

JULIANA QUADROS MOLLICA

**POTENCIAL DE *Dioscorea trifida* L.f. e *Dioscorea opposita* Thunb. (DIOSCOREACEAE, INHAMES)
NO TRATAMENTO DA ALERGIA ALIMENTAR
INDUZIDA COM OVALBUMINA EM
CAMUNDONGOS BALB/c**

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2011

JULIANA QUADROS MOLLIKA

**POTENCIAL DE *Dioscorea trifida* L.f. e *Dioscorea opposita* Thunb. (DIOSCOREACEAE, INHAMES)
NO TRATAMENTO DA ALERGIA ALIMENTAR
INDUZIDA COM OVALBUMINA EM
CAMUNDONGOS BALB/c**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Maria das Graças Lins Brandão

Co-orientadora: Denise Carmona Cara Machado

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome da Mestranda: Juliana Quadros Mollica

Nome da Orientadora: Maria das Graças Lins Brandão

Nome da Co-orientadora: Denise Carmona Cara Machado

Linha de Pesquisa do PPGCA

Nutrição, Alimentação e Saúde

Áreas de conhecimento (CNPq/CAPES)

5.07.01.00-2 – Ciência de Alimentos

5.07.01.01-0 – Valor Nutritivo dos Alimentos

Instituições participantes:

Laboratório Farmacognosia, Depto. Produtos Farmacêuticos. Faculdade de Farmácia – UFMG.

Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide, Depto. Morfologia, ICB – UFMG.

Banco de Dados e Amostras de Plantas Aromáticas, Medicinais e Tóxicas (DATAPLAMT), Museu de História Natural e Jardim Botânico (MHNJB) – UFMG.

Apoio financeiro CNPq e FAPEMIG.

“Vez que outra, abandone a trilha e se embrenhe no bosque.

Sempre que você agir assim, decerto encontrará algo que nunca viu antes”

Alexander Graham Bell (1847-1922)

Dedico este trabalho aos meus pais, que me permitiram sonhar, alimentando cérebro e coração;

Ao meu marido, que me permitiu realizar, cuidando muito bem de ambos;

E ao meu filho, na expectativa dos sonhos e realizações que ele certamente terá.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia da UFMG (FAFAR – UFMG), na pessoa do Coordenador Professor Dr. Roberto Gonçalves Junqueira.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (FAFAR – UFMG), na pessoa da Dra. Isabela César, por realizar a análise cromatográfica das amostras.

Ao laboratório de Biologia do Sistema Linfóide (ICB – UFMG), por disponibilizar sua infraestrutura para realização dos ensaios biológicos.

A Universidade Federal de Roraima, na pessoa da Dra. Célida Socorro Vieira dos Santos, por obter as amostras de *D. trifida*.

Ao CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro fornecido para a elaboração e concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Aos meus pais, Dirceu e Aleida, pelo passado encantado, por me incentivarem na busca de crescimento pessoal e científico desde a infância.

Ao meu marido, Sérgio, por apoiar na conquista de todos os meus objetivos, pelo companheirismo, amor, carinho e felicidade multiplicada no decorrer deste trabalho.

Ao meu irmão, Júlio, pela amizade, presença, alegria e por compartilhar das experiências de ser farmacêutico.

Á minha orientadora, Professora Maria das Graças Lins Brandão, admirável por sua orientação técnica e metodológica, por incentivar o estudo e trabalho acadêmico científico, sendo exemplo de dedicação ao meio científico e a comunidade, por difundir seu conhecimento sobre o uso das plantas.

Á minha co-orientadora, Professora Denise Carmona Cara Machado, pelo voto de confiança me integrando ao seu grupo de pesquisa, e pela orientação no trilhar deste novo caminho na área de Imunologia.

Á Mirna, por se tornar minha amiga, e por estar sempre presente transmitindo seu conhecimento para o desenvolvimento desta pesquisa.

Á Juliana, Verena, Letícia, Darly, Celine e Núbia, pelo convívio alegre no laboratório de Farmacognosia, pelo companheirismo e incentivo durante a execução deste trabalho.

Á Natália, Maria, Luana, Sylvia, Denise, Débora e Olívia, pelos ótimos momentos compartilhados no Laboratório de Biologia do Sistema Linfóide, pelos ensinamentos e ajuda na execução de ensaios.

Á minha tia, Vilma, pela amizade, apoio e conselhos, que vão além do simples parentesco.

Os meus sogros, Sergio e Mônica, por serem tão presentes e incentivadores.

Ao Pelé e Pequena, por trazerem alegria a minha vida.

A todos que, de uma maneira ou outra, contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	9
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1. Trato gastrointestinal	21
2.2. Alergia alimentar	28
2.3. Potencial dos produtos naturais no tratamento das alergias alimentares.....	34
2.4. <i>Dioscorea</i> spp. (INHAMES)	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. MATERIAIS.....	42
3.1.1. Equipamentos.....	42
3.1.2. Reagentes e solventes	42
3.1.3. Outros materiais.....	44
3.2. MÉTODOS.....	44
3.2.1. Obtenção de <i>D. trifida</i> e <i>D. opposita</i>	44
3.2.2. Preparação dos tubérculos para estudo	46
3.2.3. Preparação dos extratos e frações	46
3.3. Determinação do perfil cromatográfico dos extratos e frações por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	49
3.4. Ensaios biológicos.....	49
3.4.1. Animais.....	49
3.4.2. Vermifugação	50
3.4.3. Preparo da ração de caseína e avaliação do peso corporal	50
3.4.4. Sensibilização e desafio alergênico.....	51
3.4.5. Esquema de tratamento	52
3.4.6. Desenho Experimental	53

3.4.7.	Controle sem tratamento e controle ativo	54
3.4.8.	Eutanásia	55
3.4.9.	Obtenção de soro	55
3.5.	Avaliação morfológica da alergia	55
3.5.1.	Histopatologia	55
3.5.2.	Avaliação da presença de muco contendo mucina neutra	56
3.5.3.	Avaliação do número de mastócitos.....	56
3.5.4.	Avaliação do edema do intestino e do peso do tecido adiposo	56
3.5.5.	Dosagens enzimáticas da atividade de eosinófilos.....	57
3.5.6.	Avaliação da IgE anti-OVA	57
3.6.	Análise estatística	58
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1.	Rendimento das extrações.....	59
4.2.	Perfis cromatográfico por CLAE dos padrões de referência	60
4.2.1.	Perfil cromatográfico do padrão alantoína (Aldrich®)	60
4.2.2.	Perfil cromatográfico do padrão diosgenina (Aldrich®)	61
4.3.	Perfis cromatográficos por CLAE dos extratos e frações de <i>D. trifida</i> e <i>D. opposita</i>	62
4.3.1.	Perfil cromatográfico do extrato bruto de <i>D. trifida</i> (EBT).....	62
4.3.2.	Perfil cromatográfico da fração aquosa de <i>D. trifida</i> (FAT).....	65
4.3.3.	Perfil cromatográfico da fração butanol de <i>D. trifida</i> (FBT)	66
4.3.4.	Perfil cromatográfico da fração diclorometano de <i>D. trifida</i> (FDT).....	69
4.3.5.	Perfil cromatográfico do extrato bruto de <i>D. opposita</i> (EBO)	72
4.3.6.	Perfil cromatográfico da fração aquosa de <i>D. opposita</i> (FAO)	74
4.3.7.	Perfil cromatográfico da fração butanol de <i>D. opposita</i> (FBO)	76
4.3.8.	Perfil cromatográfico da fração diclorometado de <i>D. opposita</i> (FDO)	79
4.4.	Ensaio biológicos.....	82
4.5.	Tratamentos com ração de caseína e desafio com solução de OVA a 20%.....	85
4.5.1.	Consumo da ração de caseína	85
4.5.2.	Consumo de solução de OVA a 20%	88

4.6.	Quantificação da IgE anti-OVA sérica	90
4.7.	Avaliação do edema intestinal	92
4.8.	Avaliação do número de mastócitos na submucosa intestinal	95
4.9.	Quantificação de peroxidase eosinofílica (EPO) na mucosa intestinal.....	97
4.10.	Quantificação do muco intestinal pela coloração P.A.S.	99
4.11.	Avaliação da gordura corporal pela variação do peso (delta).....	108
4.12.	Avaliação da perda da gordura corporal pelo peso da gordura periuterina.....	110
4.13.	Avaliação do peso do fígado	112
4.14.	Índice esplênico	114
5.	CONCLUSÃO.....	116
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
ANEXO I		131
ANEXO II		137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Receita padrão para roedores baseada na AIN-93G.....	51
Tabela 2 – Protocolo de tratamento	53
Tabela 3 – Rendimento do extrato bruto de <i>D. trifida</i> e <i>D. opposita</i>	59
Tabela 4 – Rendimento das frações de <i>D. trifida</i> e <i>D. opposita</i>	59
Tabela 5 – Média do consumo por grupo da ração de caseína suplementada ou não durante o período de tratamento.	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Complexo juncional do epitélio intestinal.....	23
Figura 2 – Classificação das reações adversas aos alimentos	29
Figura 3 – Ilustração equivocada com a foto de <i>Colocasia esculenta</i>	37
Figura 4 – Tubérculos de <i>Dioscorea trifida</i>	45
Figura 5 – Tubérculos de <i>Dioscorea opposita</i>	45
Figura 6 – Percolação do pó dos tubérculos de <i>D. opposita</i> e <i>D. trifida</i>	47
Figura 7 – Obtenção do extrato bruto e frações em diclorometano, butanol e água.	48
Figura 8 – Protocolo experimental de indução de alergia.....	52
Figura 9 – Escala temporal do desenho experimental.....	54
Figura 10 – Cromatograma do padrão de referência alantoína.....	60
Figura 11 – Espectro no UV do padrão alantoína.....	61
Figura 12 – Cromatograma do padrão de referência diosgenina.	61
Figura 13 – Espectros no UV do padrão de referência diosgenina.	62
Figura 14 – Cromatograma de EBT.....	63
Figura 15 – Espectros no UV de EBT.....	64
Figura 16 – Cromatograma de FAT.....	65
Figura 17 – Espectros no UV de FAT.....	66
Figura 18 – Cromatograma de FBT.....	67
Figura 19 – Espectros no UV de FBT.....	68
Figura 20 – Cromatograma de FDT.....	69
Figura 21 – Espectros no UV de FDT.....	70
Figura 22 – Espectros no UV de FDT.....	71
Figura 23 – Cromatograma de EBO.....	72
Figura 24 – Espectros no UV de EBO.....	73
Figura 25 – Espectros no UV de EBO.....	74

