/kg, é capaz de inibir significativamente o infiltrado de eosinófilos para a cavidade pulmonar, induzido pela aerolização de ovalbumina, no modelo de inflamação alérgica pulmonar. Uma das grandes questões a serem consideradas na abordagem experimental que avalia a busca de novos agentes bioativos, principalmente aqueles de origem vegetal, é a utilização de vias de administração que estejam o mais próximo do uso popular. Desta forma, com base nos dados iniciais acima relatados, em uma primeira etapa desta investigação analisamos o efeito do extrato aquoso de *N. procerum*, utilizando a via oral, preconizada na medicina tradicional, sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar. Como podemos observar na figura 4A, a aerolização dos animais com OVA induz uma significativa migração celular, que se reflete no expressivo aumento do número total de leucócitos no lavado broncoalveolar (BAL) quando comparado ao controle. O tratamento com o extrato aquoso (NpAq) uma hora antes de cada aerolização foi capaz de inibir a migração dos leucócitos em 63,83 %, na dose de 10 mg/mL, 77,87 % na dose de 100 mg/mL, e 78,72 % na de 500 mg/mL. Observamos que houve também um aumento significativo na quantidade de células mononucleares migrantes (fig. 4B), em relação ao grupo salina. O tratamento dos animais com *Nidularium procerum* foi capaz de inibir a migração em todas as doses: 73,81 % na dose de 10 mg/mL, 83,93 % na dose de 100 mg/mL e 88,84 % na de 500 mg/mL, em relação ao grupo OVA. Não foram detectadas alterações relevantes no perfil de neutrófilos em nossas condições experimentais (fig. 4C). Por outro lado, na figura 4D, observamos um aumento do número de eosinófilos infiltrantes no BAL do grupo OVA, quando comparado ao grupo salina. Interessantemente, todas as doses de *N. procerum* foram capazes de inibir a migração celular de eosinófilos: 56,66 % na dose de 10 mg/mL, 74,43 % na dose de 100 mg/mL e 75,98% na de 500 mg/mL. A dexametasona (dexa), droga padrão utilizada, inibiu a migração celular, sendo esta inibição de 65,06% na contagem total, 52,46 % na contagem de mononucleares (figs. 4A e 4B), e de 70,34 % nos eosinófilos (fig. 4C).

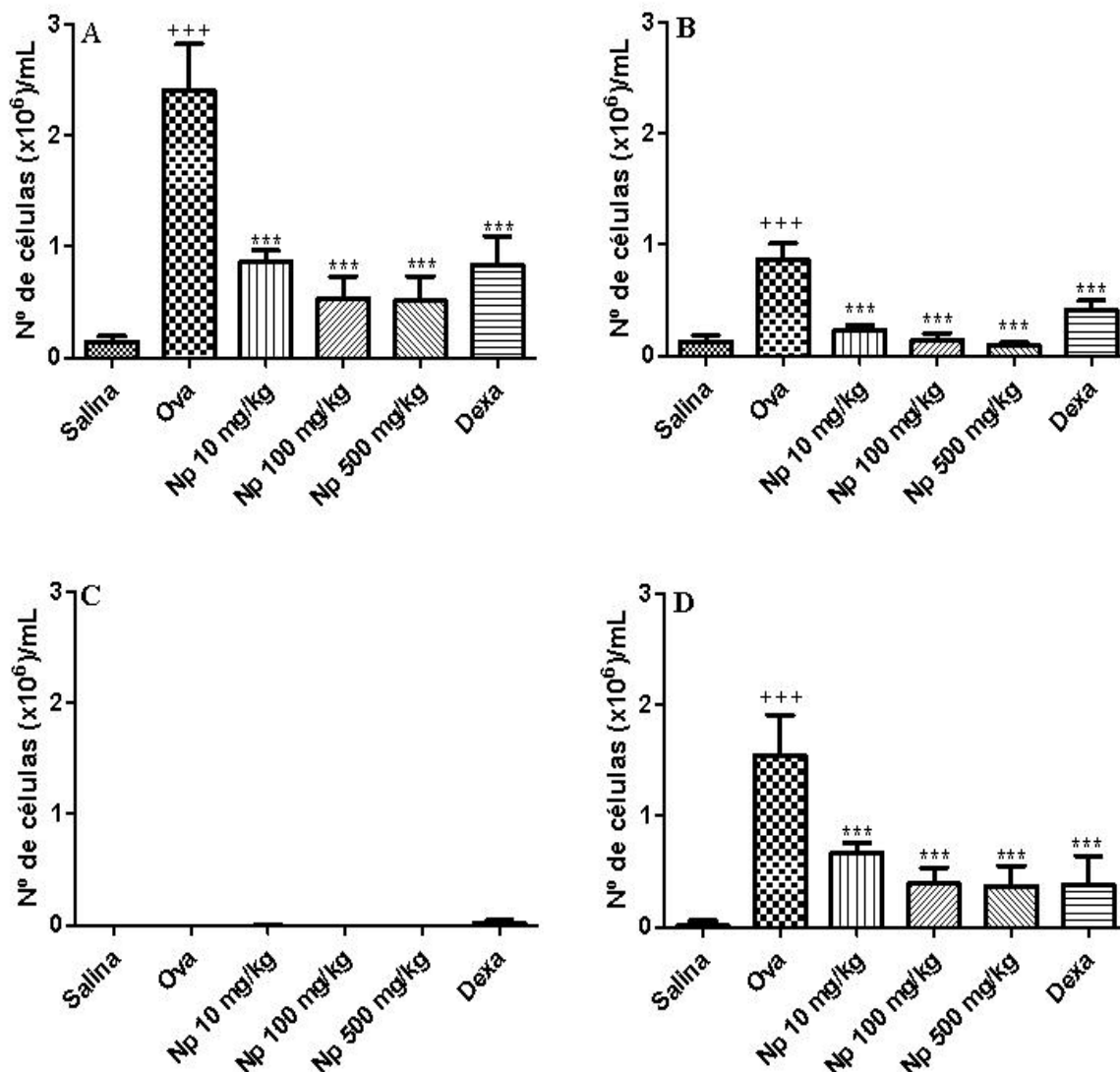


Figura 4: Análise dos efeitos do pré-tratamento com extrato aquoso de *Nidularium procerum* na inflamação alérgica pulmonar no BAL. A: Contagem total de leucócitos no BAL. B: Mononucleares, C: Neutrófilos e D: Eosinófilos. Camundongos foram sensibilizados por via i. p. com OVA (10 µg/camundongo) e Al(OH)₃ a 10 mg/mL, no dia 1 e no dia 10. Do dia 19 ao dia 24 os camundongos foram tratados e 1h após o tratamento, desafiados, por aerolização com salina ou solução de OVA diluída em salina a 2,5%, por 20 min. Os resultados expressam média ± DP de um experimento representativo. Estatística realizada pelo método de Newman-Keuls.***p < 0,001 em relação a OVA. +++p < 0,001, em relação ao controle.

Após a análise do extrato aquoso, comparamos os efeitos desse extrato com o uso do extrato etanólico e hidroalcoólico, sobre a inflamação pulmonar alérgica, avaliando a resposta celular no BAL, no sangue e na medula óssea dos animais. A dose de 10 mg/Kg foi utilizada como dose padrão de tratamento para todos os extratos. Na análise do BAL (fig. 5), podemos observar que o tratamento com o NpEt inibiu a migração celular em $51,72 \pm 1,75\%$ ($p < 0,01$), enquanto que o NpAq e o NpHa apresentaram uma discreta inibição de 30% na

migração celular. Quando analisamos as células mononucleares, na figura 5B, observamos que não houve alteração no número deste tipo celular com os tratamentos com os extratos em relação à OVA. Na figura 8C, vimos que o NpEt e o NpHa não alteraram a migração de neutrófilos em relação ao grupo OVA. Por outro lado, o NpAq inibiu a migração de neutrófilos em $63,44 \pm 27,48$ %. Nestes experimentos o número de eosinófilos correspondeu em média, a $39,62 \pm 0,95$ % do total de células que migraram para o sítio inflamatório (fig. 5D). O pré-tratamento com os extratos foi capaz de inibir a migração de eosinófilos para os pulmões, em relação à OVA: o NpAq inibiu $47,45 \pm 29,11$ %, o NpHa inibiu $50,39 \pm 22,91$ %, enquanto que o NpEt foi o extrato que apresentou o maior percentual de inibição da migração de eosinófilos, $76,73 \pm 7,07$ % ($0,10 \pm 0,03 \times 10^6/\text{mL}$). O tratamento com DMSO 1%, que é o veículo dos extratos etanólico e hidroalcoólico, não interferiu com a resposta inflamatória alérgica.

A figura 6A mostra a distribuição de leucócitos totais no sangue. Observamos que a aerolização com OVA diminuiu o número de leucócitos circulantes em relação ao grupo salina. O tratamento com os extratos não alterou o número de leucócitos totais. Na figura 6B observamos que o número de células mononucleares circulantes no sangue é maior no grupo salina do que no grupo OVA, e que os tratamentos com os extratos não alteraram significativamente o número dessas células. Na figura 6C, observamos que o número de neutrófilos no sangue do grupo OVA não foi alterado em relação ao grupo salina, e que os tratamentos não causaram mudanças significativas, embora tenham mostrado uma tendência à diminuição: NpAq diminuiu $33,65 \pm 0,25$ %, NpEt reduziu $23,81 \pm 13,58$ %, e o NpHa diminuiu $42,94 \pm 3,34$ %. Na figura 6D observamos uma quantidade reduzida de eosinófilos circulantes no sangue, em comparação dos outros tipos celulares, embora tenhamos observado um aumento de $60,07 \pm 8,24$ % nestas células, do grupo OVA em relação ao grupo salina. O número de eosinófilos apresentou uma importante variação, não sendo desta forma, detectadas diferença estatisticamente significativa. Entretanto, assim como observado no BAL, o extrato etanólico foi o único que apresentou uma tendência em diminuir o número de eosinófilos, com um percentual de $33,20 \pm 17,14$ % de inibição da migração destas células. O extrato aquoso e hidroalcoólico inibiram em $16,49 \pm 24,15$ % e $20,54 \pm 1,83$ %, respectivamente este fenômeno. O tratamento com DMSO 1%, embora tenha apresentado uma tendência à diminuição nos leucócitos totais e nos subtipos celulares, essa diminuição não foi significativa em relação à OVA.

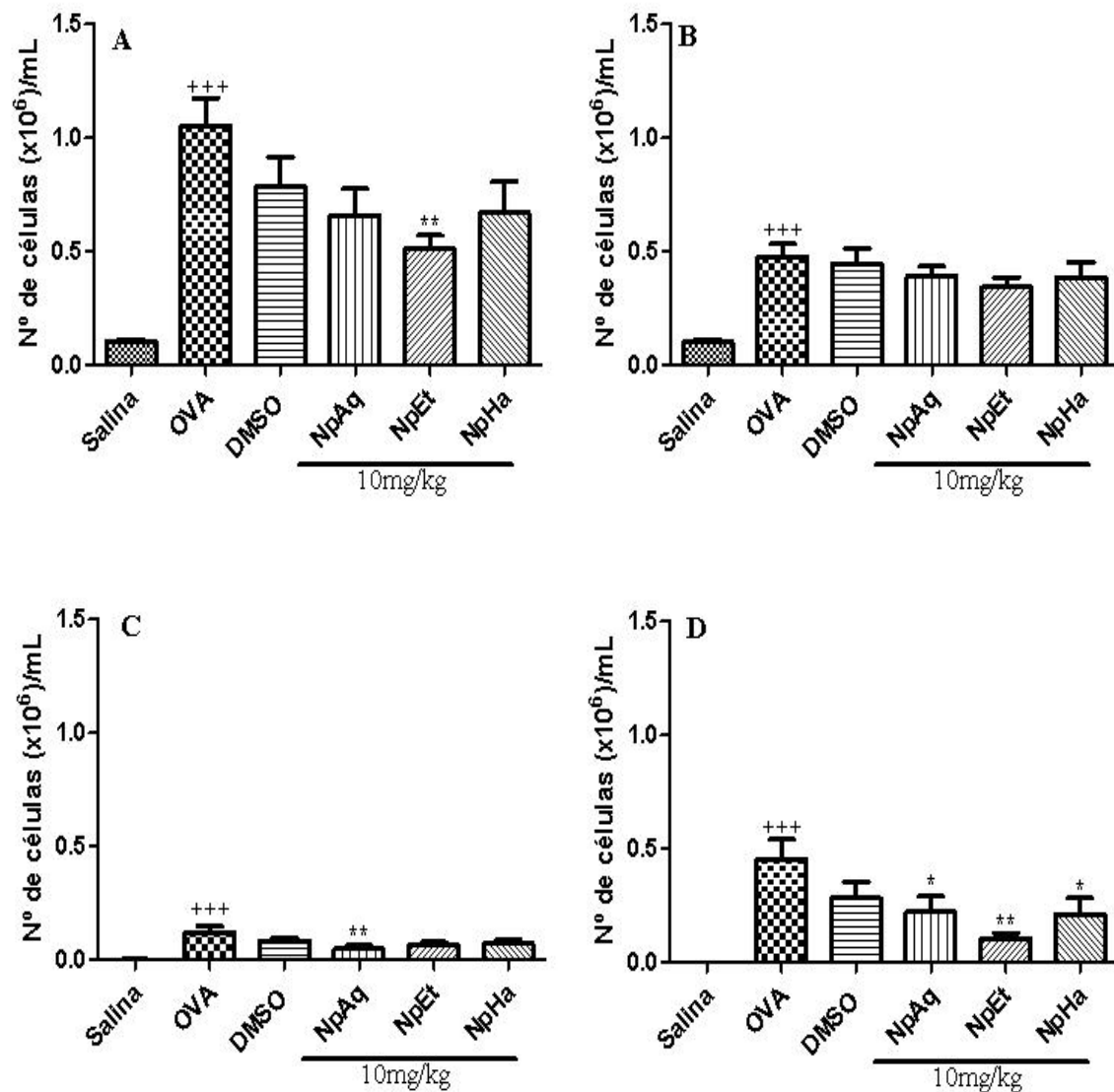


Figura 5: Análise dos efeitos dos extratos aquoso (NpAq), etanólico (NpEt) e hidroalcoólico (NpHa) de *Nidularium procerum* na dose de 10 mg/Kg na inflamação alérgica pulmonar no BAL. A: Contagem total de leucócitos no BAL. B: mononucleares, C: Neutrófilos e D: Eosinófilos. Camundongos foram sensibilizados por via i. p. com OVA (10 µg/camundongo) e Al(OH)₃ a 10 mg/mL, no dia 1 e no dia 10. Do dia 19 ao dia 24 os camundongos foram desafiados, por aerolização com salina ou solução de OVA diluída em salina a 2,5%, por 20 mim. Os resultados expressam média ± EPM de 2 experimentos (n=12). Estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. *p< 0,05, **p< 0,01 em relação a OVA. +++, p<0,001 em relação ao controle.