Figura 26 – Cromatograma de FAO.	75
Figura 27 – Espectros no UV de FAO.	76
Figura 28 – Cromatograma de FBO.	77
Figura 29 – Espectros no UV de FBO.	78
Figura 30 – Cromatograma de FDO	79
Figura 31 – Espectros no UV de FDO	80
Figura 32 – Espectros no UV de FDO.	81
Figura 33 – Avaliação do consumo diário da ração de caseína.	87
Figura 34 – Avaliação do consumo diário de solução de OVA na semana do desafio oral.....	89
Figura 35 – Avaliação dos anticorpos IgE anti-OVA após o desafio com solução de OVA.	91
Figura 36 – Avaliação do edema intestinal.	93
Figura 37 – Infiltrado de mastócitos na submucosa intestinal..	96
Figura 38 – Quantificação da peroxidase eosinofílica no jejuno distal	98
Figura 39 – Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongos BALB/c evidenciado pela coloração de PAS.	101
Figura 40 – Avaliação histológica do muco neutro produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongo BALB/c tratados com <i>D. trífida</i>	104
Figura 41 – Avaliação histológica do muco neutro produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongo BALB/c tratados com <i>D. opposita</i>	107
Figura 42 – Avaliação do peso corpóreo.	109
Figura 43 – Avaliação do deslocamento das reservas energéticas por visualização da perda de gordura periuterina.	111
Figura 44 – Avaliação do peso do fígado.	113
Figura 45 – Avaliação do índice esplênico.	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIN	– <i>American Institute of Nutrition</i>
AOAC	– <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BHT	– <i>Butylated hydroxytoluene</i>
CLAE	– <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>
COX	– <i>Cicloxygenase</i>
DAD	– <i>Diode array</i>
DATAPLANT	– <i>Banco de dados de amostras de plantas aromáticas, medicinais e</i>
DC	– <i>Dendritic cell</i>
DX	– <i>Dexametasona</i>
ELISA	– <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPM	– <i>Erro padrão da média</i>
EPO	– <i>Peroxidase de eosinófilo</i>
FAE	– <i>Folículo associado ao epitélio</i>
FAO/WHO	– <i>Food Agriculture Organization / World Health Organization</i>
FcεRI	– <i>Receptor de alta afinidade para IgE</i>
FDA	– <i>U.S. Food and Drug Administration</i>
GALT	– <i>Gut associated lymphoid tissue</i>
GATA	– <i>Globulin transcription factor</i>
GM-CSF	– <i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HE	– <i>Hematoxilina-eosina</i>
HTAB	– <i>Brometo de hexadeciltrimetilamônio</i>
IEC	– <i>Intestinal epithelial cell</i>
IEL	– <i>Intraepithelial lymphocyte</i>
IFN-γ	– <i>Interferon-γ</i>
IgA	– <i>Imunoglobulina A</i>
IgA-s	– <i>Imunoglobulina A secretora</i>
IgE	– <i>Imunoglobulina E</i>
IgG	– <i>Imunoglobulina G</i>
IL	– <i>Interleucina</i>
iNOS	– <i>Óxido nítrico sintase induzida</i>
kDa	– <i>Kilodalton</i>
MHC	– <i>Major histocompatibility complex</i>
NO	– <i>Óxido nítrico</i>
OVA	– <i>Ovalbumina</i>
PAF	– <i>Fator ativador de plaquetas</i>
PAS	– <i>Periodic acid shift</i>
PBS	– <i>Salina tamponada com fosfato</i>
PG	– <i>Prostaglandina</i>
pH	– <i>Potencial hidrogeniônico da água</i>
TGI	– <i>Trato gastrointestinal</i>
Th1	– <i>Linfócito T helper 1</i>
Th2	– <i>Linfócito T helper 2</i>
TNF-α	– <i>Fator de necrose tumoral-α</i>
tR	– <i>Tempo de retenção</i>
UV	– <i>Ultravioleta</i>

RESUMO

A alergia alimentar é uma reação de hipersensibilidade imediata mediada por IgE, que ocorre após a ingestão de determinados alimentos por indivíduos previamente sensibilizados. A incidência da alergia alimentar tem sofrido um grande aumento nas ultimas décadas, tanto em países desenvolvidos, quanto em desenvolvimento. Dados referentes ao ano de 2009, por exemplo, citam que a doença afeta um percentual de 3% a 4% da população mundial de adultos e até 6% das crianças. O desenvolvimento de novos produtos e tratamentos é importante e desejável, sendo os produtos naturais uma importante fonte de substâncias bioativas. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo animal para o estudo da alergia alimentar, à partir da sensibilização de camundongos BALB/c com ovalbumina (OVA). Após sensibilização, os camundongos são desafiados com uma solução de OVA a 20%. Este protocolo desencadeia os sintomas da alergia alimentar, como o aumento da produção de IgE, do número de mastócitos, de eosinófilos, geração de edema e aumento da produção de muco pelas células caliciformes do trato gastrointestinal. Neste estudo, animais sensibilizados foram tratados com extratos brutos e frações obtidas das espécies de inhame *D. trifida* e *D. opposita*, com o objetivo de avaliar o potencial destas plantas no tratamento da alergia alimentar. Os animais sensibilizados tratados demonstraram diminuição da produção de IgE. Os tratamentos promoveram também uma diminuição do edema gerado pela inflamação alérgica, do número mastócitos na submucosa intestinal, e do número de eosinófilos. Os tratamentos foram capazes de diminuir a produção de muco pelas células caliciformes do trato gastrointestinal dos animais alérgicos. Os resultados demonstram que os inhames *D. trifida* e *D. opposita* contém substâncias potencialmente ativas para o tratamento das alergias alimentares. Elas agem a partir da diminuição da inflamação, dependendo da dose, alterando os sintomas observados em animais alérgicos.

Palavras-chave: alergia alimentar; *Dioscorea trifida*; *Dioscorea opposita*; inhame; nutracêutico.

ABSTRACT

Food allergies are immediate hypersensitivity reactions mediated by IgE that occur after the ingestion of specific food by an individual with a pre-existing sensitivity. Occurrence of food allergies have increased significantly in the last few decades, both in developed and developing countries. Data from 2009, as an example, have show that this condition affects between 3% and 4% of the world's adult population and up to 6% of children. The development of new products and treatments are important and desirable, in particular that of natural products that are an important source of bio-active substances. Our research team has developed an animal model to study food allergies by exposing BALB/c mice to ovalbumin (OVA). After exposure, the mice are given a 20% OVA solution. This protocol develops food allergies symptoms on the mice, such as the increase in IgE production, number of mastocytes, eosinophils, edema and mucus production by the goblet cells of the gastrointestinal system. In this study, exposed mice are treated with raw extracts and fractions extracted from yam *D. trifida* and *D. opposita* in order to evaluate the potential of these plants to treat the allergies. Exposed animals that were treated showed reduced IgE production. Treatment also promoted reductions in the edema generated by the allergic inflammation. The results show that yam *D. trifida* and *D. opposita* also contain potentially active substances to aid in the treatment of food allergies. They act by reducing inflammation, depending on the dosage, by altering the observed symptoms in allergic animals.

Key Words: food allergies; *Dioscorea trifida*; *Dioscorea opposita*; yam; nutraceutical.

1. INTRODUÇÃO

A alergia é uma disfunção do sistema imune, caracterizada por um aumento na capacidade de linfócitos B sintetizarem imunoglobulinas (Ig) do isotipo E, contra antígenos que invadem o organismo através da inalação, ingestão ou penetração pela pele (PICCINNI et al., 2000). Esta invasão conduz a uma hiperatividade imunológica e a uma inflamação alérgica (BUFE, 1998). Apesar da maior parte desses antígenos serem considerados inócuos, eles são capazes de induzir quadros patológicos em indivíduos geneticamente susceptíveis quando as barreiras fisiológicas são rompidas (SAMPSON, 1999).

Substâncias que causam as reações alérgicas são chamadas alérgenos e incluem proteínas alimentares, pólen, poeira, ácaros, cosméticos, esporos fúngicos e até pelos de animais. A definição de alérgeno é a de uma substância capaz de produzir uma reação alérgica, por induzir a formação de anticorpos IgE específicos. Os anticorpos IgE têm suficiente avidéz para causar sensibilização e, quando da re-exposição, a habilidade de induzir uma resposta alérgica (HELM et al., 2003).

As alergias alimentares decorrem de sensibilização a alérgenos alimentares com formação de anticorpos específicos da classe IgE, que se fixam a receptores de mastócitos e basófilos (BREITENEDER, 2004). Contatos subseqüentes com este mesmo alimento e sua ligação cruzada com moléculas de IgE próximas determinam a liberação de mediadores vasoativos, que induzem às manifestações clínicas de hipersensibilidade imediata (BREDEHORST & DAVID, 2001). Reações cutâneas (dermatite atópica, urticária, angioedema), gastrintestinais (edema e prurido de lábios, língua ou palato, vômitos e diarreia), respiratórias (asma, rinite) e reações sistêmicas (anafilaxia com hipotensão e choque) são exemplos de manifestações mais comuns. A reação de fase inicial ocorre dentro de minutos após a exposição ao alérgeno, enquanto a reação de fase tardia ocorre horas depois e envolve a secreção de citocinas como o TNF- α e IL-4 (TEWTRAKUL & ITHARAT, 2006; HOLGATE & POLOSA, 2008).

Os principais alimentos que têm sido citados como causadores de alergias alimentares são: leite, ovos, amendoim, trigo, castanhas, camarão, peixe e soja (SICHERER, 2002).

A alergia alimentar é um sério problema de saúde pública (NOWAK-WEGRZYN, 2007). Dados referentes ao ano de 2009, por exemplo, citam que a alergia alimentar afeta um percentual de 3% a 4% da população mundial de adultos e de até 6% das crianças e esta prevalência está aumentando (SICHERER & SAMPSON, 2009).

O tratamento da alergia alimentar é feito pela intervenção na dieta alimentar e no uso de anti-histamínicos, nos casos mais leves. No caso de crianças não está recomendada a administração, durante os primeiros meses de vida, das proteínas do leite de vaca, e sim do aleitamento materno exclusivo ou do uso de fórmulas hidrolisadas. Recomenda-se também a introdução mais tardia de alimentos com maior potencial alergênico, como o ovo, o peixe e os amendoins. Em adultos a exclusão do alimento pode ser temporária ou definitiva, dependendo da gravidade das reações alérgicas, que podem chegar ao choque anafilático (FERREIRA & SEIDMAN, 2007).

Os produtos naturais são usados por povos orientais para o tratamento das alergias alimentares. Na Tailândia, por exemplo, os inhames são usados há centenas de anos pelos médicos tradicionais. Um estudo sobre o uso dessas plantas constatou que o extrato etanólico dos tubérculos de *Dioscorea membranacea* exibiu potente atividade antialérgica. Dos 8 compostos isolados, duas naftofuranoxepinas, uma fenantraquinona e a diosgenina apresentaram forte inibição da atividade de células envolvidas no processo alérgico (TEWTRAKUL & ITHARAT, 2006). Tal fato ilustra a funcionalidade que os alimentos podem apresentar em relação ao tratamento das alergias alimentares. O consumo de tais plantas alimentícias, normalmente presentes na dieta, poderia contribuir para a diminuição das reações provocadas por alérgenos alimentares.

Novos tratamentos para a alergia alimentar, inclusive preventivos, são necessários. O Brasil possui a maior biodiversidade mundial (BRANDÃO et al., 2008; BRANDÃO et al., 2009), sendo fonte importante para obtenção de novas substâncias para o tratamento de enfermidades, dentre elas, a alergia alimentar.

Desta forma, esse trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial das espécies *D. trifida* e *D. opposita* (Dioscoreaceae, inhames) no tratamento da alergia alimentar induzida com ovalbumina em camundongos BALB/c. Os objetivos específicos foram:

- 1- Traçar o perfil cromatográfico dos extratos e frações por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- 2- Submeter as frações a ensaios *in vivo* para verificar eficácia na alergia alimentar em modelo murino;
- 3- Avaliar se os tratamentos interferem na produção de IgE;
- 4- Avaliar se os tratamentos interferem na (i) produção de muco; (ii) edema; (iii) infiltrado inflamatório de eosinófilos; (iv) número de mastócitos;
- 5- Avaliar se os tratamentos interferem no emagrecimento observado em animais alérgicos;
- 6- Avaliar se os tratamentos interferem na redução de tecido adiposo e baço de animais alérgicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Trato gastrointestinal

A mucosa do trato gastrointestinal (TGI), com seus 400m² de área superficial e aproximadamente 8 metros de comprimento, é o maior órgão linfóide do corpo humano. Ela representa o local com a maior exposição aos patógenos e antígenos do corpo (MACDONALD & MONTELEONE, 2005). Aproximadamente 30 kg de proteínas alimentares entram em contato com o TGI anualmente (MESTECKY, 2005) sendo 60g absorvidas diariamente (BRANDTZAEG, 1998; INSTITUTE OF MEDICINE, 2002). O TGI abriga também uma enorme microbiota, com densidade aproximadamente de 10¹⁴ microorganismos e aproximadamente 500 a 1000 espécies (SHANAHAN, 2002; XU & GORDON, 2003; SONNENBURG et al., 2004). Dessa maneira as principais fontes de perturbação da atividade imunológica estão presentes na mucosa do TGI e os eventos iniciados neste local têm importantes respostas locais e sistêmicas (MENEZES et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2009).

Substâncias que causam as reações alérgicas são chamadas alérgenos e incluem proteínas alimentares, pólen, poeira, ácaros, cosméticos, esporos fúngicos e até pelos de animais. Em geral, alérgeno é uma proteína capaz de produzir uma reação de hipersensibilidade imediata (do tipo 1) induzindo a formação de anticorpos IgE específicos pelas células B diferenciadas em plasmócitos (BREITENEDER, 2004; BREDEHORST & DAVID, 2001; BANNON, 2004). Apesar da maior parte desses antígenos serem considerados inócuos, eles são capazes de induzir quadros patológicos em indivíduos geneticamente susceptíveis quando as barreiras fisiológicas são rompidas (SAMPSON, 1999).

Apesar da constante exposição aos alérgenos, apenas alguns indivíduos desenvolvem alergia alimentar, demonstrando que existe uma predisposição genética, além de mecanismos de defesa competentes no TGI, que induzem a tolerância imunológica sistêmica. Esta resposta, conhecida como tolerância oral, é de enorme importância porque é um contínuo evento imunológico natural dirigido a antígenos externos. A tolerância oral pode ser definida como a supressão específica da resposta imune

celular e/ou humoral a um antígeno, por administração prévia deste antígeno pela via oral (FARIA & WEINER, 2005). Cabe ao TGI tolerar as proteínas da dieta e os microorganismos inócuos, para manter a integridade da mucosa, permitir a absorção dos nutrientes e atuar de maneira a garantir a homeostase local (KIYONO & FUKUYAMA, 2004; FARIA & WEINER, 2005; HYUN & BARRET, 2006). Assim, o TGI efetua diversas funções como discriminar entre os microorganismos invasivos e os inócuos, iniciar uma resposta imune ativa e prevenir a disseminação de infecções ou alternativamente, induzir uma resposta de tolerância imunológica local e sistêmica. Além disso, o TGI deve simultaneamente identificar as proteínas da dieta e os componentes alimentares (lipídios, carboidratos e micronutrientes, como minerais e vitaminas), promover a digestão, modificação e a absorção de nutrientes (ROTHENBERG & HOGAN, 2006; UNTERSMAYR & JENSEN-JAROLIM, 2006; SICHERER & SAMPSON, 2009).

A tolerância oral aos nutrientes da dieta depende de uma barreira intestinal intacta e imunologicamente ativa. A mucosa intestinal é composta de uma camada simples de células epiteliais intestinais (IEC) e da lâmina própria. O epitélio separa o ambiente externo do interno e assim atua prevenindo que microorganismos patógenos, bem como substâncias nocivas no lúmen, ganhem acesso ao corpo. O epitélio intestinal é formado principalmente por enterócitos, seguido de outros tipos celulares como os linfócitos intraepiteliais (IEL), as células M, as células de *Paneth* e as células caliciformes (MCKAY, 2005). Esta barreira inclui o epitélio intestinal e suas junções celulares nos enterócitos, o muco, o pH ácido gástrico, as enzimas lumbais e na borda em escova, os sais biliares, a microbiota residente e a motilidade intestinal (FARHADI et al., 2003). Este conjunto de elementos fazem parte dos mecanismos de defesa inespecíficos. Já o tecido linfóide associado ao intestino (GALT), seus componentes e a imunoglobulina IgA secretória (IgA-s), são os mecanismos de defesa imunológicos. O GALT é formado por ambos os sistemas imunes: o inato (células natural-killer, leucócitos polimorfonucleados, macrófagos, células epiteliais e receptores *toll-like*) e o adaptativo (linfócitos intraepiteliais e da lâmina própria, placas de *Peyer*, IgA-s e citocinas). Eles promovem uma barreira ativa contra a entrada de antígenos (SAMPSON, 2003; CHEHADE & MAYER, 2005; TAKAYAMA et al., 2007; SICHERER & SAMPSON, 2009).