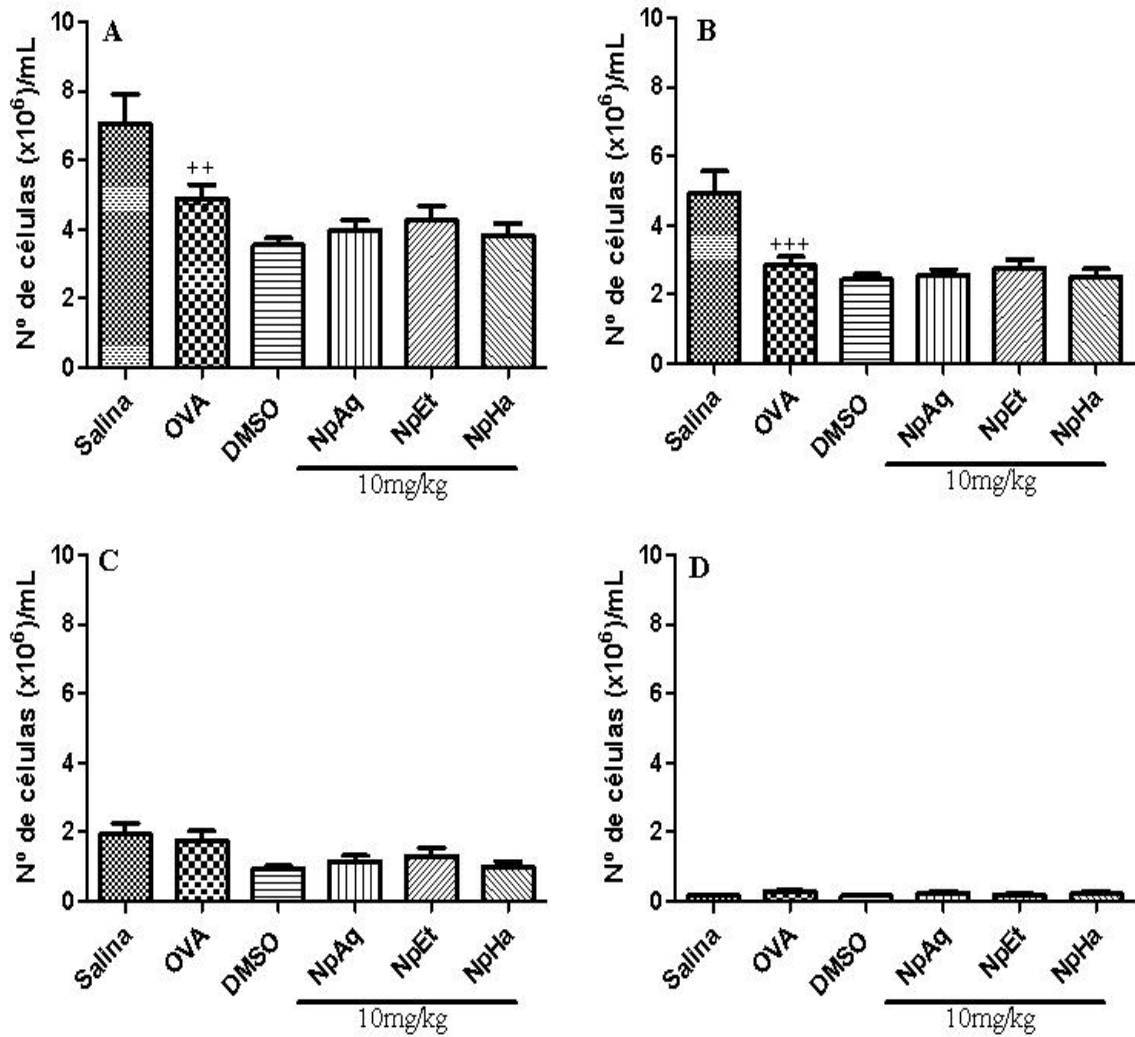


Figura 6: Análise dos efeitos dos extratos aquoso (NpAq), etanólico (NpEt) e hidroalcoólico (NpHa) de *Nidularium procerum* na dose de 10 mg/Kg na inflamação alérgica pulmonar no SANGUE. A: Contagem total de leucócitos no sangue. B: Mononucleares, C: Neutrófilos e D: Eosinófilos. Camundongos tratados e 1h após o tratamento, foram sensibilizados por via i. p. com OVA (10 µg/camundongo) e Al(OH)₃ a 10 mg/mL, no dia 1 e no dia 10. Do dia 19 ao dia 24 os camundongos foram desafiados, por aerolização com salina ou solução de OVA diluída em salina a 2,5%, por 20 mim. Os resultados expressam média ± EPM de 2 experimentos (n=12). Estatística realizada pelo método de Newman-Keuls. ++ p<0,01, +++ p<0,001, em relação ao controle.

Após a análise do sangue, também foi analisada a celularidade da medula óssea dos animais. Na figura 7A encontra-se o resultado da contagem de leucócitos totais, na qual não foi observado diferenças entre os grupos. No grupo NpHa houve uma tendência de aumento de 20% em relação a OVA, mas sem significância ($p>0,05$). Resultados semelhantes são mostrados na figura 7B que analisa as células mononucleares na medula óssea. Não foi observado diferença entre os grupos salina e OVA, os tratamentos não aumentaram o número de células mononucleares, variando de $2,05 \pm 0,29 \times 10^6/\text{mL}$ nos animais tratados com DMSO 1%, a $2,52 \pm 0,49 \times 10^6/\text{mL}$ no grupo NpHa, onde novamente ocorreu um ligeiro aumento (30%), mas não significativo. Analisando os neutrófilos, observamos que houve um pequeno aumento no número dos mesmos no grupo OVA em relação ao da salina, embora não significativo. Os tratamentos não causaram mudanças significativas nos neutrófilos em relação ao grupo OVA, como nas análises anteriores dos outros tipos celulares, variando de $1,93 \pm 0,15 \times 10^6/\text{mL}$, no grupo NpEt, a $2,53 \pm 0,39 \times 10^6/\text{mL}$, no grupo NpHa. Assim como no sangue, os eosinófilos constituem as células com menor porcentagem na medula óssea (fig. 7D). Embora sem diferença estatística, houve um aumento no número de eosinófilos no grupo OVA em comparação ao grupo salina. O tratamento com NpEt diminuiu o número destas células em $36,14 \pm 18,82\%$ ($p>0,05$). O tratamento com DMSO 1% não acarretou mudanças na quantidade de eosinófilos em relação ao grupo OVA.

4.2 – Estudos *in vitro*: cultivo de esplenócitos

Para definir a concentração de dexametasona a ser utilizada como droga inibidora padrão da proliferação celular, testou-se várias concentrações da mesma sobre esplenócitos. A figura 8 mostra o efeito da dexametasona sobre esplenócitos estimulados com concanavalina A (ConA). A ConA estimulou a proliferação das células em 1.700%, e a dexametasona inibiu a mesma de forma concentração-dependente. A concentração de dexametasona de $0,005 \mu\text{g}/\text{mL}$ inibiu a proliferação em $71,1 \pm 7,7\%$, a de $0,01 \mu\text{g}/\text{mL}$ inibiu $81,2 \pm 6,1\%$, a de $0,05 \mu\text{g}/\text{mL}$ inibiu $91,0 \pm 0,6\%$ e a de $0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$ inibiu $92,2 \pm 0,5\%$.

A figura 9 mostra o efeito de diferentes concentrações de OVA na estimulação da proliferação de esplenócitos, utilizando protocolos de sensibilização mencionados no item 3.3 em métodos, com exceção do animal SAL/SAL, que recebeu somente salina. Este experimento foi realizado com o objetivo de comparar, entre os diferentes grupos de sensibilização, o percentual de proliferação celular *in vitro* à OVA, e definir a melhor

concentração de OVA a ser utilizada para estimular a proliferação de esplenócitos nos experimentos futuros. Os esplenócitos dos animais do grupo OVA/SAL (fig. 9B) apresentaram um aumento significativo na proliferação celular quando estimulados *in vitro* pela OVA, em relação à cultura controle. O aumento da proliferação celular induzido pela OVA foram de 182 %, 189 % e 183 %, com as concentrações de 10 µg/mL, 20 µg/mL e 50 µg/mL (fig. 9B), respectivamente, em relação ao seu respectivo controle (1.679 ± 146 cpm). Este aumento na proliferação induzido pela OVA foi maior do que aquele, observado nos animais do grupo OVA/OVA (fig. 9C). O aumento na proliferação celular deste grupo foram de 151 %, 165% e 152 %, com as concentrações de 10 µg/mL, 20 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente, em relação ao seu respectivo controle. A partir destes dados, os ensaios *in vitro* para análise dos extratos de *N. procerum* passaram a ser realizados com os animais sensibilizados com OVA no dia 1 e 10 com OVA, sendo a cultura realizada no dia 18. Também optamos por utilizar a OVA na concentração de 50 µg/mL nos experimentos posteriores por não apresentar diferença significativa entre as outras concentrações testadas e por esta concentração OVA ser, também citada na literatura (Lee e cols., 2006). Além disso, quando comparamos a proliferação espontânea dos esplenócitos de animais dos diferentes grupos (fig. 10), observamos que os esplenócitos do animal OVA/SAL apresentaram um aumento de 70,70 % ($p < 0,01$) na proliferação espontânea, em relação às células do animal SAL/SAL, enquanto os esplenócitos do animal OVA/OVA apresentaram um aumento de 50,64% ($p > 0,05$) em relação ao mesmo grupo (SAL/SAL), mostrando que as células do animal OVA/SAL estão mais ativadas.

Nas figuras 11, 12 e 13 observamos os efeitos dos diferentes extratos de *N. procerum* na proliferação celular de esplenócitos, determinada pela incorporação de timidina tritiada (^3H) ao DNA e na atividade redutora mitocondrial, determinada pelo ensaio do MTT, de animais sensibilizados *in vivo* duas vezes com OVA, e não desafiados com OVA ou SAL. A atividade mitocondrial avalia a viabilidade celular pela capacidade das células por desidrogenases mitocondriais em reduzirem o sal de tetrazol em cristais de formazan.

Na figura 11A observamos o efeito do NpAq na ARM de células não estimuladas. Nenhuma concentração de *N. procerum* induziu alteração significativa. A concentração de NpAq de 50 µg/mL inibiu a ARM em $13,67 \pm 7,94\%$ e a concentração de 100 µg/mL inibiu $22,84 \pm 2,53\%$, em relação ao controle. Na figura 11C observamos que o extrato NpAq induziu, na ausência de OVA, aumento na proliferação de esplenócitos: as concentrações de 10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL aumentaram $34,44 \pm 23,50\%$, $103,02 \pm 36,19\%$, e $151,23 \pm 36,85\%$, respectivamente, em relação ao controle.

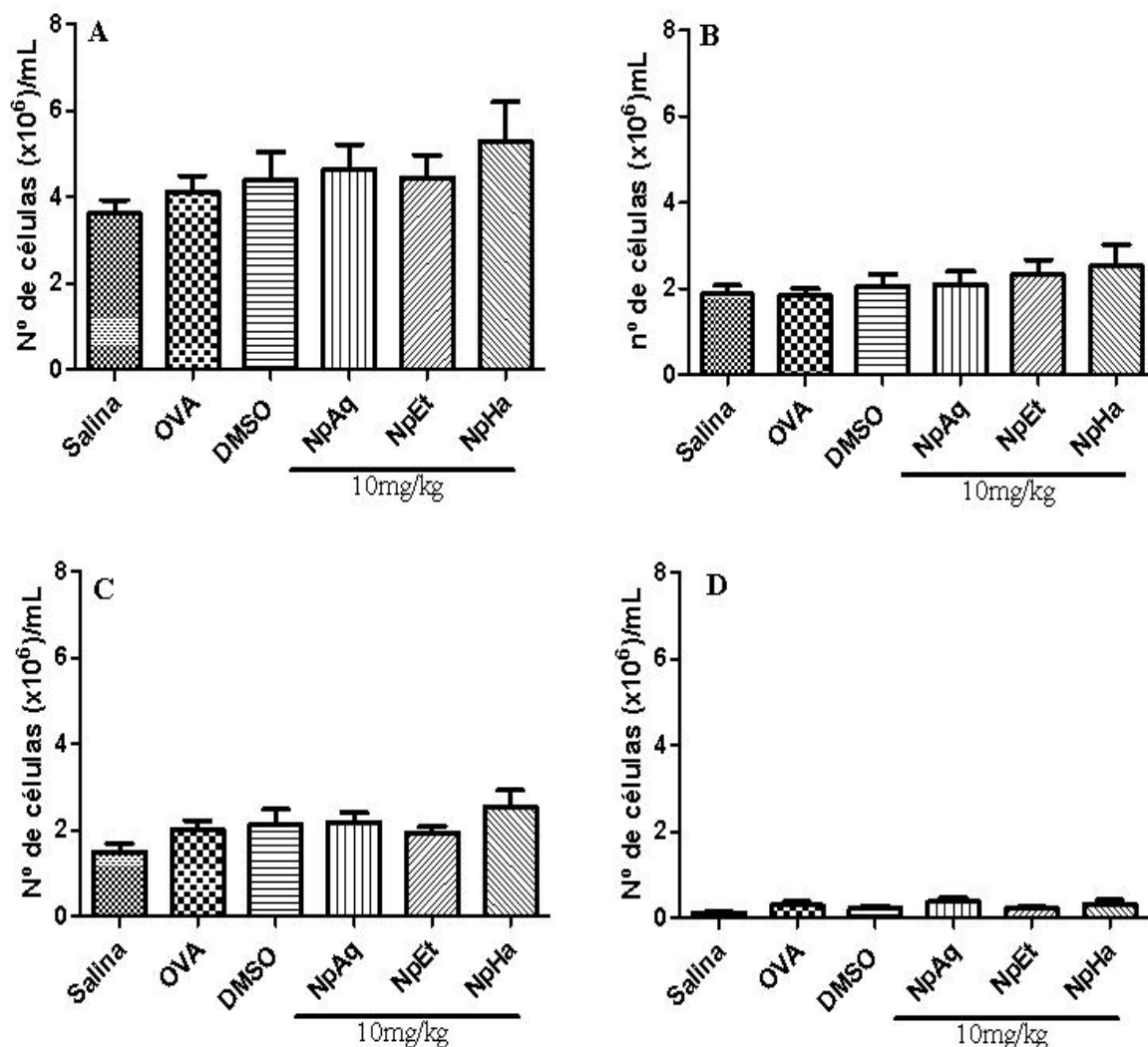


Figura 7: Análise dos efeitos dos extratos aquoso (NpAq), etanólico (NpEt) e hidroalcoólico (NpHa) de *Nidularium procerum* na dose de 10 mg/mL na inflamação alérgica pulmonar (MEDULA ÓSSEA). A: Contagem total de leucócitos na MEDULA. B: mononucleares, C: Neutrófilos e D: Eosinófilos. Camundongos foram sensibilizados por via i.p. com OVA (10 µg/camundongo) e Al(OH)₃ a 10 mg/mL, no dia 1 e no dia 10. Do dia 19 ao dia 24 os camundongos foram desafiados, por aerolização com salina ou solução de OVA diluída em salina a 2,5%, por 20 min. Os resultados expressam média ± DPM de 2 experimentos. Estatística realizada pelo método de Newman-Keuls.

Ainda na figura 11 observamos que o estímulo com OVA acarretou em um aumento na proliferação das células específicas para este antígeno. Esse efeito variou de 50 a 60% em relação às células sem estímulo, no ensaio de MTT (fig. 11B). No ensaio de proliferação podemos observar melhor este aumento da proliferação, que variou de 170 a 200% (fig. 11D). Apesar das diferenças não serem significativas entre as células estimuladas com OVA tratadas e não tratadas com Np (figs. 11B e 11D), o extrato aquoso mostrou mais uma vez uma

tendência a induzir efeitos opostos em relação aos ensaios de MTT e proliferação. No MTT observamos diminuições ($p > 0,05$) de $7,32 \pm 4,10\%$ na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$, $10,27 \pm 7,54\%$ na de $50 \mu\text{g/mL}$, e $15,62 \pm 8,31 \%$ na de $100 \mu\text{g/mL}$, em relação ao grupo OVA.