A membrana lipídica do epitélio intestinal é impermeável a moléculas polares carregadas. A maioria das moléculas só conseguem cruzar o epitélio através de transporte transcelular se existir um transportador de membrana específico. A rota de fluxo paracelular é bloqueada, pois estas células estão unidas na lateral das membranas, em sua parte apical, pelos complexos juncionais, formados pelas junções oclusivas, junções aderentes, junções comunicantes e desmossomos (Figura 1; TSUKITA et al., 2001). Os complexos juncionais permitem a passagem paracelular de apenas pequenas moléculas, menores que 500 daltons (YU, 2009).

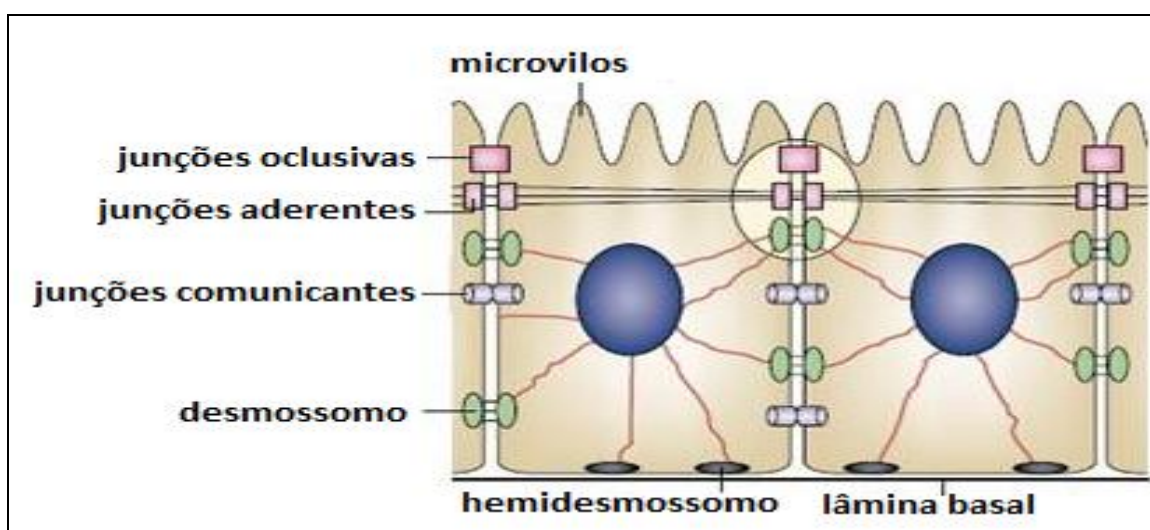


Figura 1 – Complexo juncional do epitélio intestinal (adaptado de TSUKITA et al., 2001).

Provavelmente, a barreira mais significativa à entrada de antígenos na mucosa é a presença de enzimas proteolíticas, desde a cavidade oral até o intestino. As proteínas ingeridas na dieta são sujeitas à degradação e destruição de seus epitopos conformacionais pelo ácido gástrico e enzimas digestivas luminiais, resultando, em muitos casos, na destruição dos epitopos imunogênicos da proteína. Ao realizarem a quebra de grandes polipeptídeos em pequenos dipeptídeos e tripeptídeos, estas enzimas permitem que ocorra o processo de absorção dos nutrientes e convertem proteínas potencialmente imunogênicas em peptídeos inócuos. Oligopeptídeos, constituídos por menos de 8 aminoácidos, não são reativos às estruturas envolvidas em reconhecimento e apresentação e são imunologicamente ignorados. A ação dessas proteases, juntamente com o efeito emulsificante dos sais biliares e a atuação de enzimas que quebram carboidratos, formam um potente sistema capaz de alterar a exposição a antígenos. Apesar de todos estes processos digestivos citados, estima-se

que em adultos, aproximadamente 2% dos antígenos alimentares ingeridos sejam absorvidos e passem pela barreira intestinal na forma intacta (HUSBY et al., 1987; YORK et al., 1999; MAYER, 2003; CHEHADE & MAYER, 2005; MACDONALD & MONTELEONE, 2005; UNTERSMAYR & JENSEN-JAROLIM, 2006).

A microbiota intestinal é também um importante componente dessa barreira à entrada de antígenos e patógenos. Dentre as funções das bactérias intestinais estão a digestão de polissacarídeos da dieta com economia energética ao indivíduo e a produção de vitamina K (SCHENK & MUELLER, 2008). A microbiota intestinal atua também na proteção do indivíduo contra infecções por patógenos. Dois fatores distintos contribuem para este efeito protetor. Em primeiro lugar, muitos patógenos intestinais são pouco adaptados para competir com os microorganismos comensais pelos nutrientes da dieta. Segundo, os microorganismos simbiotes estimulam respostas imunes contra os patógenos (MAYER, 2003; MESTECKY et al., 2005; DUERKOP et al., 2009; MACPHERSON & HOOPER, 2010).

Ocasionalmente, micro-organismos comensais e antígenos luminais podem driblar a barreira intestinal e invadir a mucosa. Entretanto, os componentes da imunidade adaptativa e inata, localizados predominantemente na lâmina própria, são capazes de prevenir uma reação inflamatória excessiva. Os micro-organismos comensais, que ocasionalmente ganhem acesso à lâmina própria, são rapidamente fagocitados pelos macrófagos residentes na região subepitelial. Estes macrófagos apresentam uma potente atividade fagocítica e bactericida, mas não produzem citocinas pró-inflamatórias, prevenindo excessivas reações imunes contra micro-organismos comensais e antígenos da dieta, que poderiam levar à destruição do tecido e condições de inflamação crônica (SMITHIES et al., 2005).

Outro componente importante na formação de uma barreira contra a entrada de antígenos e patógenos na mucosa intestinal é o muco secretado pelas células caliciformes. O muco é constituído por íons, imunoglobulinas, proteínas, lipídios, água e por glicoproteínas chamadas mucinas. A taxa de secreção destes componentes do muco, e sua densidade, são variáveis e dependem da quantidade de antígenos e patógenos que chegam à superfície epitelial, da atividade da microbiota, e da taxa de eliminação do mesmo pela ação da mucociliaridade. O muco ajuda a criar um

ecossistema local epitelial, contribuindo para selecionar e hospedar a microbiota, já que os microorganismos comensais se ligam especificamente às glicoproteínas do hospedeiro, enquanto definem e protegem o epitélio contra os patógenos (MESTECKY et al., 2005). O muco forma uma camada de gel viscoso que se estende até 150µm da superfície da célula epitelial intestinal e forma dois extratos distintos estruturalmente. A porção mais interna é mais densa, está firmemente ligada à região apical do epitélio intestinal e não contém bactérias. Já a porção externa é móvel, tem um volume expansível devido à quebra de ligações peptídicas das proteínas do muco e é colonizada por grande número de bactérias (JOHANSSON et al. 2008). O muco atua de maneira a dificultar a entrada dos microorganismos patógenos ao retê-los na sua camada mais densa, promovendo sua eliminação pela motilidade intestinal e assim, evitando que esses entrem em contato com as células epiteliais intestinais. (MAYER, 2003). No muco encontram-se presentes os grânulos secretados pelas células de *Paneth*. Estes grânulos contêm lisozimas, fosfolipase A₂ secretória e α-defensinas, substâncias antimicrobianas envolvidas na defesa do hospedeiro (AYABE et al., 2000). Além dessas funções o muco também serve de reservatório para as IgA-s (MAYER, 2003).

No intestino, as células menos protegidas pelo muco são as células M do epitélio associado às placas de *Peyer*, já que ocorre pouca ou nenhuma célula caliciforme neste epitélio (KRAEHENBUHL & NEUTRA, 2000; NEWBERRY & LORENZ, 2005). Assim, os antígenos ou patógenos que o muco falhou em reter e eliminar serão transportados para o interior das placas de *Peyer* e poderá haver a produção de imunoglobulinas, como a IgA-s, que posteriormente ajudarão o muco a reter e eliminar com mais eficiência essas partículas (MAYER, 2003; MESTECKY et al., 2005).

A IgA-s é um anticorpo secretado no lúmen sob a forma de dímeros pelos plasmócitos presentes na lâmina própria do TGI, provenientes de células B ativadas nas placas de *Peyer* e linfonodos mesentéricos (SANTIAGO et al., 2008). Essa imunoglobulina atua de maneira benigna, já que a ligação das IgA-s ao antígeno ou patógeno não leva à ativação do processo inflamatório, prevenindo, desta forma, o desenvolvimento de inflamação crônica no TGI (VAN WIJK & KNIPPLES; 2007). A IgA-s atua opsonizando os patógenos, reduzindo sua motilidade e propriedades adesivas, impedindo assim a ligação desses às células epiteliais e ajudando na eliminação desse complexo do muco

pela ação da motilidade intestinal. Ela atua também aglutinando antígenos, mantendo-os presos na camada de muco e facilitando sua remoção do hospedeiro. Em ambos os casos a IgA-s atua na exclusão imunológica (BRANDTZAEG, 1998; MAYER, 2003; BRANDTZAEG, 2009). A enorme carga antigênica na extensa superfície epitelial leva à necessidade de produção abundante de IgA-s. Essa necessidade reside no fato de que 80% das células B estão localizadas no TGI e que de 80 a 90% dessas células produzem IgA-s (BRANDTZAEG et al., 1999). Em recém-nascidos o sistema de secreção de IgA-s não está completamente ativo, situação que persiste até os 4 anos de idade. Tem sido postulado que devido à imaturidade desse sistema, todos os outros fatores que ajudam a compor a barreira epitelial intestinal contra a entrada de patógenos e antígenos não estão completamente maduros até esta idade. Esse fato pode facilitar a passagem de proteínas não digeridas levando à ativação de resposta imune (MAYER, 2003). Esta penetração de macromoléculas da dieta no organismo através da mucosa intestinal pode acarretar sérias consequências imunológicas, sendo, uma delas, a alergia alimentar (SALDANHA et al., 2004).

Apesar de todos estes mecanismos de defesa citados, a barreira epitelial não previne completamente a entrada de antígenos no tecido epitelial intestinal. Os antígenos podem cruzar a superfície epitelial através de junções oclusivas defeituosas, como nos casos de inflamação, ou através das células M do folículo associado ao epitélio (FAE), das células dendríticas (DC) e dos enterócitos ou IECs (SAMPSON, 1999; MAYER, 2003).

O FAE recobre as placas de *Peyer* e os folículos linfóides isolados. Ele abrange células epiteliais colunares, células M, linfócitos intraepiteliais, borda em escova pouco pronunciada e pouca ou nenhuma célula caliciforme (KRAEHENBUHL & NEUTRA, 2000; MOWAT, 2003; NEWBERRY & LORENZ, 2005). As células M transportam os antígenos capturados no lúmen diretamente para células localizadas nos tecidos organizados, como as placas de *Peyer*, sem processá-los (NEUTRA et al., 2001). As placas de *Peyer* são encontradas na submucosa ao longo de todo o intestino delgado. Elas são formadas por agregados linfóides e são separadas do lúmen intestinal pelo FAE. Macrófagos residentes nesta placa fagocitam, processam e apresentam peptídeos unidos à molécula de histocompatibilidade principal (MHC) II para linfócitos T. Estes, ativam linfócitos B comprometidos com a síntese de IgA. As células T e B

migram, então, das placas de *Peyer* para os linfonodos mesentéricos; destes, trafegam para o ducto torácico chegando à circulação sangüínea. Da circulação, os linfócitos ativados retornam à mucosa digestiva e passam a residir na lâmina própria onde irão secretar mais IgA (HELM & BURKS, 2000).

As DCs apresentadoras de antígenos podem capturá-los do lúmen através de extensões da membrana entre as células epiteliais. Elas podem apresentar subsequentemente, esses antígenos localmente aos linfócitos T e/ou nos linfonodos mesentéricos (RESCIGNO et al., 2001; DUBOIS et al., 2005; MACDONALD & MONTELEONE, 2005; BURKS et al., 2008; SICHERER & SAMPSON, 2009).

Os linfonodos mesentéricos (LnM) são divididos em três regiões com diferentes composições celulares: córtex, paracórtex e medula. O córtex apresenta folículos ricos em linfócitos T e DCs. O paracórtex é caracterizado por altas proporções de células T e DCs. Já a medula, a região mais profunda do linfonodo, é composta de linfócitos T e B e de linfócitos secretores (CRIVELLATO et al., 2004). Células T *naïve* (Th0) circulantes, por exemplo, chegam ao linfonodo através de vênulas pós-capilares chamadas de vênulas endoteliais altas, e a entrada desses linfócitos T para a região paracortical é guiada por quimiocinas produzidas por células epiteliais, estromais e DCs. No córtex, as DCs residentes capturam e processam os antígenos que chegam ao linfonodo. DCs maduras também migram para o paracórtex e apresentam os antígenos a células Th0 ou células T citotóxicas (Tc). Células T efetoras são geradas e a resposta imune adaptativa se inicia. Enquanto os linfócitos efetores ou reguladores deixam o linfonodo e migram para outros tecidos, algumas células Th permanecem como células de memória ou movem-se para os centros germinativos para promover a diferenciação final de linfócitos B em plasmócitos secretores de imunoglobulinas (CRIVELLATO et al., 2004).

Já os enterócitos ou IECs atuam como apresentadores de antígenos “não profissionais” ao amostrar antígenos parcialmente processados do lúmen e apresentar estes, através de seu MHC de classe II, às células T próximas (SAMPSON 1999; MAYER, 2003; KUNISAWA & KIYONO, 2005). Mas devido ao fato das IECs apresentarem poucas moléculas co-estimulatórias, essa interação IEC/célula T pode levar a supressão da resposta imune (DUBOIS et al., 2005).

Desta maneira, a barreira epitelial do trato gastrointestinal se apresenta como uma estrutura altamente dinâmica que limita, mas não exclui a entrada de antígenos no tecido epitelial intestinal, onde o sistema imune amostra constantemente antígenos através do FAE, das DC e das células epiteliais intestinais (MACDONALD & MONTELEONE, 2005)

2.2. Alergia alimentar

As desordens gastrointestinais alérgicas representam um espectro diverso de doenças inflamatórias que têm uma aumentada incidência e severidade ao longo das últimas décadas (BRANDT et al., 2003; OSTERBALLE, 2005; SAMPSON & WANG, 2009; SICHERER & SAMPSON, 2009).

Devido à diversidade de termos empregados para essas desordens gastrointestinais e à dificuldade dos indivíduos em detectar com precisão que tipo de reação adversa apresentam a um dado alimento (LACK, 2008; ZUIDMEER et al., 2008) alergistas e gastroenterologistas propuseram uma nomenclatura padronizada baseada nos mecanismos destas reações (SAMPSON, 2001).

As reações adversas aos alimentos são definidas como quaisquer reações aberrantes após a ingestão de um alimento ou aditivo alimentar. As reações adversas aos alimentos podem ser divididas em aversão, reações tóxicas e não-tóxicas. As reações de aversão são devidas principalmente a fatores psicológicos, como o fato do indivíduo não gostar de algum alimento, enquanto que as reações tóxicas podem ocorrer a qualquer indivíduo ao ingerir uma dose suficiente da toxina alimentar como, por exemplo, intoxicação por toxina escombróide (Figura 2) (PATRIARCA et al., 2009; CARMO et al., 2010). As reações não-tóxicas dependem da suscetibilidade do indivíduo e podem ser não imuno-mediadas (causadas unicamente por características do indivíduo, como desordens metabólicas) ou imuno-mediadas (alergia alimentar). A alergia alimentar é definida como uma reação de hipersensibilidade que envolve o sistema imune (mediada por IgE). As reações de hipersensibilidade que não envolvem o sistema imune, como a doença celíaca, não são consideradas como alergia alimentar. Ao contrário, elas são chamadas hipersensibilidade alimentar não alérgica,

também referida como intolerância alimentar (não mediada por IgE) (SAMPSON, 1999; PATRIARCA et al., 2009).

A alergia alimentar é uma disfunção do sistema imune. Ela é um sério problema de saúde devido aos seus efeitos graves no organismo e por ter alcançado proporções de epidemia tanto nos países em desenvolvimento, quanto nos países desenvolvidos (HOLGATE, 1999; SICHERER & SAMPSON, 2009;). A resposta alérgica mais severa, conhecida por choque anafilático, por exemplo, pode levar a consequências fatais (CARA et al., 2004).

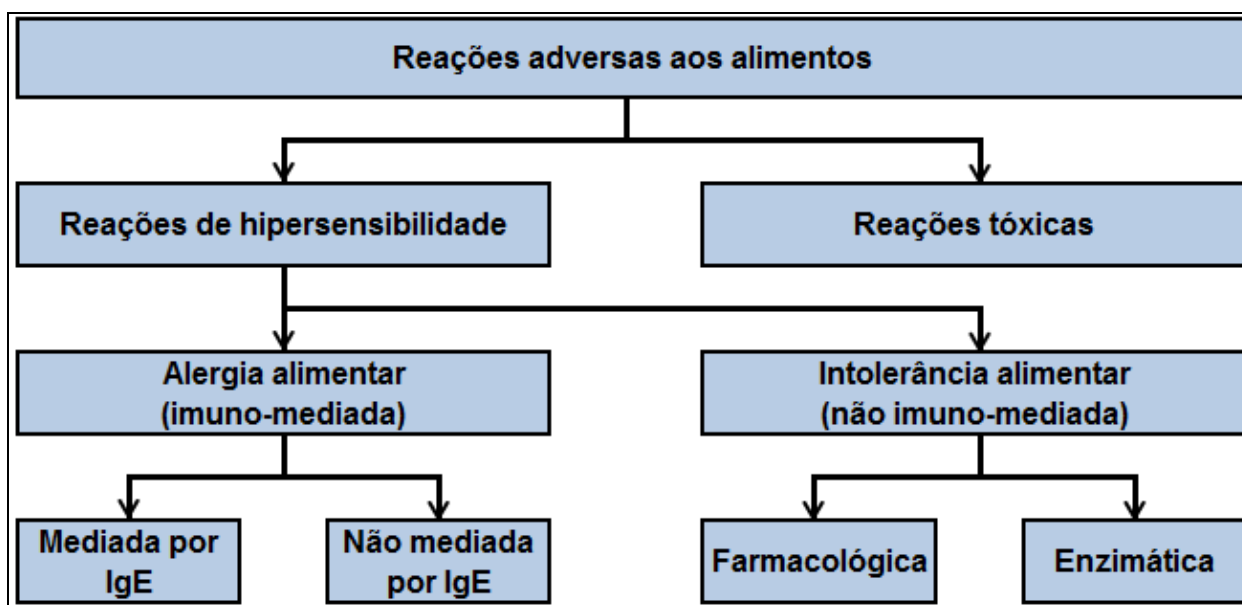


Figura 2 – Classificação das reações adversas aos alimentos (adaptado de PATRIARCA et al., 2009).