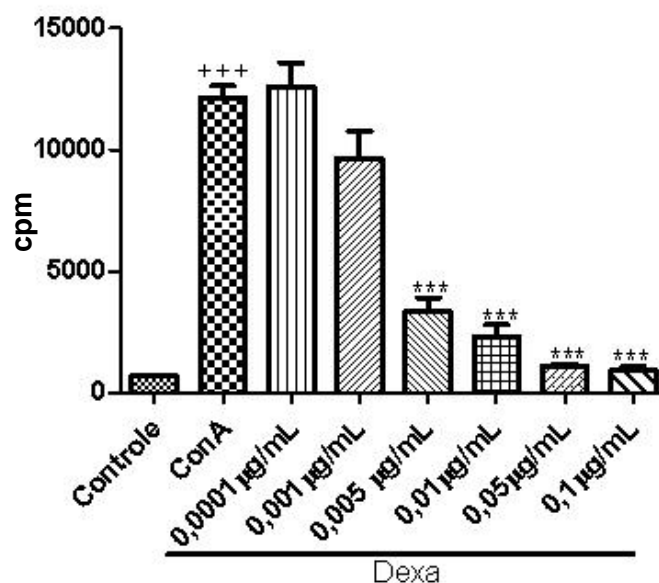


Figura 8: Efeito da dexametasona na proliferação de esplenócitos *in vitro*. Células estimuladas com ConA ($2,5\mu\text{g/mL}$). Esplenócitos ($1 \times 10^6 / \text{mL}$) foram cultivados com diferentes concentrações de dexa, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 a 37°C por 72h. Nas últimas 24h de incubação foram adicionados a placa de cultura $25 \mu\text{L}$ /poço de solução de metil- ^3H -timidina a $10 \mu\text{Ci/mL}$. Os resultados expressam média \pm EPM de 2 experimentos com triplicatas. Estatística realizada pelo método de Tukey. +++ $p < 0,001$ em relação ao controle, *** $p < 0,001$ em relação à ConA.

O extrato etanólico, como mostra a figura 12, também apresentou maior efeito inibidor que o aquoso na presença de OVA, tanto em relação à sobrevivência (MTT) quanto à proliferação celular. No MTT (fig 12A), a concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ inibiu a ARM das células em $27,26 \pm 1,40\%$ e a de $100 \mu\text{g/mL}$ inibiu $92,51 \pm 2,06\%$, em relação as células estimuladas com OVA e não tratadas com *N. procerum*. Com relação à proliferação celular (fig. 12B), ambas as concentrações inibiram a resposta: $73,00 \pm 8,90\%$ com a concentração de $50 \mu\text{g/mL}$, e $95,00 \pm 0,20\%$ com a concentração de $100 \mu\text{g/mL}$. A concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ foi ainda mais potente do que a dexa, a qual inibiu a proliferação em torno de 75% em ambos os ensaios (figs. 12C e 12D).

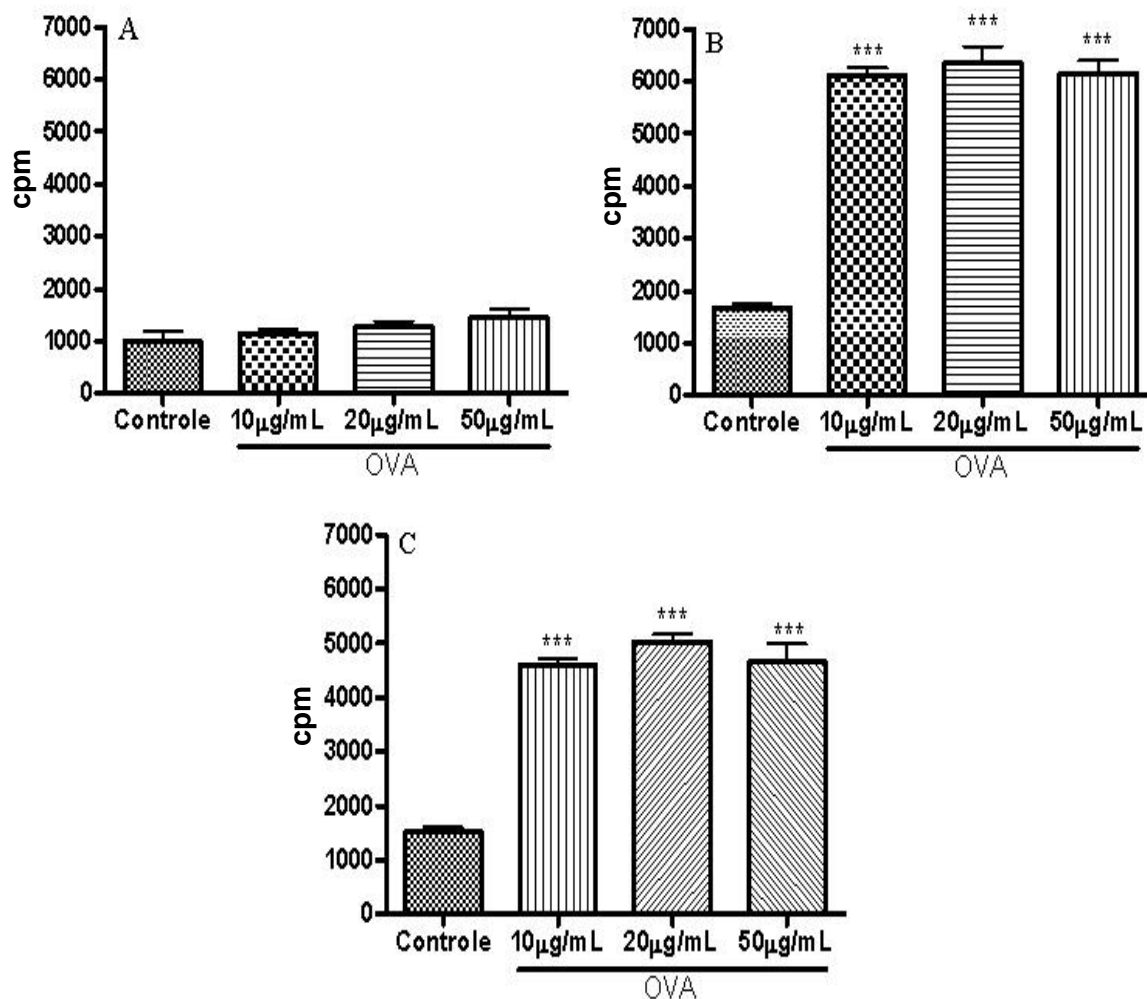


Figura 9: Efeito da concentração de ovalbumina na proliferação de esplenócitos de camundongos Balb/C. A: Animais sensibilizados e aerolizados com salina (SAL/SAL), B: Animais sensibilizados com OVA e aerolizados com salina (OVA /SAL), C: Animais sensibilizados e aerolizados com OVA (OVA/OVA), correspondendo ao controle positivo do ensaio de inflamação alérgica pulmonar. Esplenócitos (1×10^6 mL) foram cultivados com diferentes concentrações de OVA, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 a 37°C por 72h. Nas últimas 24h de incubação foram adicionados a placa de cultura 25 µL/poço de solução de metil- ^3H -timidina a $10 \mu\text{Ci/mL}$. Os resultados expressam média \pm DP de 1 experimento representativo com triplicatas. Estatística realizada pelo método de Tukey. *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

A figura 13 mostra os efeitos do extrato hidroalcoólico de *N. procerum* na atividade redutora mitocondrial e na proliferação de esplenócitos. Observamos que este extrato, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, apresentou uma tendência em interferir com a atividade redutora mitocondrial, com uma inibição de $34,68 \pm 22,84\%$ e $32,73 \pm 3,55\%$, respectivamente, na sobrevivência da célula não estimulada com OVA quando comparado ao

controle, porém estes efeitos não foram estatisticamente significativos (fig. 13A). O mesmo ocorreu no ensaio de proliferação celular (fig. 13B), com as concentrações de 50 µg/mL, inibindo em $26,97 \pm 16,11\%$ (2.077 ± 513 cpm), e de 100 µg/mL, inibindo em $50,34 \pm 19,37\%$ (1.495 ± 450 cpm) o efeito, em relação ao controle ($2.627 \pm 458,90$). A concentração de 10 µg/mL apresentou uma inibição de apenas $7,03 \pm 0,16\%$ ($p > 0,05$).

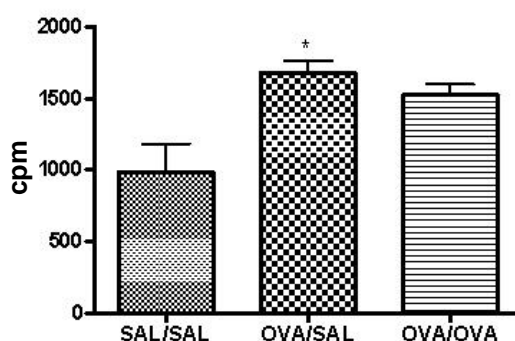


Figura 10: Comparação da proliferação espontânea de esplenócitos de animais submetidos a diferentes protocolos de sensibilização e aerolização. As células (1×10^6 /mL) foram cultivados sem OVA, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 a 37°C por 72h. Nas últimas 24h de incubação foram adicionados a placa de cultura $25\mu\text{L}$ /poço de solução de metil- ^3H -timidina a $10\mu\text{Ci/mL}$. Os resultados expressam média \pm DP de 1 experimento representativo com triplicatas. Estatística realizada pelo método de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Quando avaliamos o efeito do extrato hidroalcoólico sobre as células estimuladas com OVA, o mesmo apresentou uma tendência à diminuição da atividade redutora mitocondrial (fig. 13C). Com a concentração de 50 µg/mL a inibição foi de $31,19 \pm 33,96\%$, enquanto que com a concentração de 100 µg/mL a inibição foi de $38,70 \pm 25,02\%$, no entanto essas diferenças não foram significativas em relação ao controle. No ensaio de proliferação celular estimulada com OVA (fig 13D), a inibição ocorreu de forma concentração dependente, sendo a concentração de 100 µg/mL a que apresentou maior nível de inibição, de $70,83 \pm 18,81\%$, estatisticamente significativa. As concentrações de 10 µg/mL e de 50 µg/mL tenderam ($p > 0,05$) a reduzir a resposta, inibindo-a em $7,03 \pm 0,16\%$ e $52,84 \pm 16,44\%$, respectivamente. A dexta inibiu a proliferação e a sobrevivência dos esplenócitos não estimulados e reestimulados *in vitro* com OVA.

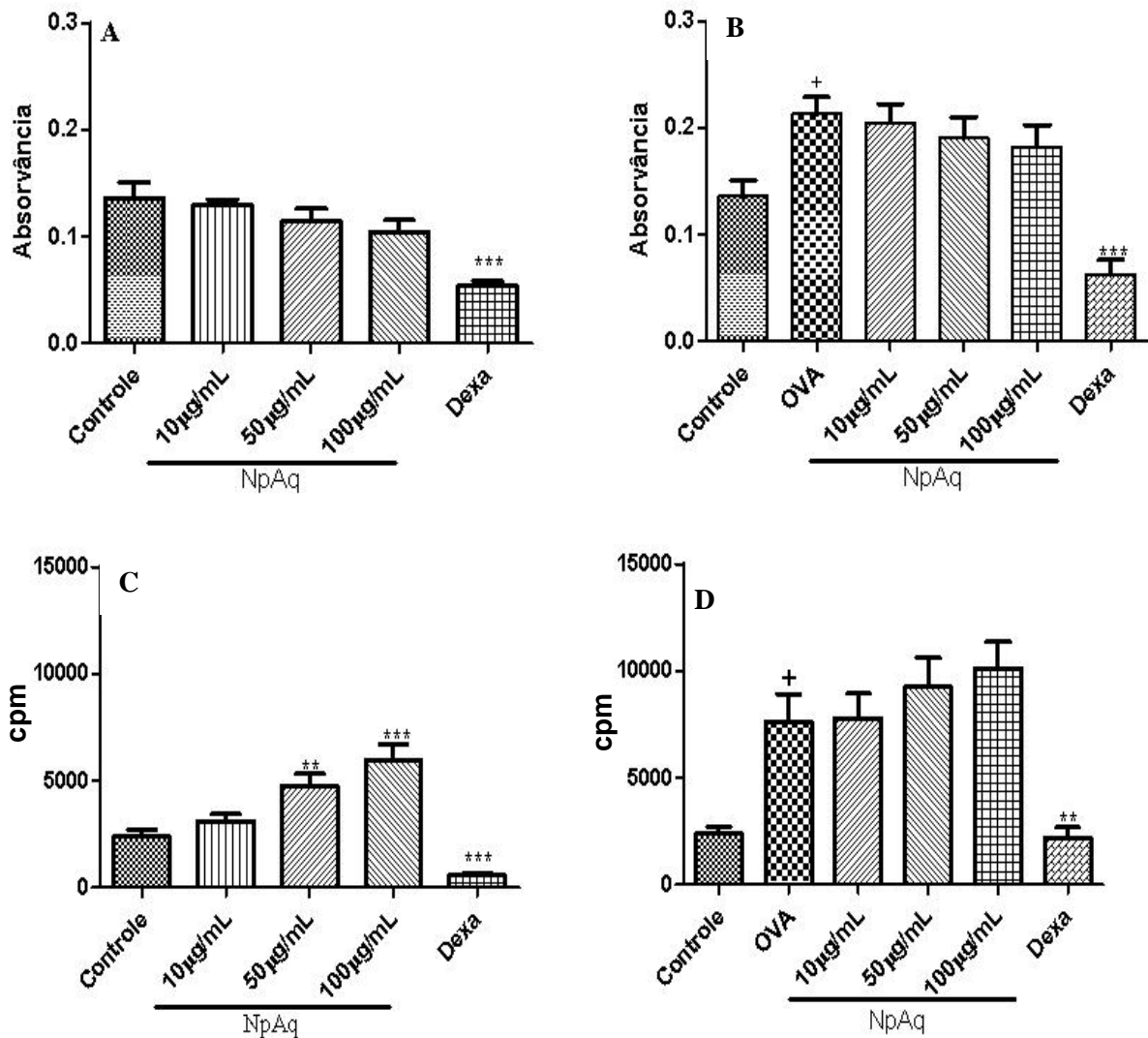


Figura 11: Efeito do extrato aquoso de *N. procerum* na atividade redutora mitocondrial (A,B) e proliferação de esplenócitos (C,D). A: ARM (MTT) de células não estimuladas com OVA, B: ARM de células estimuladas com OVA (50 µg/mL), C: Proliferação (timidina) de células não estimuladas com OVA, D: Proliferação de células estimuladas com OVA (50 µg/mL). Camundongos foram sensibilizados por via i. p. com OVA (10 µg/camundongo) e Al(OH)₃ a 10 mg/mL, no dia 1 e no dia 10. Esplenócitos foram retirados no dia 18 (1,25x10⁶/mL) e cultivados com diferentes concentrações dos extratos, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C por 72h. MTT: nas últimas duas horas de cultura, foi adicionado a cada poço 10 µL da solução de MTT a 5 mg/mL. Timidina :Nas últimas 24h de incubação foram adicionados a placa de cultura 25 µL/poço de solução de metil-³H-timidina 10 µCi/mL. A dexametasona foi utilizada na concentração de (0,05 µg/mL). Os resultados expressam média ± EPM de pelo menos 2 experimentos. Estatística realizada pelo método de Tukey. ** < 0,01, ***,p< 0,001 em relação a OVA. + p< 0,05, em relação ao controle.