Os sintomas clínicos entre alergia e intolerância podem ser bem similares incluindo diarreia, dor abdominal, vômito e urticária. Esta similaridade de sintomas tem influenciado os dados de prevalência de alergia alimentar, pois na maioria dos estudos leva-se em consideração apenas a percepção de alguma reação adversa ao alimento, pelo indivíduo (LACK, 2008; ZUIDMEER et al., 2008). A alergia alimentar é diagnosticada pela demonstração de que a retirada do alimento da dieta leva ao desaparecimento dos sintomas e o subsequente desafio com o mesmo alimento leva ao reaparecimento dos sintomas anteriores. O padrão utilizado para diagnóstico da alergia alimentar é o teste de desafio oral duplo-cego controlado por placebo. Considera-se que somente os dados de prevalência obtidos por este teste são confiáveis (SAMPSON, 1997; SAMPSON, 2001).

Em indivíduos saudáveis, a ingestão de alimentos determina um estado de tolerância, fato este que torna as alergias alimentares um evento relativamente raro. Para o desenvolvimento da alergia alimentar é necessário que o indivíduo seja suscetível, que a proteína da dieta tenha capacidade alergênica e que haja quebra dos mecanismos de defesa do TGI, havendo a incapacidade de desenvolver a tolerância oral (SICHERER & SAMPSON, 2009).

Pacientes com outra desordem atópica (dermatite atópica, asma, rinite alérgica) apresentam alta prevalência de alergia alimentar comparado à população em geral, indicando que a suscetibilidade para produção de IgE pode ser um fator muito importante. A observação do padrão familiar sugere um componente genético. A propensão à produção de IgE sofre influência de vários genes hereditários. Provavelmente, mais de 20 genes estão envolvidos no desenvolvimento de doenças alérgicas (LEUNG, 1998).

Conforme citado por SAMPSON (2004), embora a diversidade da dieta humana seja enorme, há apenas alguns alimentos que são responsáveis pela maioria das alergias alimentares, sugerindo que esses alimentos apresentam propriedades inerentes que os fazem potentes estimuladores de respostas imunes inflamatórias. Geralmente, tais alimentos contêm glicoproteínas com peso molecular de 10 a 70kDa e que são relativamente estáveis ao calor, à acidez e as proteases (SICHERER & SAMPSON, 2009). Entre os alimentos causadores de reações de hipersensibilidade mais comuns estão o leite, ovo, amendoim, trigo, soja, castanhas, frutos do mar e peixe (BOCK et al., 2001; SICHERER, 2002; BERNSTEIN et al., 2003).

Embora haja alguns avanços na imunoterapia das alergias alimentares, o único meio efetivo e confiável para prevenir os sintomas é evitar os alérgenos específicos (KIELLMAN, 1998). Entretanto o problema permanece devido à presença de “alérgenos ocultos” presentes em alimentos processados (GABY, 1998; SCHÄPPI et al., 2001) e à falta de uniformidade dos rótulos de alimentos (BINDSLEV-JENSEN & POULSEN, 1997; MILLS, 2004). Outro fator importante a ser considerado é que a restrição de alimentos da dieta na infância pode comprometer a sua nutrição e o desenvolvimento físico e mental. Nos adultos, a mudança nutricional pode gerar profundas mudanças em seu estilo de vida, representando sacrifícios psicológicos, sociais e práticos (NIKOLIC et al., 2007).

O desenvolvimento da alergia alimentar pode ser dividido em duas fases: sensibilização alérgica e desenvolvimento dos sintomas (HERZ, 2008). A alergia ocorre quando os antígenos são expostos às células apresentadoras de antígenos profissionais levando principalmente à ativação de células T helper 2 (Th2) e síntese de IgE específica para o alérgeno (PICCINI et al., 2000; HOLGATE & POLOSA, 2008).

A apresentação destes peptídeos acontece por via MHC de classe II. Esta fase é conhecida como sensibilização alérgica. Na presença desta estimulação, as células T regulam a expressão de um conjunto de genes codificados no cromossoma, que incluem os genes que codificam interleucina-3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (granulocyte / macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF). Estas citocinas estão envolvidas no recrutamento de mastócitos (IL-4, IL-9 e IL-13) e na maturação de eosinófilos (IL-3, IL-5 e GM-CSF), basófilos (IL-3 e IL-4) e na diferenciação, proliferação e mudança da classe de imunoglobulina para produção de IgE (IL-4 e IL-13) (HOLGATE & POLOSA, 2008). Essa mudança de classe depende de dois sinais separados, que incluem as citocinas IL-4 e IL-13 (MINTON, 2008) e da interação do receptor de membrana CD40 dos linfócitos B com o seu ligante CD154, presente em linfócitos B, linfócitos T, basófilos, eosinófilos, macrófagos e células dendríticas (VAN KOOTEN & BACHEREAU, 2000; BISHOP & HOSTAGER, 2001; SCHONBECK & LIBBY, 2001; XU & SONG, 2004).

Os anticorpos IgE específicos produzidos entram na circulação e se ligam aos receptores de alta afinidade (FcεRI) em mastócitos e basófilos nos tecidos, de modo que estas células ficam sensibilizadas e preparadas para reagir ao encontro com o alérgeno, em um segundo momento (SAMPSON, 1999; FINKELMAN et al., 2005).

A exposição subsequente ao alérgeno causa o recrutamento de células inflamatórias e ativação e liberação de mediadores, que são responsáveis pelo desencadeamento dos sintomas com as reações alérgicas imediatas (de 1 a 30 minutos) e reações alérgicas tardias (entre 6 a 72 horas) (BREDEHORST & DAVID, 2001; HELM et al., 2003; HOLGATE & POLOSA, 2008). Os grânulos de secreção incluem, histamina, citocinas e proteases como, triptase e carboxipeptidase A. Posteriormente ocorre a ativação de fosfolipase A2 (PLA2), seguida pelas cicloxigenases (COX) e lipoxigenases, produzindo os metabólitos do ácido araquidônico como as prostaglandinas, leucotrienos e fator de

ativação de plaquetas (PAF). Mastócitos também liberam citocinas e quimiocinas, que recrutam macrófagos, eosinófilos e basófilos que compõem a resposta tardia (BINGHAM & AUSTEN, 2000; HOLGATE & POLOSA, 2008).

A histamina estimula a vasodilatação, aumenta a permeabilidade vascular, a taxa dos batimentos cardíacos, a contração cardíaca e pode levar à secreção de muco, tanto no trato digestivo, quanto no respiratório. A prostaglandina D2 (PGD2) causa vasoconstrição nos pulmões e coração, gera vasodilatação periférica e pode também estimular a produção de muco. Os leucotrienos produzem broncoconstrição e aumento da permeabilidade vascular. O PAF é também um potente broncoconstritor e aumenta a permeabilidade vascular (CARA et al., 2004; PEAVY & METCALFE, 2008). As ações vasodilatadoras e de aumento da permeabilidade vascular destes mediadores causam eritema na pele e edema no subcutâneo, trato respiratório e digestivo. A citocina inflamatória, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é liberada, tanto na fase imediata, quanto na fase tardia da alergia, junto com outras citocinas e quimiocinas. O TNF- α ativa neutrófilos e recruta outras células efectoras, além de aumentar a síntese de quimiocinas (ANDERSON, 1997; FULEIHAN, 1998; BINGHAM & AUSTEN, 2000; PEAVY & METCALFE, 2008). No trato gastrointestinal, a histamina, as prostaglandinas e o PAF geram um desequilíbrio eletrolítico com estimulação do transporte iônico epitelial e transporte passivo de água, levando a um estado de diarreia e aumento da permeabilidade a macromoléculas (YU & PERDUE, 2001). Tanto no trato respiratório como no digestivo, ocorre a produção de muco, sendo este evento mediado principalmente pela IL-4 e IL-13 (BLANCHARD et al., 2004; DOURADO et al., 2010).

Outra característica importante nas reações alérgicas é o acúmulo de eosinófilos. A ativação e o recrutamento dos eosinófilos para as áreas inflamatórias são dependentes da ação de eotaxina e IL-5 (ROTHENBERG et al., 2001). A IL-5, produzida via Th2, estimula a maturação de eosinófilos e a mobilização dessas células da medula óssea para o sangue. Os eosinófilos são recrutados para o tecido principalmente em resposta à produção local de eotaxina (FOSTER et al., 2002). No local da lesão, os eosinófilos liberam uma abundância de mediadores altamente citotóxicos e pró-citotóxicos, como a proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica e peroxidase, contribuindo para a fase tardia da reação (BISCHOF & MEEUSEN, 2002). Os eosinófilos também podem

ser uma importante fonte de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-3 (IL-3), IL-5 e IL-13 (HOLGATE & POLOSA, 2008).

Várias hipóteses na imunopatogênese da alergia alimentar têm sido registradas na tentativa de esclarecer o desenvolvimento preferencial das células Th2 reativas aos alérgenos nos indivíduos atópicos. Dentre os vários mecanismos podemos citar, a mudança nas células Th1 para Th2 (Th1/Th2) na presença de IL-4, a disfunção nas células regulatórias (Tr), a falta de tolerância oral, o aumento da carga antigênica, a presença de hormônios (por exemplo: a progesterona e o calcitriol), alterações genéticas (SAMPSON, 1999; PICCINNI et al., 2000) e presença de receptores CD30 (PICCINNI et al., 1995).