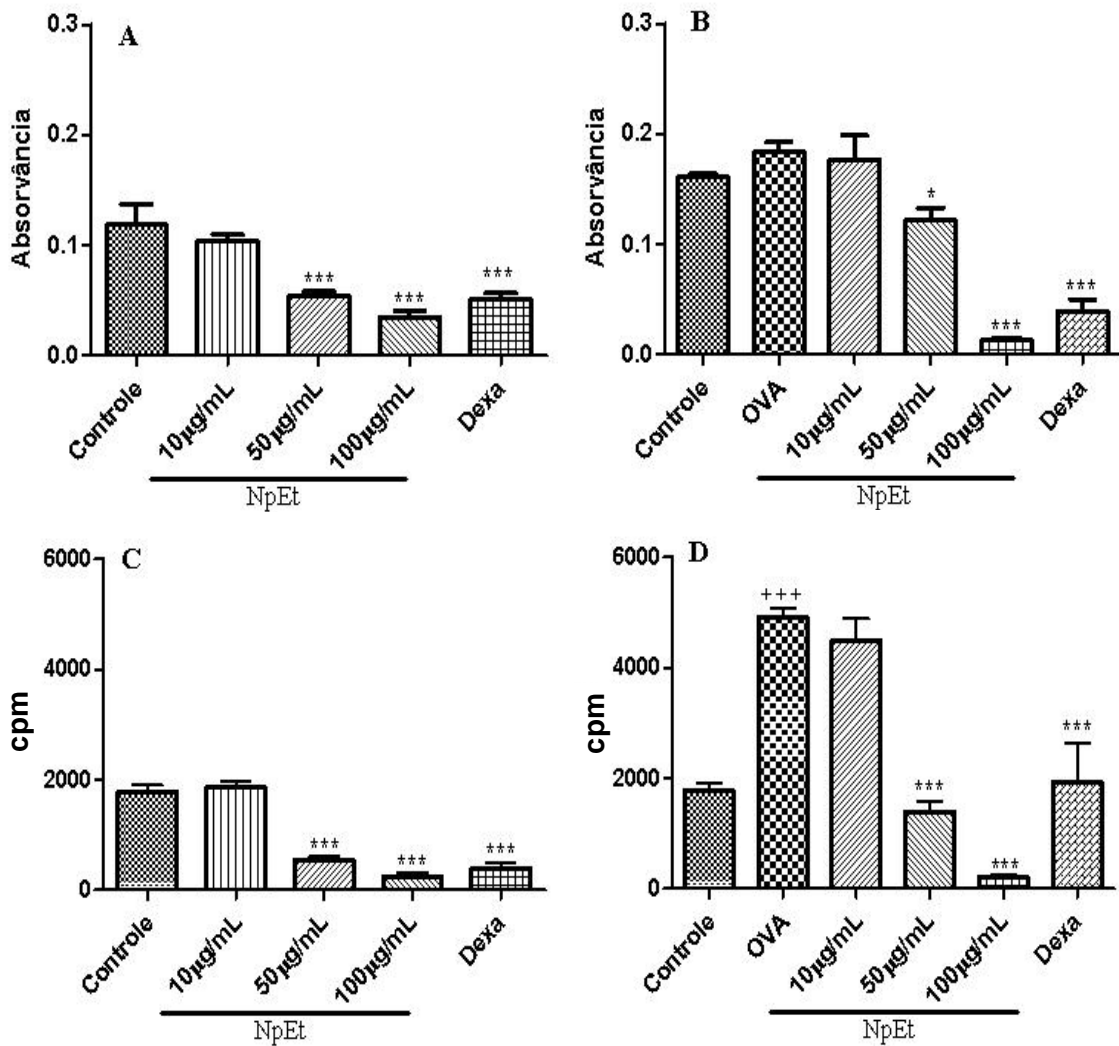


Figura 12: Efeito do extrato etanólico de *N. procerum* na atividade redutora mitocondrial (A, B) e proliferação de esplenócitos (C, D). A: ARM (MTT) de células não estimuladas com OVA, B: Proliferação (timidina) de células não estimuladas com OVA, C: ARM de células estimuladas com OVA (50 µg/mL), D: Proliferação de células estimuladas com OVA (50 µg/mL). Camundongos foram sensibilizados por via i. p. com OVA (10 µg/camundongo) e Al(OH)₃ a 10 mg/mL, no dia 1 e no dia 10. Esplenócitos foram retirados no dia 18 (1,25x10⁶/mL) e cultivados com diferentes concentrações dos extratos, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C por 72h. MTT: nas últimas duas horas de cultura, foi adicionado a cada poço 10 µL da solução de MTT a 5 mg/mL. Timidina :Nas últimas 24h de incubação foram adicionados a placa de cultura 25 µL/poço de solução de metil-³H-timidina 10 µCi/mL. A dexametasona foi utilizada na concentração de (0,05 µg/mL). Os resultados expressam média ± EPM de pelo menos 2 experimentos. Estatística realizada pelo método de Tukey. *p< 0,05, ***p< 0,001 em relação a OVA. +++ p<0,001 em relação ao controle.

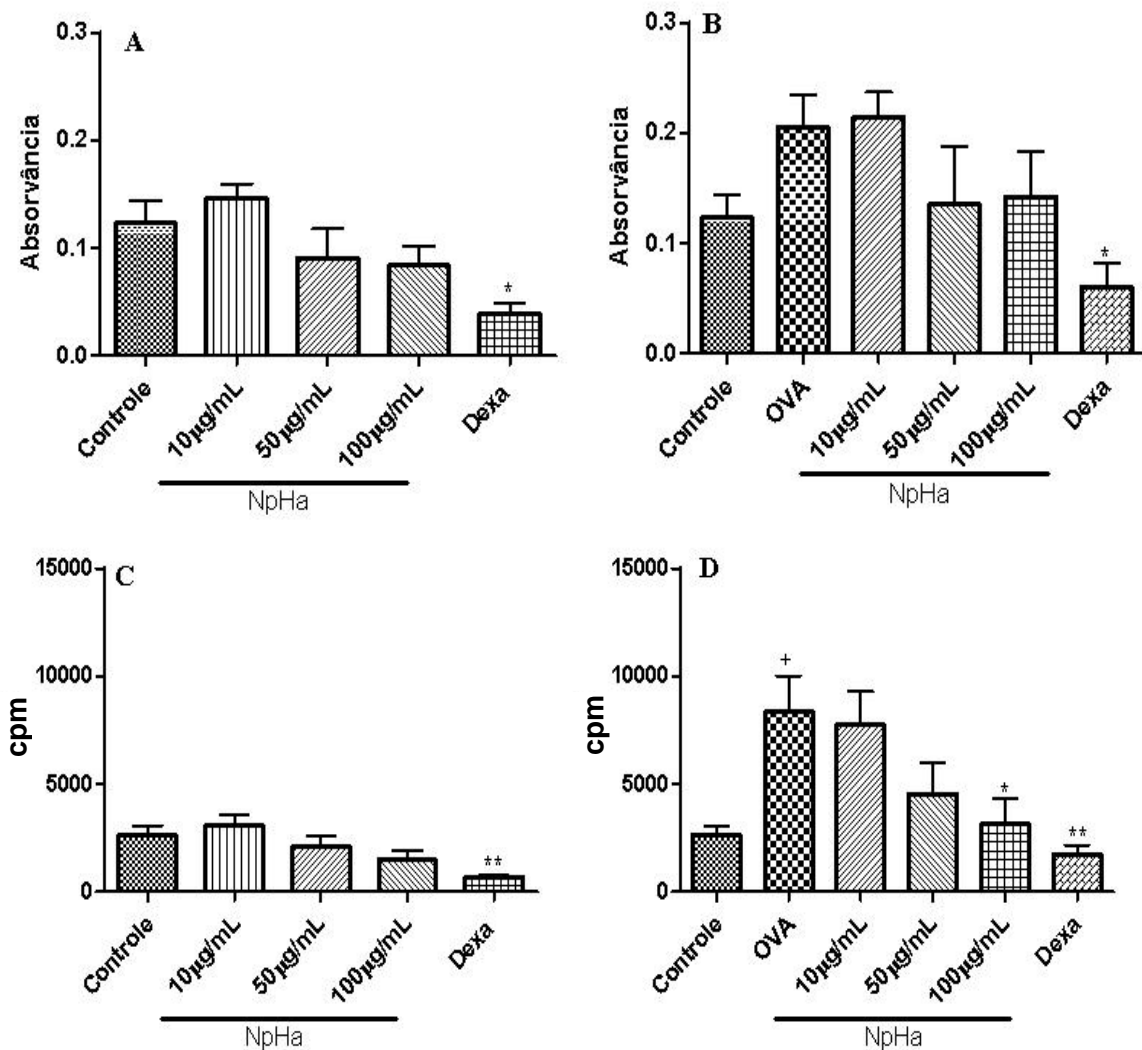


Figura 13: Efeito do extrato hidroalcoólico de *N. procerum* na atividade redutora mitocondrial (A, B) e proliferação de esplenócitos (C, D). A: ARM (MTT) de células não estimuladas com OVA, B: Proliferação (timidina) de células não estimuladas com OVA, C: ARM de células estimuladas com OVA (50 µg/mL), D: Proliferação de células estimuladas com OVA (50 µg/mL). Camundongos foram sensibilizados por via i. p. com OVA (10 µg/camundongo) e Al(OH)₃ a 10 mg/mL, no dia 1 e no dia 10. Esplenócitos foram retirados no dia 18 (1,25x10⁶/mL) e cultivados com diferentes concentrações dos extratos, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C por 72h. MTT: nas últimas duas horas de cultura, foi adicionado a cada poço 10 µL da solução de MTT a 5 mg/mL. Timidina: Nas últimas 24h de incubação foram adicionados a placa de cultura 25 µL/poço de solução de metil-³H-timidina 10 µCi/mL. A dexametasona foi utilizada na concentração de (0,05 µg/mL). Os resultados expressam média ± EPM de pelo menos 2 experimentos. Estatística realizada pelo método de Tukey. *p< 0,05, **p< 0,01, em relação a OVA. +p<0,05, em relação ao controle.

Como os extratos hidroalcoólico e etanólico foram dissolvidos em etanol a 70%, fez-se necessário a realização de experimentos *in vitro* controle, utilizando-se na cultura o etanol, para excluirmos a possibilidade do efeito inibidor observado com estes extratos ser confundido com um possível efeito do etanol. A concentração mais alta de etanol utilizada nos experimentos *in vitro* com os referidos extratos de *N. procerum* na foi de 0,08%, com a concentração dos extratos de 100 µg/mL.

A figura 14 mostra o efeito do etanol na atividade redutora mitocondrial (fig. 14A) e proliferação (fig. 14B) de esplenócitos não estimulados. Não observamos alterações significativas induzidas pelo etanol em ambos os ensaios. No MTT a absorvância do controle foi de $0,115 \pm 0,020$, enquanto que as absorvâncias obtidas com as diferentes concentrações de etanol testadas ficaram entre $0,109 \pm 0,006$, com a concentração de 0,025% de etanol, e $0,119 \pm 0,011$, com a concentração de 1%. No ensaio de timidina, o etanol não alterou significativamente a proliferação espontânea das células, sendo a proliferação do controle de 2.282 ± 309 cpm. Estes resultados demonstram que o etanol não interfere nos efeitos observados com os extratos de *N. procerum*, principalmente o efeito inibidor apresentado pelos extratos etanólico e hidroalcoólico.

Quando observamos o efeito do etanol nas células estimuladas com OVA (fig. 15), observamos que não houve alteração na viabilidade das células (fig. 15A). No ensaio de proliferação celular (fig. 15B), a cpm das células estimuladas com OVA foi de 9.462 ± 2.202 , e as cpm das células tratadas com etanol foram de 8.378 ± 1.996 e de 9.168 ± 2.286 , com as concentrações de etanol de 0,125% e 1%, respectivamente, não apresentando, portanto, alterações significativas.

A tabela 2 mostra o efeito do extrato aquoso de *N. procerum* na produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Observamos que o extrato aquoso foi capaz de inibir significativamente a produção de IL-4 com as concentrações de 50 e 100 µg/mL, as quais apresentaram índices de inibição próximos ao tratamento com dexta. A produção de IL-4 por células não estimuladas *in vitro* com OVA foi muito baixa ($0,1 \pm 0,1$ pg/mL), mas o estímulo com OVA aumentou a produção de IL-4 para $55,5 \pm 27,5$ pg/mL. As células reestimuladas *in vitro* com OVA e tratadas com o extrato aquoso de Np nas concentrações de 10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, produziram $38,5 \pm 15,5$ pg/mL, $15,5 \pm 10,5$ pg/mL e $10,00 \pm 2,0$ pg/mL de IL-4, respectivamente, resultando nos índices de inibição apresentados na tabela 2. Com relação à IL-5, pouco foi detectado nas células não estimuladas com OVA ($1,5 \pm 1,5$ pg/mL). A produção pelas células estimuladas com OVA foi de $98,5 \pm 35,5$ pg/mL, somente a dose de 100 µg/mL inibiu significativamente a liberação de IL-5. A dexta inibiu significativamente a

produção desta citocina. Com relação à IL-10, ocorreu uma grande variação na sua produção pelas células estimuladas com OVA e tratadas com o extrato aquoso, não permitindo a observação de alterações significativas. As células estimuladas com OVA não tratadas com o extrato produziram $113,5 \pm 32,5$ pg/mL de IL-10. Quando analisamos a IL-13, observamos que a sua produção pelas células estimuladas com OVA e sem tratamento pelo extrato foi de $376,00 \pm 18,00$ pg/mL e que o tratamento com o extrato na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ diminuiu ($p < 0,05$) esta produção para $180,00 \pm 30,00$ pg/mL. A inibição observada com a concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ não foi significativa devido à grande diferença entre os experimentos.

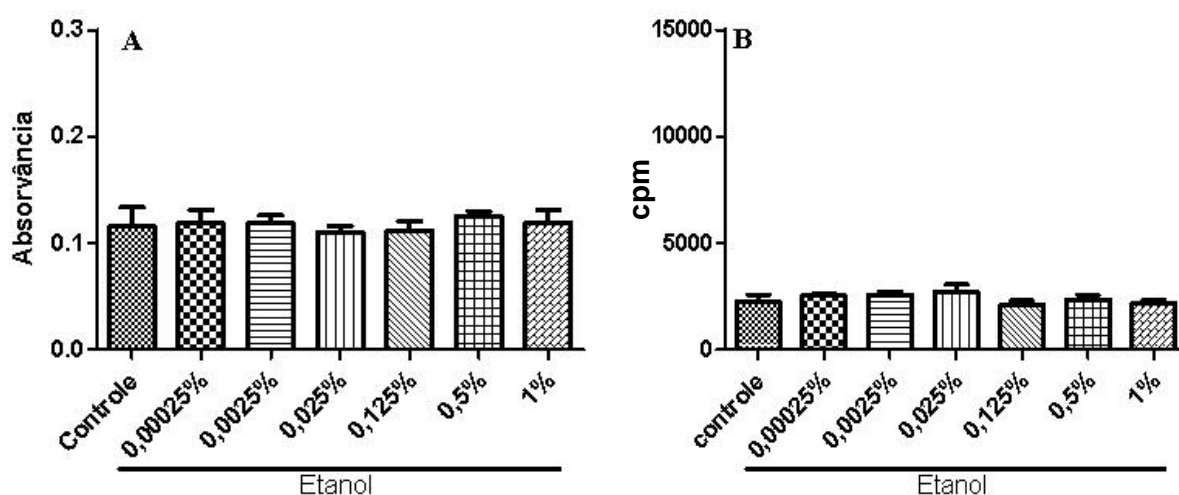


Figura 14: Efeito do etanol em esplenócitos não estimulados com OVA. A: Atividade redutora mitocondrial (MTT), B: Proliferação celular (timidina). Camundongos foram sensibilizados por via i. p. com OVA ($10 \mu\text{g}/\text{camundongo}$) e $\text{Al}(\text{OH})_3$ a 10 mg/mL , no dia 1 e no dia 10. Esplenócitos foram retirados no dia 18 ($1,25 \times 10^6/\text{mL}$) e cultivados com diferentes concentrações de etanol, na ausência de OVA, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 a 37°C por 72h. MTT: nas últimas duas horas de cultura, foi adicionado a cada poço $10 \mu\text{L}$ da solução de MTT a 5 mg/mL . Timidina : Nas últimas 24h de incubação foram adicionados a placa de cultura $25 \mu\text{L}/\text{poço}$ de solução de metil- ^3H -timidina $10 \mu\text{Ci}/\text{mL}$. Os resultados expressam média \pm EPM de pelo menos 2 experimentos. Não foram observadas diferenças significativas pelo método de Tukey.

O extrato etanólico foi aquele com maior capacidade de inibição da produção *in vitro* de citocinas por esplenócitos reestimulados *in vitro* com OVA, como mostrado na tabela 3. Com a concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ não observamos inibição da produção de IL-4, mas com a concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ do extrato, as células produziram somente $21,5 \pm 13,5$ pg/mL, em comparação com a produção de $55,5 \pm 27,5$ pg/mL na presença de OVA e sem extrato. A inibição da produção de IL-4 com a concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ foi tão intensa que a IL-4 nem pode ser detectada no ensaio. Na análise da produção de IL-5, a concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ do extrato reduziu a produção da citocina, de $98,5 \pm 35,5$ pg/mL, obtida na presença

apenas de OVA, para $22,5 \pm 0,5$ pg/mL ($p < 0,05$). Tanto a concentração do extrato etanólico de $50 \mu\text{g/mL}$ quanto a de $100 \mu\text{g/mL}$ reduziram significativamente a produção de IL-10 para $13,0 \pm 3,0$ pg/mL e $1,5 \pm 1,5$ pg/mL, respectivamente, em relação à produção observada apenas com a OVA ($113,5 \pm 32,5$ pg/mL). Com relação à IL-13, embora a inibição tenha sido alta com a concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ ($80,9 \pm 19,0\%$), não houve diferença estatística, sendo significativa a inibição somente com a concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ ($76,3 \pm 4,7\%$), do extrato, sendo a produção de $75,0$ pg/mL somente na presença de OVA.

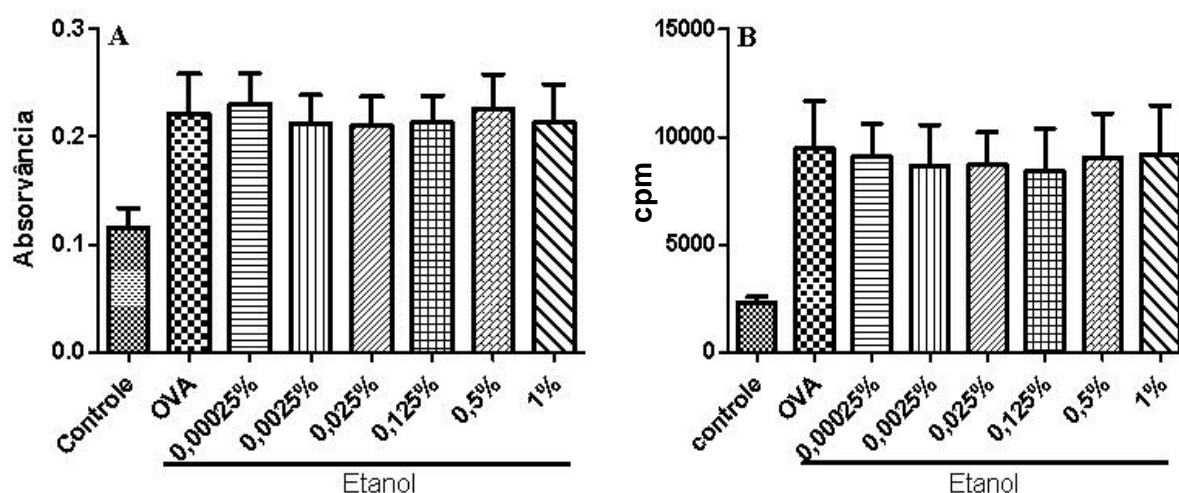


Figura 15: Efeito do etanol nas células reestimuladas *in vitro* com OVA ($50 \mu\text{g/mL}$). A: Atividade redutora mitocondrial (MTT), B: Proliferação celular (timidina). Camundongos foram sensibilizados por via i. p. com OVA ($10 \mu\text{g/camundongo}$) e $\text{Al}(\text{OH})_3$ a 10 mg/mL , no dia 1 e no dia 10. Esplenócitos foram retirados no dia 18 ($1,25 \times 10^6/\text{mL}$) e cultivados com diferentes concentrações de etanol, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 a 37°C por 72h. MTT: nas últimas duas horas de cultura, foi adicionado a cada poço $10 \mu\text{L}$ da solução de MTT a 5 mg/mL . Timidina: Nas últimas 24h de incubação foram adicionados a placa de cultura $25 \mu\text{L/poço}$ de solução de metil- ^3H -timidina $10 \mu\text{Ci/mL}$. Os resultados expressam média \pm EPM de 2 experimentos. Não foram observadas diferenças significativas pelo método de Tukey.

O extrato hidroalcoólico mostrou uma tendência à inibição da produção *in vitro* de citocinas (tabela 4), A produção de IL-4 foi inibida significativamente em relação ao controle (só com OVA) o qual produziu $55,5$ pg/mL da citocina, na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ e de $50 \mu\text{g/mL}$, devido a variação da concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ a diferença estatística não pode ser observada. Com relação a IL-5, onde o controle produziu 92 pg/mL, somente a concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ inibiu significativamente a liberação desta citocina. Devido a variação na inibição da liberação de IL-10 e IL-13, não houve diferença estatística.

Tabela 2: Percentual de inibição do extrato aquoso sobre a produção de citocinas por esplenócitos reestimulados *in vitro* com OVA.

Tratamento	concentração	IL-4	IL-5	IL-10	IL-13
Extrato	10 µg/mL	26.4 ± 8.5	36.3 ± 43.0	24.5 ± 16.3	51.6 ± 10.3 *
	50 µg/mL	75.4 ± 6.7 **	49.7 ± 13.8	3.5 ± 36.9	22.7 ± 8.2
	100 µg/mL	78.5 ± 7.0 **	58.1 ± 2.17**	19.4 ± 24.4	60.6 ± 39.4
Dexa	0,05 µg/mL	85.6 ± 3.5 **	95.2 ± 4.8 **	100 ***	87.8 ± 12.2 *

Camundongos foram sensibilizados por via i. p. com OVA (10 µg/camundongo) e Al(OH)₃ a 10 mg/mL, no dia 1 e no dia 10. Esplenócitos foram retirados no dia 18 (1,25x10⁶/mL) e cultivados com OVA (50 µg/mL), na ausência ou presença de diferentes concentrações do extrato, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C por 72h. Produção de citocinas nas células somente com OVA: 55,5 ± 27,5 (IL-4), 98,5 ± 35,5 (IL-5), 113,5 ± 32,5 (IL-10), 376,0 ± 18,0 (IL-13). Os resultados expressam média ± EPM dos índices de inibição de pelo menos 2 experimentos. * p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação às células estimuladas *in vitro* com OVA e não tratadas com o extrato. Estatística realizada pelo test *t* de Student.

Tabela 3: Percentual de inibição do extrato etanólico sobre a produção de citocinas por esplenócitos reestimulados *in vitro* com OVA.

Extrato	IL-4	IL-5	IL-10	IL-13
10 µg/mL	1.1 ± 9.6	47.6 ± 8.0 *	38.8 ± 16.6	36.6 ± 19.8
50 µg/mL	64.6 ± 6.8 *	56.0 ± 32.9	88.3±0.7 ***	76.3 ± 4.7 **
100 µg/mL	100 ***	73.5 ± 10.0 *	98.9±1.0 ***	80.9 ± 19.0

Camundongos foram sensibilizados por via i. p. com OVA (10 µg/camundongo) e Al(OH)₃ a 10 mg/mL, no dia 1 e no dia 10. Esplenócitos foram retirados no dia 18 (1,25x10⁶/mL) e cultivados com OVA (50 µg/mL), na ausência ou presença de diferentes concentrações do extrato, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C por 72h. Produção de citocinas nas células somente com OVA: 55,5 ± 27,5 (IL-4), 98,5 ± 35,5 (IL-5), 113,5 ± 32,5 (IL-10), 376,0 ± 18,0 (IL-13). Os resultados expressam média ± EPM dos índices de inibição de pelo menos 2 experimentos. * p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação às células estimuladas *in vitro* com OVA e não tratadas com o extrato. Estatística realizada pelo realizada pelo test *t* de Student.

Tabela 4: Percentual de inibição do extrato hidroalcoólico sobre a produção de citocinas por esplenócitos reestimulados *in vitro* com OVA.

Extrato	IL-4	IL-5	IL-10	IL-13
10 µg/mL	34.5 ± 3.7 *	17.6 ± 32.8	4.8 ± 24.4	20.3 ± 3.8
50 µg/mL	63.3 ± 9.4*	59.6 ± 17.5	69.4 ± 17.5	64.3 ± 16.9
100 µg/mL	75.9 ± 24.0	72.8± 11.9**	76.1 ± 23.9	74.3 ± 12.9

Camundongos foram sensibilizados por via i. p. com OVA (10 µg/camundongo) e Al(OH)₃ a 10 mg/mL, no dia 1 e no dia 10. Esplenócitos foram retirados no dia 18 (1,25x10⁶/mL) e cultivados com OVA (50 µg/mL), na ausência ou presença de diferentes concentrações do extrato, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C por 72h. Produção de citocinas nas células somente com OVA: 55,5 (IL-4), 92 (IL-5), 61 (IL-10), 111 (IL-13). Os resultados expressam média ± EPM dos índices de inibição de pelo menos 2 experimentos. * p<0,05 em relação às células estimuladas *in vitro* com OVA e não tratadas com o extrato. Estatística realizada pelo realizada pelo test *t* de Student.

4.3 - Análise Química dos Extratos de *Nidularium procerum*

Paralelamente a realização da avaliação da atividade antialérgica dos extratos (aquoso, hidroalcoólico e etanólico), obtidos de *N. procerum*, foi realizado o estudo químico. Nesse sentido, os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para obtenção dos perfis químicos. A análise cromatográfica indicou uma importante variação de acordo com tipo de extração utilizada. Cada extrato mostrou um perfil químico diferenciado, com destaque para o extrato aquoso (fig. 16), com sinais com tempo de retenção (tr) menores em região onde se concentram geralmente as substâncias fenólicas. Os extratos hidroalcoólico e etanólico possuem um perfil químico muito semelhante, somente diferem em relação à intensidade dos sinais, muito mais elevada para o extrato etanólico (Fig. 17). A característica principal desses extratos em relação ao aquoso é que as substâncias possuem tr maiores, sendo os terpenos a provável classe química predominante nesses dois extratos. Através das análises dos tr e dos espectros de ultravioleta foi possível identificar substâncias com tr iguais nos extratos, tais como: tr (32,47; 50,56; 51,56; 54,61; 58,71) presentes nos extratos etanólico e hidrialcoolico (fig. 18). A substância com tempo de retenção de 32;47 também esta presente no extrato aquoso, sendo pois comum aos três extratos. Os resultados farmacológicos indicam maior atividade do extrato etanólico, mostrando que uma maior concentração e variação dos sinais majoritários, é diretamente relacionada com a atividade apresentada. Os dados sugerem ainda que a extração em etanol parece ser mais efetiva, levando a concentração do(s) principio(s) ativo(s) responsável(ies) por esta bioatividade neste extrato.

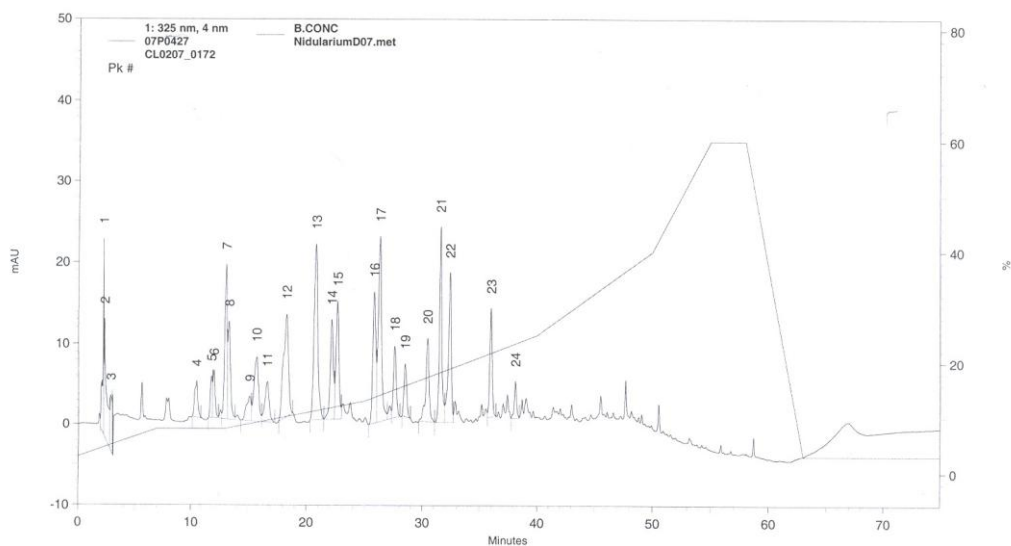


Figura 16: Perfil Químico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do Extrato Aquoso de *Nidularium procerum*. Foram utilizadas colunas de fase reversa (C₁₈). A fase móvel variou em gradiente linear de acetonitrila-água nas proporções de 10:90 v/v a 70:30 v/v em 60 min. Ambas as fases continham 0,05% de ácido trifluoroacético. A vazão da fase móvel permaneceu a 1 mL/min. Detecção por varredura de espectro de 200 a 400 nm com acompanhamento em 3 comprimentos de onda, 220nm, 260 nm e 340 nm.

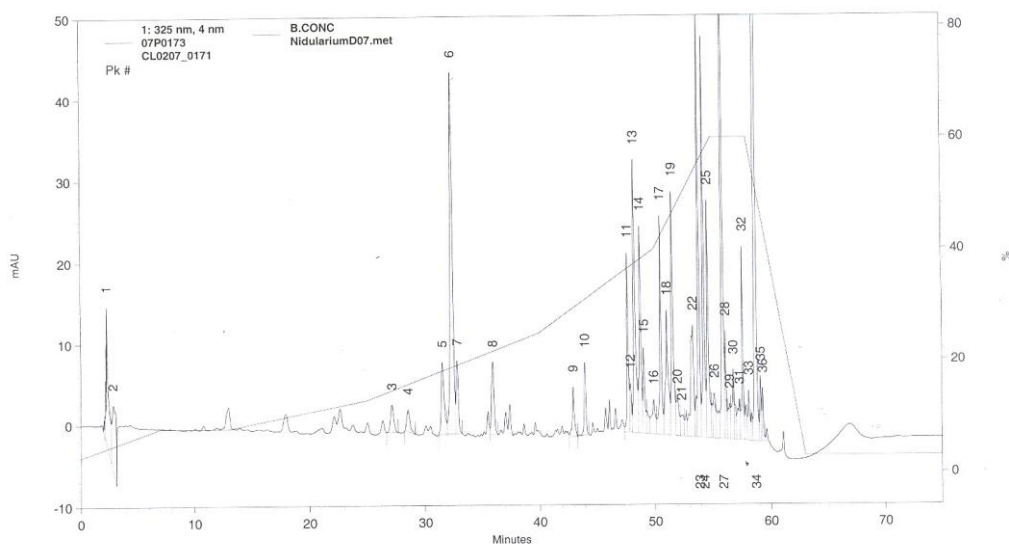


Figura 17: Perfil Químico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do Extrato Etanólico de *Nidularium procerum*. Foram utilizadas colunas de fase reversa (C₁₈). A fase móvel variou em gradiente linear de acetonitrila-água nas proporções de 10:90 v/v a 70:30 v/v em 60 min. Ambas as fases continham 0,05% de ácido trifluoroacético. A vazão da fase móvel permaneceu a 1 mL/min. Detecção por varredura de espectro de 200 a 400 nm com acompanhamento em 3 comprimentos de onda, 220nm, 260 nm e 340 nm.