Os linfócitos T são subgrupados de acordo com as citocinas que liberam. Os linfócitos do tipo Th1 expressam principalmente IL-12 e INF- γ , enquanto Th2 expressam principalmente IL-4, IL-5, IL-13. A função principal da IL-4 é a promoção da síntese de IgE pelas células B, e a diferenciação dos linfócitos Th *naïve* (Th0) para Th2, ambos os efeitos podem ser antagonizados pela INF- γ . A mudança de células Th1 para Th2 pode justificar o desenvolvimento e exacerbação dos sintomas da alergia alimentar. Além disso, as células Tr podem expressar fatores imunossupressores como TGF- β e IL-10 (FARIA & WEINER, 2005). Nas doenças atópicas, as células Tr podem falhar na regulação das respostas imunológicas aos alimentos inertes, e desta forma, serem parcialmente responsáveis pela falta de tolerância oral (KONDĚLKOVÁ et al., 2010). Clones de células T obtidos do sangue do cordão umbilical de recém-nascidos de pais atópicos produzem mais IL-4 do que recém-nascidos de pais não atópicos, mostrando que existe uma alteração genética nestes indivíduos atópicos (PICCINNI et al., 1996). Ademais, estudos têm mostrado que se o TGI está sensibilizado ao antígeno, este pode cruzar o epitélio rapidamente, dentro de minutos da exposição luminal. Este aumento da carga antigênica implica na função de barreira epitelial comprometida, e em indivíduos atópicos o influxo de antígenos intactos no TGI está elevado (YU et al., 2001).

Há vários modelos experimentais que podem mimetizar doenças, como a alergia, e contribuir para o entendimento dos mecanismos que as envolvem. Esses modelos

podem, também, servir para testes de possíveis terapias farmacológicas. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo de alergia alimentar crônica no qual a resposta imune do tipo Th2 é induzida para um determinado antígeno presente na dieta. Neste modelo, camundongos recebem a injeção do antígeno (ovalbumina) associado a um adjuvante, hidróxido de alumínio, que estimula a resposta do tipo Th2. Após a sensibilização, os animais têm como única opção líquida uma solução contendo o mesmo antígeno. Esse desafio oral leva a vários sinais clássicos do processo alérgico, como: produção de IgE, aumento da permeabilidade vascular, infiltrado de eosinófilos na mucosa intestinal, hiperplasia de mastócitos e aumento da produção de muco (SALDANHA et al., 2004). No presente estudo foi avaliado o potencial de duas espécies de inhame, *D. opposita* e *D. trifida*, no tratamento da alergia alimentar por meio deste modelo. O objetivo final é contribuir no desenvolvimento de um produto nutracêutico, que possa ser útil no tratamento da alergia alimentar.

2.3. Potencial dos produtos naturais no tratamento das alergias alimentares

As alergias alimentares representam hoje um grave problema de saúde pública que acomete grande parcela da população mundial (NOWAK-WEGRZYN, 2007). De fato, apesar de atualmente existirem muitas substâncias disponíveis, como por exemplo os agentes anti-histamínicos e antialérgicos, elas apresentam efeitos colaterais e reações adversas indesejáveis como sonolência, dor de cabeça, distúrbio do trato gastrointestinal, fadiga e xerostomia. Recentemente, tem sido mostrado que certos alimentos têm a função de defesa relacionada ao sistema imune (CHOI et al., 2004), que precisa de suprimento constante de nutrientes ou fitoquímicos através da dieta para sua sobrevivência e funcionalidade. Durante uma resposta inflamatória contra organismos estranhos ocorre a chamada supressão imune. A terapia pela dieta ou o suprimento de componentes ativos pela dieta é essencial para o restabelecimento desta supressão (RASHIDA et al., 2009). Assim, o descobrimento de produtos naturais ativos pode representar um importante avanço no tratamento da doença, pois são ricos em componentes bioativos e imuno-moduladores que contribuem para a saúde humana (TEWTRAKUL & ITHARAT, 2006).

No mundo industrializado, o conceito de nutrição tem mudado significativamente. Da antiga ênfase da necessidade para sobrevivência, passando pela satisfação da fome, e mais recentemente da ênfase na segurança alimentar. Atualmente, a Ciência de Alimentos objetiva desenvolver alimentos que promovam o bem-estar e a saúde enquanto ao mesmo tempo reduzam o risco de algumas doenças importantes. Isto está baseado no fato de que as evidências científicas confirmam a hipótese de que ambos os componentes nutricionais e não-nutricionais têm o potencial de modular funções alvo no corpo que são relevantes para o bem-estar e saúde e/ou prevenir e até tratar as doenças (ROBERFROID, 1999; ROBERFROID, 2002). Os alimentos com estas características são conhecidos por alimentos funcionais, nutracêuticos, alimento-medicamento, alimentos planejados, alimentos saudáveis, alimentos protetores, alimentos farmacêuticos, entre outros (WRICK, 1993; HUNT, 1994; BYRNE, 1994; REILLY, 1994; DE FELICE, 1995; ARAI, 1996; HASLER, 1998). E embora estes tenham sido considerados sinônimos, eles não o são.

Alimentos funcionais são todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação cotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, graças à presença de ingredientes fisiologicamente saudáveis (CANDIDO & CAMPOS, 2005). Eles devem estar na forma de alimento comum, sendo consumidos como parte da dieta e produzir benefícios específicos à saúde. Eles reduzem os riscos de doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e coronariopatias; e promovem a manutenção do bem-estar físico e mental (SOUZA, et al., 2003). O termo alimento funcional é definido pela Secretaria de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde, pela resolução nº 18/1999, como sendo "aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutritivas básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produza efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica" (BRASIL, 1999). É importante salientar para o fato de que tais substâncias, fisiologicamente ativas, devem estar presentes nos alimentos funcionais, em quantidades suficientes e adequadas, para produzir o efeito fisiológico desejado. Em outras palavras, não é suficiente que um determinado alimento contenha determinadas substâncias com propriedades funcionais fisiológicas, para que ele seja imediatamente classificado como funcional.

Os nutracêuticos são alimentos ou parte de alimentos processados, que apresentam benefícios à saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças. Podem

abranjer dessa definição os nutrientes isolados, suplementos dietéticos até alimentos projetados, produtos fitoterápicos e outros produtos como cereais, sopas e bebidas. Sua ação varia do suprimento de minerais e vitaminas essenciais até a proteção contra várias doenças infecciosas (KWAK & JUKES, 2001a; HUNGENHOLTZ & SMID, 2002). Os nutracêuticos são definidos pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) como sendo “um alimento que é formulado para ser administrado inteiramente sob a supervisão de um médico, e que é utilizado para o controle de uma doença ou condição para os quais possui requerimentos nutricionais distintos, baseado em princípios científicos reconhecidos” (KWAK & JULES, 2001b).

A contribuição das substâncias naturais no desenvolvimento de novos produtos cosméticos, farmacêuticos e nutracêuticos é inquestionável. Calcula-se, por exemplo, que somente nos últimos 25 anos, cerca de 80% dos agentes anticancerígenos testados e aprovados foram derivados de produtos naturais (NOGUEIRA et al., 2010). A despeito deste fato, estima-se que das cerca de 300 mil espécies de plantas no mundo, apenas 15% delas tenham sido submetidas a algum estudo científico para avaliar suas potencialidades farmacológicas. O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do planeta, não só devido à Região Amazônica, mas também à Floresta Atlântica e ao Cerrado, que são considerados *hotspots* de biodiversidade (GOTTLIEB et al., 1996; CONSERVATION INTERNATIONAL, 2010). Além destes, os biomas Caatinga e Pantanal abrangem quase 15% do território brasileiro e contém também vasta diversidade biológica. Diferentes ecossistemas produzem uma variedade enorme de substâncias com estruturas químicas diferentes, que podem ser úteis para diversos fins, como medicamentos e nutracêuticos (PINTO et al., 2002).

A avaliação do potencial de produtos naturais usados tradicionalmente no tratamento de alergias alimentares é uma das linhas desenvolvidas pelo nosso grupo e nessa pesquisa foram estudadas duas espécies de inhames.

2.4. *Dioscorea* spp. (INHAMES)

“Inhame” é o nome popular atribuído a várias espécies do gênero *Dioscorea* spp., da família Dioscoreaceae. No Brasil, essas plantas são popularmente conhecidas como ‘cará’, ‘caratinga’, ‘inhame’, ‘caranambú’ entre outros nomes populares (CORREA,

1931). A diferença de nomes populares varia de local para local, de região para região, e de um país para o outro, e isto, infelizmente, vem causando grande confusão a qual se estendeu, tanto para informações técnicas, quanto informações estatísticas (SANTOS, 1996; PEDRALLI, 2002a; PEDRALLI, 2002b). Esta confusão dos nomes pode ser observada pela reportagem veiculada no Jornal *O Estado de Minas*, de 16 de agosto de 2009. Na capa encontra-se uma manchete intitulada “Os Milagres do Inhame” alegando os benefícios do consumo deste alimento (*Dioscorea* sp.). Mas o texto da reportagem foi ilustrado equivocadamente com a foto da *Colocasia esculenta*, (Araceae, ‘cará’ ou ‘taro’) (Figura 3).



Figura 3 – Ilustração equivocada com a foto de *Colocasia esculenta*.