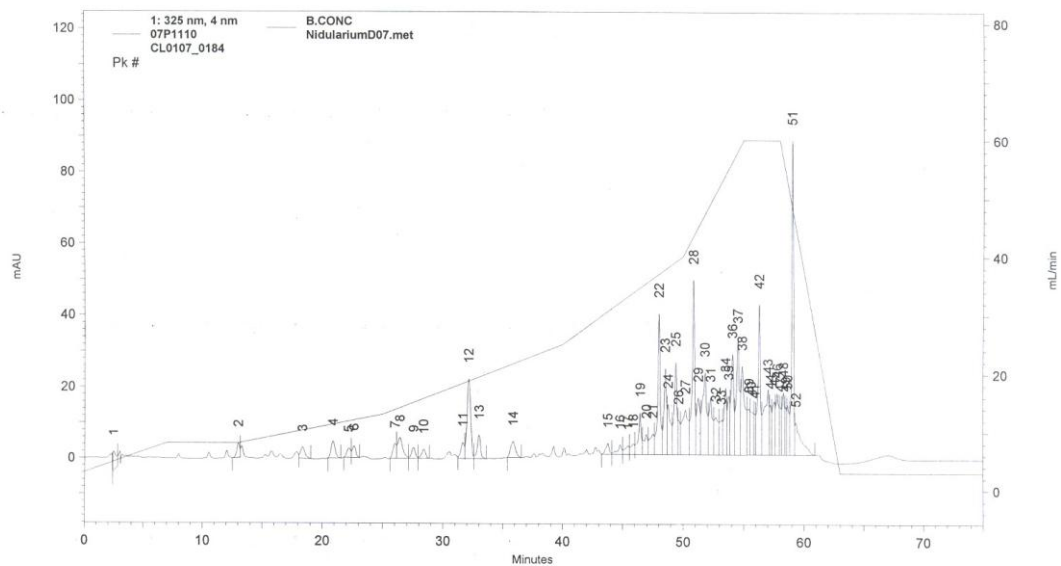


Figura 18: Perfil Químico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do Extrato Hidroalcoólico de *Nidularium procerum*. Foram utilizadas colunas de fase reversa (C₁₈). A fase móvel variou em gradiente linear de acetonitrila-água nas proporções de 10:90 v/v a 70:30 v/v em 60 min. Ambas as fases continham 0,05% de ácido trifluoroacético. A vazão da fase móvel permaneceu a 1 mL/min. Detecção por varredura de espectro de 200 a 400 nm com acompanhamento em 3 comprimentos de onda, 220nm, 260 nm e 340 nm.

5 - Discussão

O modelo de inflamação alérgica pulmonar é aquele que melhor mimetiza o quadro asmático em humanos, embora não demonstre todos os aspectos da doença. A exposição com altos níveis de alérgeno, comumente utilizada em modelos animais, leva a uma inflamação aguda no parênquima pulmonar, que são marcadamente diferentes da inflamação aguda e crônica das paredes das vias aéreas observadas na asma humana. Além disso, camundongos possuem musculatura bronquial pouco desenvolvida, o que pode dificultar a detecção da broncoconstrição (Kumar e Foster, 2002). Este modelo compreende a inflamação aguda, caracterizado pelo acúmulo de eosinófilos e um quadro mais tardio caracterizado por hipersecreção da mucosa, vasodilatação de vasos próximos ao brônquio, e liberação de neuropeptídeos que levam a ativação da musculatura lisa brônquica provocando broncoconstrição (Tsuyuki e cols., 1997).

Os eosinófilos são as principais células da resposta alérgica, e no local da inflamação liberam proteínas como a proteína catiônica e a peroxidase, citocinas e fatores fibrinogênicos, que causam vários danos como broncoconstrição, injúria do tecido pulmonar, estreitamento do espaço brônquico, dentre outros (Hogan, e cols. 2008, Matsumoto e cols. 2008). Um dos principais tratamentos para a asma são os corticóides, amplamente utilizados para reações inflamatórias, inclusive as alérgicas. Os glicocorticóides, como também podem ser chamados, funcionam através do remodelamento da cromatina, alterando sua estrutura, provocando a expressão ou a repressão de genes, principalmente aqueles relacionados à inflamação. Eles se difundem pela membrana e se ligam a receptores presentes no citoplasma das células. Eles produzem seu efeito por regularem direta ou indiretamente a transcrição de genes-alvo, inibindo a síntese de muitas proteínas inflamatórias, pela supressão dos genes que a codificam, reduzindo o número de células inflamatórias como eosinófilos, linfócitos T, neutrófilos dentre outras (Barnes e Adcock, 2003). Entretanto, esses compostos caracteristicamente causam muitos e severos efeitos colaterais, principalmente quando em uso prolongado. Em nossos experimentos, observamos que o tratamento com a dexametasona (decadron) inibe em quase noventa por cento a migração dos leucócitos para o sítio inflamatório, como mostra a figura 4, porém percebe-se que os animais perdem, em média, dois gramas de peso, ao longo do tratamento, o qual perdura por seis dias (dados não mostrados). Ainda neste contexto de efeitos adversos, em humanos os corticóides podem causar uma grande imunodepressão, fazendo com que os pacientes estejam mais suscetíveis

ao desenvolvimento de outras doenças. Desta forma, vários outros tipos de medicamentos têm sido testados na terapêutica antiasmática, sempre com a preocupação de se obter medicamentos eficazes e com baixa toxicidade. Até aqui, alguns dos medicamentos testados se mostraram ineficazes em humanos como o Omalizumab, um agente anti-IgE (Holgate e cols., 2005) e o Zileuton um inibidor da 5-lipoxigenase (Kemp, 2003). Justifica-se assim, o grande interesse clínico e farmacêutico na busca dessas novas alternativas já que os glicocorticóides, drogas esteroidais com emprego consagrado na terapêutica antiinflamatória e antiasmática, tem sua utilização (dosagem e tempo de tratamento) limitada em função da gravidade dos efeitos colaterais, fazendo com que a descoberta e desenvolvimento de potenciais medicamentos para o controle da inflamação e alergia sejam ainda uma prioridade (Ying e cols., 2006). Por isso, além de inibidores de mediadores inflamatórios e anticorpos contra citocinas, as plantas continuam sendo um alvo importante nas pesquisas nesta área, pois dada à riqueza de seus constituintes químicos formados em seu metabolismo secundário e seu uso na medicina popular, são potenciais fornecedores de novos compostos bioativos. Outro fator importante em relação às plantas medicinais é a possibilidade de poderem ser administradas oralmente, uma vez que no uso popular são utilizadas na forma de chás principalmente, o que não ocorre com algumas drogas que estão em fase de testes clínicos, como o anti-IgE humano, Omalizumab. Dentre as substâncias extraídas de plantas podemos citar o DA-9201, proveniente da planta *Oryza sativa*, que é uma das espécies de arroz mais consumida no Brasil (Lee e cols., 2006); a saponina Quillaja, da planta *Quillaja saponaria* (Katayama e Mine 2006), os estudos com *Cissampelos simpodialis*, conhecido popularmente como orelha de onça, (Bezerra-Santos e cols., 2006) e com *Actinia polygana* (Lee e cols., 2006).

Nidularium procerum é uma planta pertencente à família Bromeliaceae, pouco estudada tanto no âmbito químico quanto no âmbito farmacológico. Na literatura, encontramos apenas os artigos publicados pelo nosso laboratório, que relatam os efeitos farmacológicos da espécie *N. procerum*, mostrando atividade analgésica, antiinflamatória e antialérgica. Nestes trabalhos, considerando a dificuldade de obtenção de planta para a preparação de extratos, utilizou-se nos modelos apresentados por Amendoeira e cols., 2005 e Vieira-de-Abreu e cols., 2005, a via intraperitoneal para o tratamento dos animais, e pode-se estabelecer uma dose efetiva relativamente baixa (2 mg/kg), em se tratando de estarmos usando um extrato bruto. Porém, alguns dos grandes questionamentos no estudo farmacológico de extratos vegetais são sem dúvida as questões da via de administração e da preparação dos extratos, uma vez que na medicina popular são empregados majoritariamente

chás, os quais são administrados por via oral. Desta forma, em uma primeira etapa deste trabalho verificamos o efeito do extrato aquoso de *N. procerum* no modelo de inflamação alérgica pulmonar, usando a via oral de administração. A figura 4 mostra a avaliação de diferentes doses do extrato aquoso de *N. procerum* onde podemos observar um significativo efeito inibitório do extrato, em todas as doses utilizadas, sobre a migração celular, em especial sobre os eosinófilos, a principal célula envolvida na resposta inflamatória alérgica pulmonar. Observamos ainda um aumento na dose efetiva do extrato quando administrado oralmente (10 – 500 mg/kg), em comparação à via intraperitoneal anteriormente utilizada (2 mg/kg).

Este fenômeno é comum porque a biodisponibilidade de uma substância pode estar diminuída pela via oral devido aos fenômenos farmacocinéticos comuns desta via de administração. A proteína Bromelina, por exemplo, extraída do Abacaxi (*Ananas comusus*), apresenta 2 e 6 mg/kg como doses efetivas na inibição da reação alérgica quando administrada por via i. p. (Secor Jr. e cols., 2005), enquanto que efeito semelhante só pode ser observado na dose de 200 mg/kg quando administrada oralmente (Secor Jr. e cols., 2007).

No local da inflamação células residentes liberam substâncias quimioatratórias como eotaxina, RANTES, PAF, dentre outras, para permitir a migração dos leucócitos. No caso da asma, os linfócitos, além de liberarem as quimiocinas para inicialmente atraírem os eosinófilos, também liberam a citocina IL-5, que ajuda na maturação e recrutamento dos eosinófilos, desta forma há um aumento do número de eosinófilos na medula óssea e na circulação sanguínea (Hogan e cols, 2008). Este fenômeno ocorreu em nossos experimentos, embora não tenhamos observado significância estatística em nossos achados. *N. procerum* se mostrou muito eficiente na inibição da migração de eosinófilos para a cavidade pulmonar como mostram as figuras 4 e 5, em uma dose até mesmo menor do que outras plantas citadas na literatura (Lee e cols., 2005, Yeum e cols. 2007). No geral, os tratamentos com os diferentes extratos de *N. procerum* não afetou significativamente o perfil leucocitário do sangue (fig. 6) nem da medula óssea (fig. 7), o que sugere que os extratos podem estar atuando diretamente no local da inflamação. Os extratos podem estar agindo diretamente nos eosinófilos, em sua motilidade, como já mostrado por Vieira-de-Abreu e colaboradores em 2005, ou nas moléculas de adesão nos pulmões, como por exemplo as selectinas (L-selectina, P-selectina, e E-selectina) e as integrinas (beta1 e beta2) que desempenham papel fundamental na regulação do trafico e migração destas células para o interstício pulmonar (Woodside e col. 2008, Bazan-Socha e col. 2006). Embora todos os extratos tenham inibido a migração de eosinófilos e outros tipos celulares, podemos destacar o extrato etanólico, como aquele que apresentou o melhor perfil inibitório sobre a resposta inflamatória pulmonar em

comparação aos outros extratos, com destaque para seu efeito sobre o infiltrado de eosinófilos para o parênquima pulmonar como mostra a figura 5. Este resultado é extremamente importante pois, na estratégia de se ter o estudo químico biomonitorado, a detecção de um perfil de resposta mais efetivo em um tipo de extrato estudado, nos permite direcionar os próximos passos do fracionamento e caracterização química de *N. procerum*.

Os linfócitos T são os orquestradores da resposta imune, e na alergia eles são os responsáveis pela maturação dos linfócitos B, através das citocinas IL-4 e IL-13, e pela maturação e recrutamento inicial dos eosinófilos, através da IL-5. Decidimos, então, verificar os efeitos *in vitro* dos extratos de *N. procerum* sobre os linfócitos, representados, neste trabalho, por esplenócitos estimulados ou não *in vitro* com ovalbumina (OVA).

Iniciamos os estudos *in vitro* determinando a concentração de dexametasona a ser usada nos experimentos como droga supressora padrão. Analisando os efeitos da dexta sobre a proliferação de esplenócitos de animais não sensibilizados e estimulados *in vitro* com ConA (mitógeno de célula T), observamos inibição concentração-dependente (figura 8). Escolhemos utilizar a concentração de 0,05 µg/mL pois esta inibiu a proliferação celular em 90%, semelhante à inibição da migração celular observada anteriormente nos experimentos *in vivo*.

Quanto à origem do linfócito a ser utilizado na cultura de células, talvez o linfonodo mediastínico fosse a fonte ideal utilizando-se animais sensibilizados e aerolizados, como foi utilizado por Idzko e cols em 2007, mas o número de células para se trabalhar ficaria muito limitado. Poderiam ser utilizados também os pulmões (El Gazzar e cols., 2006), mas teríamos a interferência de vários tipos celulares, como nosso objetivo nos estudos *in vitro* era analisar os linfócitos, optamos por trabalhar com o baço.

Na literatura podemos encontrar estudos de cultura de esplenócitos de animais sensibilizados e aerolizados (Lee e cols., 2006), ou de animais apenas sensibilizados (Katayama e cols., 2006). Por isso, foi necessário estabelecer o melhor protocolo de sensibilização do animal com OVA a ser utilizado nos experimentos de cultura de células. Observamos que os animais sensibilizados e aerolizados somente com salina não mostraram aumentos na proliferação na presença de OVA, o que era de se esperar já que os linfócitos não entraram em contato com o antígeno. Quando o animal foi sensibilizado com OVA e posteriormente aerolizado com salina, observamos uma proliferação dos esplenócitos maior do que aquela com animais sensibilizados e aerolizados com OVA. Este resultado está de acordo com a literatura, pois quando o animal é apenas sensibilizado, e por via intraperitoneal, antígeno é carregado principalmente para o baço, onde ocorre a fase

de reconhecimento, ativação e proliferação dos linfócitos responsivos aos antígenos. Quando o animal, além de ser sensibilizado, é aerolizado, há uma migração dos linfócitos Ag-específicos para o pulmão e a fase de reconhecimento e expansão das células ocorre no linfonodo mediastínico, que é o linfonodo drenante na região pulmonar. Por esta razão os animais que foram aerolizados com OVA apresentaram uma proliferação menor do que os animais aerolizados com salina (fig. 9), conforme também demonstrado por Lambrecht B. N., Hammad (2003). Com relação às concentrações de OVA testadas *in vitro*, todas as concentrações são descritas na literatura (Idzko e cols., 2007). Embora nos experimentos realizados todas as concentrações de OVA testadas tenham sido capazes de aumentar a proliferação celular, devido ao estímulo antigênico ser oligoclonal, ou seja, apenas algumas células responderem ao antígeno, optamos pela concentração de 50 µg/mL, a maior testada, para assegurar que um maior número de células entrassem em contato com o antígeno (fig. 9). Outra observação importante foi que essa concentração não diminuiu a proliferação, já que o excesso de antígeno também pode diminuir a resposta do linfócito (Alberts e cols., 2004).

Após o estabelecimento dos parâmetros para os estudos *in vitro*, verificamos pelo teste do MTT, se os extratos influenciavam a sobrevivência das células. Este é um ensaio colorimétrico que mede a atividade de enzimas que reduzem o MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a cristais de formazan. A proliferação celular foi determinada pela incorporação de timidina radioativa, um deoxinucleosídeo de pirimidina que se parecia com a deoxiadenosina no DNA. Este evento ocorre com as células quando estão em processo de divisão celular. Além disso, analisamos a liberação de citocinas nos sobrenadantes das células, dosando-as pelo método de ELISA.

Observamos na figura 11 que o extrato aquoso não alterou a sobrevivência das células em relação ao controle, mas estimulou a proliferação das células. Como foram identificados açúcares neste extrato (dados não mostrados), e sabendo-se que água também pode extrair proteínas, poderíamos sugerir a presença no extrato de substâncias do tipo oligossacarídeo semelhante à ConA, que podem estar estimulando a proliferação das células, embora quando as células encontram-se estimuladas pela OVA a amplitude desse efeito tenha diminuído. Também não podemos descartar a possibilidade de que este efeito estimulador possa ser pela possível presença de LPS no extrato aquoso. O extrato etanólico, assim como nos experimentos *in vivo*, demonstrou ser o extrato mais potente dos três nos experimentos *in vitro*, inibindo tanto a proliferação espontânea quanto a estimulada pela OVA. Esta inibição parece resultar de efeitos citotóxicos, como mostrado pelos resultados do MTT. Os efeitos do extrato etanólico foram ainda mais potentes do que os da dexametason (fig.12). Nossos

resultados sugerem que esses efeitos sejam causados por compostos encontrados no extrato de *N. procerum*, já que o etanol sozinho não causou efeitos na cultura. Podemos dizer que o extrato hidroalcoólico possui atividade sobre os esplenócitos intermediária entre as apresentadas pelos extratos etanólico e aquoso, induzindo apenas uma tendência à diminuição tanto da proliferação espontânea quanto das células estimuladas com OVA (fig. 13). Vale destacar que esse resultado intermediário do extrato hidroalcoólico também foi observado nos experimentos *in vivo*.

Quanto à produção de citocinas pelas células estimuladas *in vitro* com OVA, com exceção da IL-4, cuja concentração determinada neste trabalho (55,5 pg/mL) se mostrou semelhante às descritas na literatura (Takahashi et al., 2006, Tanigushi et al., 2007), as concentrações das outras citocinas (IL-5, IL-10 e IL-13), nesta mesma condição de cultura, se mostraram menores do que as descritas na literatura (Takahashi et al., 2006, Tanigushi et al., 2007, Wittke et al., 2007, Sy et al., 2006). Estas diferenças podem ser explicadas pelos diferentes protocolos de cultura e de sensibilização dos animais com OVA.

Embora as inibições da produção de IL-10 e IL-13 induzidas pelo extrato hidroalcoólico não tenham sido significativas, observa-se uma forte tendência para este efeito. Todas as outras análises envolvendo a inibição da produção de citocinas pelos extratos de *N. procerum* mostram pelo menos uma concentração efetiva sobre cada uma das citocinas estudadas (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13). Estes resultados mostram que todos os extratos inibem a produção *in vitro* de citocinas que medeiam o processo alérgico (IL-4, IL-5 e IL-13), sugerindo que este efeito possa estar envolvido na inibição do processo inflamatório alérgico observado *in vivo*. Desta forma, os extratos de *N. procerum* podem não só estar influenciando a migração dos eosinófilos, mas também estarem atuando através da diminuição da liberação, pelos linfócitos, de citocinas que estimulam o processo alérgico como um todo, principalmente a migração e ativação de eosinófilos. Por outro lado, os extratos também inibiram a produção *in vitro* de IL-10. Como a IL-10 é uma citocina liberada por células T regulatórias e encontra-se envolvida no controle da resposta inflamatória, pode ser que o efeito inibidor dos extratos não seja pela ativação das células T_{reg.}. Entretanto, este efeito precisa ser melhor esclarecido com a dosagem de citocinas a partir de experimentos *in vivo*.

Não foram detectados níveis de IL-4 e IL-5 em sobrenadantes de esplenócitos não estimulados *in vitro* com OVA (dados não mostrados), mostrando que apesar dos animais terem sido sensibilizados, as células não foram capazes de produzir espontaneamente tais citocinas. Resultados semelhantes têm sido descritos por Lee e colaboradores em 2006, com

cultura realizada por 60h. Katayma e Mine (2006), cultivando esplenócitos por 3 dias a 1×10^6 /mL, como neste trabalho, também mostraram baixa produção de citocinas.

O etanol tem a propriedade de extrair vários compostos como heterosídeos, flavonóides, e outros compostos fenólicos, e muitos desses compostos apresentam atividades farmacológicas. Estudos químicos do laboratório PN-3 de Far-Manguinhos, onde os extratos de *N. procerum* estão sendo analisados paralelamente aos nossos estudos farmacológicos, sugerem a possibilidade da presença de compostos flavonoídicos e triterpenos no extrato etanólico (dados não mostrados). O cromatograma do extrato aquoso mostrou que a maioria dos compostos presentes é de caráter polar, só sendo possível identificar até o momento vários tipos de açúcares (dados não mostrados). No cromatograma do extrato etanólico, muitos compostos são de caráter apolar com alguns picos, que podem representar compostos, em grande quantidade. No extrato hidroalcoólico, que foi obtido através da extração de *N. procerum* com etanol e água (50:50) podem ser encontrados componentes tanto do extrato etanólico, mais apolares, quanto do extrato aquoso, substâncias polares. E também foram encontrados picos com as mesmas características de polaridade e tempo de retenção daquele encontrado no extrato etanólico (18 a 30, por exemplo).

Os flavonóides, que possivelmente estão presentes nos extratos etanólico e hidroalcoólico, consistem num grande grupo de metabólitos secundários fenólicos encontrados em frutas, folhas, sementes, flores, etc. Alguns estudos mostram efeitos antioxidante, anti-bacteriano, anti-viral, anti-inflamatório, analgésico, apoptótico dentre outros (Harbome e willians 2000; Middleton e cols., 2000). Pesquisas recentes demonstraram que camundongos asmáticos quando tratados com luteolina (presente na planta *Salvia tomentosa*, Lamiaceae) na dose de 0,1 mg/kg tiveram a supressão da hiperreatividade brônquica e da broncoconstricção (Das e cols., 2003). Os triterpenóides são estruturas semelhantes aos terpenos e a maioria são estruturas multicíclicas. Já foram identificadas para estas substâncias propriedades antibacteriana, antineoplásica, dentre outras (Ramenazi, 2006). Estes compostos podem ser encontrados no eucalipto, menta, canela dentre outras plantas com odor característico. Vasconcelos e colaboradores em 2008, mostraram que o triterpenóide Lupeol possui atividade antialérgica, inibindo a migração de leucócitos, principalmente de eosinófilos e a liberação de citocinas, mas não a produção de IgE no modelo murino de asma.

Em relação a família Bromeliaceae, o gênero mais estudado quimicamente é o *Tillandsia*, sobre o qual foram descritos vários componentes, alguns com atividade farmacológica. Como exemplo, podemos citar a atividade antiedematogênica da fração hexânica do extrato metanólico de *Tillandsia streptocarpa* Bake. Este extrato metanólico

também demonstrou efeito anti-radicaís livres. Além disso, flavanonas e uma mistura de esteroides foram isolados da fração hexânica do mesmo (Delaporte e cols., 2004). No extrato clorofórmico de *Tillandsia recurvata* também foram encontrados flavononas (de Queiroga e cols., 2004). Nas folhas de *Tillandsia fasciculata* foram encontrados 4 triterpenóides tetracíclicos (Candillo-Ciau e cols., 2001), e da planta *Tillandsia purpurea* foi encontrado um tipo de flavonóide (Arslanian e cols., 1986).

O gênero *Ananas*, de onde pretence o abacaxi, é o mais estudado farmacologicamente. Sobre a espécie *Ananas ananassoides* Baker, uma planta medicinal usada no Brasil para tratamento de problemas gástricos, efeitos gastro-protetor e mutagênico têm sido demonstrados (Silva e cols., 2008). Foram descritos vários componentes do extrato etanólico das folhas de *Ananas comusus*, responsáveis pelos efeitos antidiabéticos, anti-hiperlipidêmicos e anti-oxidantes, como fenilpropano diglicerídeos, ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropano monoglicerídeos, flavonas e glicosídeos fenilpropanoídes (Ma e cols., 2007, Xie e cols., 2007 e 2006).

Muito ainda tem que ser descoberto sobre a família Bromeliaceae, não só sobre o gênero *Nidularium*, mas também sobre outros gêneros desta família. Com relação à espécie *N. procerum* os dados observados nos leva a investigar mais profundamente os efeitos antialérgicos da mesma, como tentar isolar a(s) substância (s) ativas, analisar o efeito das mesmas na produção de citocinas e IgE, além de seus efeitos em receptores, como os purinérgicos por exemplo, e moléculas de adesão participantes do processo inflamatório. Também é importante verificar a toxicidade destes compostos nos animais, analisando diferentes órgãos como o fígado, por exemplo.

Vale a pena também continuar a elucidar os efeitos antiinflamatório e analgésico, anteriormente estudados, e outras possíveis propriedades como anticancerígena e antidiabética, por exemplo, uma vez que o perfil químico até aqui detectado, sugere a presença de compostos potencialmente bioativos para estes tipos de patologias.

6- Conclusões

- Nossos resultados indicam que o tratamento oral com diferentes extratos de *Nidularium procerum*, com destaque para o extrato etanólico, apresenta importante atividade inibidora no modelo de inflamação alérgica pulmonar em camundongos. Estes extratos foram capazes de inibir a migração de leucócitos para o parênquima pulmonar, principalmente de eosinófilos;
- Os extratos parecem não atuar no fluxo dos leucócitos sanguíneo para os pulmões bem como não parecem inibir a formação de eosinófilos na medula;
- O extrato etanólico foi o mais potente, em inibir a sobrevivência e a proliferação dos esplenócitos *in vitro*. Enquanto que o extrato aquoso aumentou a proliferação destas células e o extrato hidroalcoólico apresentou efeito intermediário entre os extratos etanólico e aquoso.
- Todos os extratos inibiram a produção *in vitro* de citocinas por esplenócitos estimulados com OVA, porém, mais uma vez o extrato etanólico mostrou ser o mais potente. Estes resultados indicam ser este tipo de extração o mais promissor para dar continuidade aos estudos de caracterização química biomonitorados, visando à possível obtenção de um fitomedicamento com propriedade antialérgica.

7 - Perspectivas

O conjunto de dados obtidos até o presente momento por nosso grupo demonstrou ser de extrema importância tanto o aprofundamento na investigação dos mecanismos farmacodinâmicos envolvidos no efeito antialérgico do extrato de *Nidularium procerum* Lindman, como a elucidação dos princípios ativos envolvidos nesta bioatividade. Os resultados obtidos, em nossa avaliação, apontam para a perspectiva de podermos ao final de um projeto cuidadosamente elaborado e desenvolvido, seguindo as orientações e legislações nacionais e internacionais de estudo de medicamentos fitoterápicos, ter um novo produto terapêutico, a partir da espécie estudada. Desta forma, a partir deste conjunto de resultados e de nosso grande interesse e investimento técnico científico nesta área de investigação consideramos as seguintes perspectivas de desdobramento do estudo de *Nidularium procerum* visando ao desenvolvimento de um fitomedicamento:

- Confirmar através da realização de uma curva dose-resposta se o extrato etanólico é o melhor extrato a ser utilizado na continuidade dos estudos determinando um extrato padrão para o estudo;
- Em cooperação com a Dr^a. Raquel Figueiredo realizar o fracionamento do extrato padronizado buscando a identificação e/ou isolamento do(s) princípio(s) ativo(s) responsáveis pela bioatividade presentes neste extrato;
- Avaliar o efeito de frações e/ou substâncias isoladas do extrato padrão sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar;
- Caracterizar o efeito do extrato padrão e/ou suas frações e substâncias isoladas na liberação de citocinas e quimiocinas no BAL;
- Avaliar histopatologicamente, o efeito do extrato padrão e/ou suas frações e substâncias isoladas, analisando, tanto o infiltrado celular, quanto a liberação de muco no tecido pulmonar;
- Analisar o efeito do extrato padrão e/ou suas frações e substâncias isoladas na liberação de IgE pelas células B, *in vivo* (soro) e *in vitro* (sobrenadante).
- Avaliar um possível efeito do extrato padrão e/ou suas frações e substâncias isoladas sobre os receptores purinérgicos do tipo P2 visando identificar a participação do ATP extracelular, nos efeitos farmacológicos demonstrados para estes produtos e seu potencial como um antagonista dos receptores P2.

- Avaliar um possível efeito do extrato padrão e/ou suas frações e substâncias isoladas sobre a produção de eicosanoides que participam do metabolismo do ácido araquidônico na reação alérgica.

8- Referências bibliográficas

1. Ackerman SJ, Gleich GJ, Loegering DA, Richardson BA, & Butterworth AE. Comparative toxicity of purified human eosinophil granule cationic proteins for schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg.* 1985; 34:735–45.
2. Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. Trad. Ana Breatriz et al. – 4ed. – Porto Alegre. Ed. Artmed, 2004.
3. Amendoeira FC, Frutuoso VS, Chedier LM, Pearman AT, Figueiredo MR, Kaplan MA, et al Antinociceptive effect of *Nidularium procerum*: a Bromeliaceae from the Brazilian coastal rain forest. *Phytomedicine.* 2005a Jan;12(1-2):78-87.
4. Amendoeira FC., Frutuoso VS, Zanon C, Chedier LM, Figueiredo MR, Kaplan MA, et al. Anti-inflammatory activity in the aqueous crude extract of the leaves of *Nidularium procerum*: A Bromeliaceae from the Brazilian coastal rain forest. *Biol Pharm Bull.* 2005b Jun; 28(6):1010-5.
5. Arslanian RL, Stermitz FR, Castedo L. 3-Methoxy-5-hydroxyflavonols from *Tillandsia purpurea*. *J Nat Prod.* 1986 Nov-Dec; 49(6):1177-8.
6. Atallah AM & Nicholas HJ. Triterpenoids and steroids constituents of Florida spanish moss. *Phytochemistry.* 1971, 10:3139-3145.
7. Ayensu ES, DeFilipps RA. *Endangered and Threatened Plants of The United States*. Washington, DC: Smithsonian Institution, 1978.
8. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Aug;120(2):227-35.
9. Barnes PJ, Adcock IM. How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med.* 2003 Sep 2;139(5 Pt 1):359-70

10. Barnes PJ, Chung KF & Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol. Rev.* 1998;50, 515-596
11. Bazan-Socha S, Bukiej A, Pulka G, Marcinkiewicz C, Musial J. Increased expression of collagen receptors: alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins on blood eosinophils in bronchial asthma. *Clin Exp Allergy.* 2006 Sep;36(9):1184-91.
12. Bezerra-Santos CR, Vieira-de-Abreu A, Barbosa-Filho JM, Bandeira-Melo C, Piuvezam MR, Bozza PT. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. *Int Immunopharmacol.* 2006 Jul;6(7):1152-60.
13. Borin MR de MB & Gottlieb OR. Plant Chemosystematics and phylogeny 35. Steroids, taxonomic markers? *Plant. 1993 Syst.Evol.* 184:41-76.
14. Boswell-Smith V, Cazzola M, Page CP. Are phosphodiesterase 4 inhibitors just more theophylline? *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Jun;117(6):1237-43.
15. Busse WW and Lemanske RF Jr. Asthma. 2001 *N. Engl. J. Med* 344, 350-362.
16. Butterworth AE. Cell-mediated damage to helminths. *Adv Parasitol* 1984;23:143-235
17. Calixto JB., Scheidt C, Otuki M, Santos AR. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2001 Oct;6(2):261-79.
18. Cantillo-Ciau Z, Brito-Loeza W, Quijano L. Triterpenoids from *Tillandsia fasciculata*. *J Nat Prod.* 2001 Jul;64(7):953-5.
19. Chattopadhyay K, Ghosh T, Pujol CA, Carlucci MJ, Damonte EB, Ray B. Polysaccharides from *Gracilaria corticata*: Sulfation, chemical characterization and anti-HSV activities. *Int J Biol Macromol.* 2008 Jul 23
20. Chedier LM Kaplan MAC. Chemical ecology of three species of Bromeliaceae. *Bromelia* 1996;3, 25-31.
21. Cockcroft DW, Hargreave FE, O'Byrne PM, Boulet LP. Understanding allergic asthma from allergen inhalation tests. *Can Respir J.* 2007 Oct;14(7):414-8.

22. Corrêa MP. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Vol.2. Rio de Janeiro, 1984, Imprensa Nacional.
23. Cronquist A. An integrated System of Classification of Flowering Plants. New York: Columbia University Press, 1981.
24. Cronquist A. The Evolution and Classification of Flowering Plants. Bronx, NY:New York. Botanical Garden, 1988.
25. Das M, Ram A, Ghosh B. Luteolin alleviates bronchoconstriction and airway hyperreactivity in ovalbumin sensitized mice. *Inflamm Res*. 2003 Mar;52(3):101-6.
26. Davies DE, Wicks J, Powell RM, Puddicombe SM, Holgate ST. Airway remodeling in asthma: new insights. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Feb;111(2):215-25; quiz 226.
27. Delaporte RH, Sarragiotto MH, Takemura OS, Sánchez GM, Filho BP, Nakamura CV. Evaluation of the antioedematogenic, free radical scavenging and antimicrobial activities of aerial parts of *Tillandsia streptocarpa* Baker-Bromeliaceae. *J Ethnopharmacol*. 2004 Dec;95(2-3):229-33.
28. de Queiroga MA, de Andrade LM, Florêncio KC, de Fátima Agra M, da Silva MS, Barbosa-Filho JM, da-Cunha EV. Chemical constituents from *Tillandsia recurvata*. *Fitoterapia*. 2004 Jun;75(3-4):423-5.
29. del Cuvillo A, Mullol J, Bartra J, Dávila I, Jáuregui I, Montoro J, Sastre J, Valero AL. Comparative pharmacology of the H1 antihistamines. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2006;16 Suppl 1:3-12.
30. Djukanović R, Wilson SJ, Kraft M, Jarjour NN, Steel M, Chung KF, Bao W, Fowler-Taylor A, Matthews J, Busse WW, Holgate ST, Fahy JV. Effects of treatment with anti-immunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Sep 15;170(6):583-93.
31. Dong C, Flavell RA. Cell fate decision: T-helper 1 and 2 subsets in immune responses. *Arthritis Res*. 2000;2(3):179-188.

32. Egesten A., Alumets J., von Mecklenburg C., Palmegren M., & Olsson I. Localization of eosinophil cationic protein, major basic protein, and eosinophilperoxidase in human eosinophils by immunoelectron microscopic technique. *J Histochem Cytochem.* 1986 34:1399–403.
33. El Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2006 Jul;6(7):1135-42.
34. Fitzhugh DJ, Shan S, Dewhirst MW, Hale LP. Bromelain treatment decreases neutrophil migration to sites of inflammation. *Clin Immunol.* 2008 Jul;128(1):66-74. Epub 2008 May 14.
35. Furuta GT, Nieuwenhuis EE, Karhausen J, Gleich G, Blumberg RS, Lee JJ, Ackerman SJ.. Eosinophils alter colonic epithelial barrier function: role for major basic protein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Nov;289(5):G890-7.
36. Guerra PM e Nodari OR. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos, 2001.
37. Gyllfors P, Dahlén SE, Kumlin M, Larsson K, Dahlén B. Bronchial responsiveness to leukotriene D4 is resistant to inhaled fluticasone propionate. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Jul;118(1):78-83.
38. Harbone, JB & Mabry TJ. *The Flavonoids: Advances in research.* Chapman and Hall Ltd, London, 1982, 743p
39. Harbone JB. *The flavonoids advances in research since 1980.* Chapman and Hall Ltd, 1988, London, 621p.
40. Harborne JB, Williams CA. *Advances in flavonoid research since 1992.* *Phytochemistry.* 2000 Nov;55(6):481-504.

41. Henderson JP, Byun J, Williams MV, McCormick ML, Parks WC, et al. Bromination of deoxycytidine by eosinophil peroxidase: a mechanism for mutagenesis by oxidative damage of nucleotide precursors. 2001 Proc Natl Acad Sci USA 98:1631–6.
42. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. Clin Exp Allergy. 2008 May;38(5):709-50.
43. Holgate ST, Chuchalin AG, Hébert J, Lötvall J, Persson GB, Chung KF, Bousquet J, Kerstjens HA, Fox H, Thirlwell J, Cioppa GD; Omalizumab 011 International Study Group. Efficacy and safety of a recombinant anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab) in severe allergic asthma. Clin Exp Allergy. 2004 Apr;34(4):632-8.
44. Holgate S, Casale T, Wenzel S, Bousquet J, Deniz Y, Reisner C. The anti-inflammatory effects of omalizumab confirm the central role of IgE in allergic inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2005 Mar;115(3):459-65.
45. Holgate S.T., Djukanović R., Casale T., Bousquet J. Anti-immunoglobulin E treatment with omalizumab in allergic diseases: an update on anti-inflammatory activity and clinical efficacy. Clin Exp Allergy. 2005 Apr;35(4):408-16.
46. Holgate ST and Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. Nat Rev Immunol. 2008 Mar;8(3):218-30.
47. Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MA, Muskens F, Hoogsteden HC, Luttmann W, Ferrari D, Di Virgilio F, Virchow JC Jr, Lambrecht BN. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. Nat Med. 2007 Aug;13(8):913-9. Epub 2007 Jul 15.
48. Jin L, Yixi B, Waikei L, Wenwen L, Fang L, Xuan Z, Jing L, Hongping W. Immunoregulatory and Anti-Tumor Effects of Polysaccharopeptide and Astragalus polysaccharides on Tumor-Bearing Mice. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2008 Aug 5:1-12.

49. Juhasz B, Thirunavukkarasu M, Pant R, Zhan L, Penumathsa SV, et al. Bromelain induces cardioprotection against ischemia-reperfusion injury through Akt/FOXO pathway in rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Mar;294(3):H1365-70.
50. 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 May 3;54(9):3271-6.
51. Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med*. 2005 Apr;11(4):148-52.
52. Kemp JP. Recent advances in the management of asthma using leukotriene modifiers. *Am J Respir Med*. 2003;2(2):139-56.
53. Knapp L. Fitoterapia sobre novos campos de pesquisa. *Gazeta Mercantil*, (S.1.), n. 22170, 18 set 2001.
54. Kumar RK, Foster PS. Modeling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Sep;27(3):267-72.
55. Lambrecht BN, Hammad H Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol*. 2003 Dec;3(12):994-1003.
56. Larché M. Regulatory T cells in allergy and asthma. *Chest*. 2007 Sep;132(3):1007-14
57. Lee SH, Sohn YS, Kang KK., Kwon JW, Yoo M. Inhibitory Effect of DA-9201, an Extract of *Oryza sativa* L., on Airway Inflammation and Bronchial Hyperresponsiveness in Mouse Asthma Model. *Biol Pharm Bull*. 2006 Jun;29(6):1148-53.
58. Lee YC, Kim SH, Seo YB, Roh SS, Lee JC. Inhibitory effects of *Actinidia polygama* extract and cyclosporine A on OVA-induced eosinophilia and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Int Immunopharmacol*. 2006 Apr;6(4):703-13.

59. Lehrer RI, Szklarek D, Barton A, Ganz T, Hamann KJ, & Gleich GJ. Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. *J Immunol* 1989 142:4428–34.
60. Leme EMC. *Nidularium*. Sextante, Rio de Janeiro. 2000.
61. Lutz MB, Schnare M, Menges M, Rössner S, Röllinghoff M, Schuler G et al. Differential functions of IL-4 receptor types I and II for dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF. *J Immunol*. 2002 Oct 1;169(7):3574-80.
62. Ma C, Xiao SY, Li ZG, Wang W, Du LJ. Characterization of active phenolic components in the ethanolic extract of *Ananas comosus* L. leaves using high-performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2007 Sep 21;1165(1-2):39-44.
63. Maloy KJL, Salaun R, Cahill G, Dougan NJ, Saunders and F. Powrie. 2003. CD4-CD25⁻ TR cells suppress innate immune pathology through cytokine- dependent mechanisms. *J. Exp. Med.* 197: 111–119.
64. Marker RE, Wagner RB, Ulshafer PR, Wittbecker EL, Goldsmith DPJ, Rouf CH. Sterols. CLVII. Sapogenins. LXIX. Isolation and structures of thirteen new steroidal sapogenins. New sources for known sapogenins. *J. Am. Chem. Soc.* 194365, 1199-1208.
65. Marsland BJ, Bättig P, Bauer M, Ruedl C, Lässig U, Beerli RR, et al. CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity*. 2005 Apr;22(4):493-505.
66. Matsumoto K, Tamari M, Saito H. Involvement of eosinophils in the onset of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Jan;121(1):26-7. Epub 2007 Dec 3
67. Middleton EJr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000 Dec;52(4):673-75.
68. Ministério da saúde. Brasil: MS assina acordo com Sociedade de Pneumologia para prevenção de doenças respiratórias. Citado em 20 de março de 2008 disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=44317.

69. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
70. Palmqvist C, Wardlaw AJ, Bradding P. Chemokines and their receptors as potential targets for the treatment of asthma. *Br J Pharmacol*. 2007 Jul;151(6):725-36.
71. Pawankar R, Okuda M, Yssel H, Okumura K, Ra C. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest*. 1997 Apr 99(7):1492-9.
72. Pégorier S, Wagner LA, Gleich GJ, & Pretolani M. Eosinophil-derived cationic proteins activate the synthesis of remodeling factors by airway epithelial cells. 2006 *J Immunol* 177:4861-9.
73. Prance, G T. Floristic inventory of the tropics: where do we stand? *Ann. Missouri Bot. Gard.*, (S.l.), v.64. 1977, p.559-684.
74. Raffauf, R. F., Menachery, M. D., Le Quesne, P. W., Arnold, E. V., Clardy, J.: Antitumor plants. 11. Diterpenoid and flavonoid constituents of *Bromelia pinguin* L. *J. Org. Chem*. 1981 46: 1094-1098.
75. Ramezani H. Fungicidal activity of volatile oil from eucalyptus *Citriodora Hook.* against *Alternaria triticina*. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 2006;71(3 Pt B):909-14.
76. Rates SM. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 2001 May;39(5):603-13.
77. Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy*. 2006 Nov;36(11):1357-66.
78. Rosenberg HF, & Domachowske JB. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J Leukoc Biol* 2001; 70:691-8.
79. Rothenberg ME. Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998 338:1592-600.

80. Secor ER Jr, Carson WF 4th, Cloutier MM, Guernsey LA, Schramm CM, Wu CA, Thrall RS. Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. *Cell Immunol.* 2005 Sep;237(1):68-75.
81. Secor ER, Carson WF, Singh A, Pensa M, Guernsey LA, Schramm CM et al. Oral Bromelain Attenuates Inflammation in an Ovalbumin-induced Murine Model of Asthma. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008 Mar;5(1):61-9
82. Shenoy NG, Gleich GJ & Thomas LL. Eosinophil major basic protein stimulates neutrophil superoxide production by a class IA phosphoinositide 3-kinase and protein kinase C-zetadependent pathway. 2003 *J Immunol* 171:3734–41.
83. Silva JS, Andreo MA, Tubaldini FR, Varanda EA, Rocha LR, Brito AR, Vilegas W, Hiruma-Lima CA. Differences in gastroprotective and mutagenic actions between polar and apolar extracts of *Ananas ananassoides*. *J Med Food.* 2008 Mar;11(1):160-8.
84. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia – da planta ao medicamento.* 2.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFSC, 2000.
85. Slifman NR, Loegering DA, McKean DJ & Gleich GJ. Ribonuclease activity associated with huma eosinophil derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. 1986 *J Immunol* 137:2913–17.
86. Smith LA e Downs RJ. Bromeliaceae, Subfamily Pitcairnioideae. New York: Hafner Press, v.14. 1974. 685 p. (Flora Neotropica).
87. Solecki R. Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in northern Iraq. *Science* 1975.190:880-881.
88. Sy LB, Wu YL, Chiang BL, Wang YH, Wu WM. Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. *Int Immunopharmacol.* 2006; 6: 1053-1060.

89. Takahashi N, Kitazawa H, Iwabuchi N, Xiao, JZ, Miyaji K, Iwatsuki K, Saito T. Immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Bifidobacterium longum* suppresses Th2 immune response in a murine model. Clin Exp Immunol. 2006; 145: 130-138.
90. Takata RH & Scheuer PJ Isolation of caffeic and p-coumaric acids from pineapple steam. Loydia 1976a; 39:409-411.
91. Takata RH & Scheuer PJ. Ananasic acid, a new trihidroxitriterpenecarboxylic acid from pineapple steams. Tetrahedron 1976b 32: 1077-1080.
92. Taniguchi Y, Mizote A, Kohno K, Iwaki K, Oku K, Chaen H, Fukuda S. Effects of dietary lactosucrose (4G- β -Dgalactosylsucrose) on the IgE response in mice. Biosci Biotechnol Biochem 2007; 11: 2766-2773.
93. Tsuyuki S, Tsuyuki J, Einsle K, Kopf M, Coyle AJ. Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (TH2) immune response and altered airway responsiveness. J Exp Med. 1997 May 5;185(9):1671-9.
94. Uchida DA, Ackerman SJ, Coyle AJ, Larsen GL, Weller PF, Freed J, et al. The effect of human eosinophil granule major basic protein on airway responsiveness in the rat in vivo. A comparison with polycations. Am Rev Respir Dis 1993;147:982-8.
95. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C & Dekruff RH. Asthma: An epidemic of dysregulated immunity. Nature Immunol. 3, 715-720 (2002).
96. Vasconcelos JF, Teixeira MM, Barbosa-Filho JM, Lúcio AS, Almeida JR, de Queiroz LP, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. Int Immunopharmacol. 2008 Sep;8(9):1216-21.
97. Verpoorte R, Van der Heijden R, Memelink J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. Transgenic Res. 2000;9(4-5):323-43
98. Vieira-de-Abreu A, Amendoeira FC, Gomes GS, Zanon C, Chedier LM, Figueiredo M R, Kaplan MA et al. Anti-allergic properties of the bromeliaceae *Nidularium procerum*:

- inhibition of eosinophil activation and influx. *Int Immunopharmacol.* 2005 Dec;5(13-14):1966-74.
99. Wack A, Gallorini S. Bacterial Polysaccharides with Zwitterionic Charge Motifs: Toll-Like Receptor 2 Agonists, T Cell Antigens, or Both? *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2008 Aug 5:1-10.
100. Waller, DP. Methods in ethnopharmacology. *J. of ethnopharmacology.* 1993;38:189-195.
101. Wang J, & Slungaard A. Role of eosinophil peroxidase in host defense and disease pathology. *Arch Biochem Biophys.* 2006 445:256–60.
102. Williams AP, Krishna MT, Frew AJ. The safety of immunotherapy. *Clin Exp Allergy.* 2004 Apr;34(4):513-4.
103. Wing K., Fehérvári Z., Sakaguchi S. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int Immunol.* 2006 Jul;18(7):991-1000. Epub 2006 May 23.
104. Wittke A, Chang A, Froicu M, Harandi OF, Weaver V, August A, Paulson RF, Cantorna MT. Vitamin D receptor expression by the lung micro-environment is required for maximal induction of lung inflammation. *Arch Biochem Biophys.* 2007;460:306-313.
105. Woodside DG, Vanderslice P. Cell adhesion antagonists: therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *BioDrugs.* 2008;22(2):85-100. Review. Bazan-Socha S, Bukiej A, Pulka G, Marcinkiewicz C, Musial J.
106. World Health Organization, Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva, 2003. 1 vol.
107. Wu K, Bi Y, Sun K, Wang C. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol.* 2007 Aug;4(4):269-75.
108. Xie W, Wang W, Su H, Xing D, Pan Y, Du L. Effect of ethanolic extracts of *Ananas comosus* L. leaves on insulin sensitivity in rats and HepG2. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2006 Aug;143(4):429-35.

109. Xie W, Wang W, Su H, Xing D, Cai G, Du L. Hypolipidemic mechanisms of *Ananas comosus* L. leaves in mice: different from fibrates but similar to statins. *J Pharmacol Sci.* 2007 Mar;103(3):267-74.
110. Yeum HS, Lee YC, Kim SH, Roh SS, Lee JC, Seo YB. *Fritillaria cirrhosa*, *Anemarrhena asphodeloides*, Lee-Mo-Tang and cyclosporine a inhibit ovalbumin-induced eosinophil accumulation and Th2-mediated bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007 Mar;100(3):205-13.
111. Ying, S, Zhang, G, GU S, zhao J. How much do we know about asthma: where are we now? *Cell Mol Immunol.* 2006 3:321-332.
112. Young JD, Peterson CG, Venge P & Cohn ZA. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature* 1986 321:613–16.
113. Yunes RA, Calixto JB. *Plantas medicinais – sob a ótica da química medicinal moderna.* Chapecó: Argos, 2001.
114. Zhang LL, Lin YM. Tannins from *Canarium album* with potent antioxidant activity. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2008 May;9(5):407-15.
115. Zheutlin LM, Ackerman SJ, Gleich GJ, & Thomas L.L. Stimulation of basophil and rat mast cell histamine release by eosinophil granule-derived cationic proteins. 1984 *J Immunol* 133:2180–5.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)