O *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI) definiu os descritores para as espécies de *Dioscorea* no ano de 1999 e o nome adotado por este grupo foi “yam” ou ‘inhame’. Sendo assim, PEDRALLI (2002b) em seu trabalho, apresenta a proposta de padronização da nomenclatura do inhame. Esta proposta foi aprovada no I Simpósio Nacional de Culturas do Inhame do Cará ocorrido em 2001, em que ficou estabelecido que os órgãos governamentais, universidades, e outras entidades devem divulgar a nova denominação de inhame para as espécies de *Dioscorea* sp. (CEREDA, 2002).

Os inhames são monocotiledôneas, geralmente trepadeiras herbáceas que podem atingir até 5 metros de altura, formando um emaranhado sobre outras plantas e parreiras (PEDRALLI, 2002a; SAUTOUR et al., 2007). Seu caule aéreo volúvel pode ou não apresentar espinhos; as folhas apresentam heterofilia (são estreitas na forma de

faca), com flores brancas, amarelo ou verde-claras. São munidas de tubérculos subterrâneos de tamanho e forma extremamente variáveis, solitários, lobulados ou fasciculados, dos quais partem e se desenvolvem para a direita (dextrosos) ou para a esquerda (sinistros) um ou mais caules, cilíndricos ou quase quadrangulares, alados ou não, com ou sem bulbos aéreos na axila das folhas. A propagação é feita por tubérculos, bulbos e sementes (CORREA, 1931; MONTALDO 1991; SEAGRI, 2001).

O gênero *Dioscorea spp.* possui mais de 600 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e temperadas da Ásia, África e América, sendo que mais da metade das espécies ocorrem nas Américas (AL-SHEHBAZ & SHUBERT, 1989; LACAILLE-DUBOIS, 2005). O inhame é um alimento tradicional nas regiões oeste da África, sudeste da Ásia, Caribe (AKORUDA, 1984). Apesar de serem bastante consumidos nas Américas eles nunca alcançaram uma posição importante como alimento tradicional, como o ocupado pela mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz.), batata doce (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) e taro (*Colocasia spp.*) (ONWUEME, 1978; AMIRATO, 1984). Entretanto há relatos de um consumo notável de inhame no século XVI (CASCUDO, 1983):

“Cardápio dos tupiniquins constava notadamente de inhames. Diziam que em cada casa se acolhiam 30 a 40 pessoas, e que assim os achavam; e que lhes davam de comer de aquela vianda que eles tinham, a saber, muito inhame...que aqui há muito.”

(Pero Vaz de Caminha, escrivão d’Armada, primeiro cronista do Brasil.)

Este tubérculo foi citado por SAINT-HILAIRE em 1830, em sua passagem pelo estado de Minas Gerais no século XIX.

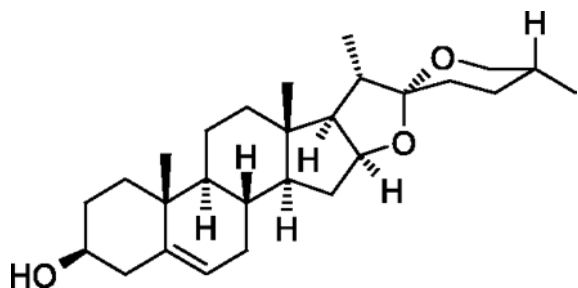
*“Se, porém, uma parte dos brasileiros não pode esperar poder cultivar nossos legumes, esse povo encontra substitutos em suas numerosas raízes comestíveis, as batatas, os aipins (*Manihot yapi*, P.), os carás e as caracatingas (*Dioscorea*), os inhames (*Arum esculentus*), os dois manganitos aráceas, etc. Farei notar, de passagem que, entre nós, produzem raízes alimentícias; e, enquanto na Europa não existe uma espécie de raiz comestíveis pertencente à classe das monocotiledôneas, é, pelo contrário a esse grupo que pertence à maioria das raízes alimentícias dos brasileiros.”*

(Saint-Hilaire, Auguste. In: “Viagem pelas Províncias do Rio de Janeiro e Minas Gerais”)

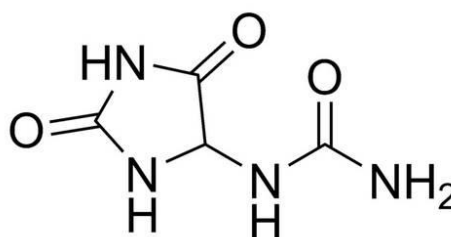
Embora o número de espécies de Dioscoreaceae conhecidas seja elevado, apenas cinco são oficialmente consideradas importantes na alimentação humana: *D. cayenensis*, *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. esculenta* e *D. trifida*. Destas, apenas *D. trifida*, é nativa das Américas, sendo todas as demais espécies de origem africana e asiática (MONTALDO, 1991). Atualmente, outras espécies são também comercializadas e usadas na dieta dos brasileiros, grande parte delas de origem exótica. Dentre as espécies nativas mais consumidas no Brasil estão *D. trifida*, *D. altíssima*, *D. dodecaneura*, *D. cinnamomifolia*, *D. laxiflora*, *D. piperifolia*, *D. spicata* e *D. subhastata* (PEDRALLI, 1998).

A maior produção de inhame no Brasil ocorre no Nordeste, especialmente nos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Piauí, seguidos de outros de menor importância. Os agricultores cultivam basicamente a espécie *D. cayenensis*, conhecida vulgarmente como ‘roxo da costa’, embora sejam utilizados também alguns clones de *D. alata*, como o ‘cará São Tomé’ e o inhame ‘corneta’. Vale ressaltar que ocorre em menor escala o cultivo do inhame ‘mimoso’ ou ‘inhambu’ (*D. trifida*) e do ‘inhame fígado’ (*D. bulbifera*) (CARVALHO & CARVALHO, 1999).

O tubérculo de várias espécies de inhame é comestível e integra a dieta humana há séculos. Ele contém muitos nutrientes como carboidratos, aminoácidos essenciais, minerais, apreciáveis teores de tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B5), além de vitamina A e ácido ascórbico (vitamina C). Encontram-se presentes também uma variedade de metabólitos secundários bioativos que são importantes por apresentarem efeitos farmacológicos. Dentre eles a diosgenina (1), a alantoína (2) e a dioscorina (HATA et al., 2003; YANG et al., 2003) que apresentam atividades antiinflamatórias e imunomoduladoras distintas (MACPHERSON & UHR, 2004; LIN, 2006; LIN & YANG, 2008; HUANG et. al., 2010).



(1)



(2)

O inhame tem ganhado popularidade como nutracêutico, e tanto na China, Coreia, Japão como no Taiwan são amplamente utilizados (LIU et al., 1995; JIN et al., 2010). Na tradição oriental o inhame é utilizado pelas populações asiáticas como tônico pois se acredita que ele seja capaz de aumentar a imunidade. Apesar do seu uso secular, poucos estudos foram realizados até o momento com o objetivo de avaliar seus benefícios (JAN et al., 2007).

Na medicina tradicional da Tailândia a espécie *D. membranacea* é utilizada para tratamento de câncer. Estudos *in vitro* indicaram que alguns extratos aquosos foram ativos especificamente contra o carcinoma mamário, apresentando atividade citotóxica (SAUTOIR et al., 2007). Outro estudo realizado, utilizando esta mesma espécie, apresentou atividade inibidora *in vitro* da produção de óxido nítrico, um importante mediador inflamatório (TEWTRAKUL & ITHARAT, 2007). Os pesquisadores mostraram também atividade antialérgica *in vitro* desta espécie, a partir da diminuição da produção de IL-4 (TEWTRAKUL & ITHARAT, 2006). Já na Coreia os inhames são utilizados para tratar distúrbios dos pulmões, fígado e TGI (JEON et al., 2006; JIN et al., 2010). JEON et al. confirmaram os efeitos benéficos *in vivo* ao TGI em um modelo animal (2006).

A diosgenina apresentou efeito benéfico no tratamento da alergia alimentar em camundongos. Ela aumentou a expressão de t-box (T-bet), que é um fator de transcrição relacionado ao desenvolvimento do fenótipo de célula Th1, mas não aumentou a expressão de GATA-binding protein 3 (GATA-3), que está relacionado ao desenvolvimento do fenótipo de célula Th2 (JAN et al., 2007). Outros estudos demonstraram que ela é capaz de atenuar a produção de IgE, inibir a produção de IL-4 e aumentar a produção de IFN- γ (HUANG et al., 2009; 2010).

A dioscorina, proteína de reserva dos tubérculos de inhame, apresentou também atividade imunomodulatória *in vitro* (LIU et al., 2007) e, posteriormente, *in vivo* a partir da ativação de macrófagos, células NK e aumento da produção de IFN- γ (LIU et al., 2009).

É conhecida a presença de alantoína em várias espécies de Dioscoreaceae. Em estudos *in vivo* foram demonstrados a atenuação da produção de IgE, IL-4 e IL-5 (LEE

et al., 2010), ação antiinflamatória e cicatrizante (OLAYEMI & AJAIYEOBA, 2007) da alantoína por via oral.

Estudos com a espécie *D. batatas* (sin. *D. opposita*) apresentaram atividade antioxidante (HOU et al., 2001; YANG et al., 2009) e imunoestimulante pela ativação de macrófagos; Ela também aumentou a atividade citotóxica de linfócitos e a produção de IFN- γ (CHOI et al., 2004). Por outro lado houve inibição de cicloxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase (NOS) (YANG et al., 2009; JIN et al., 2010). Outro estudo *in vitro* com *D. batatas* (sin. *D. opposita*), apresentou inibição da produção de IL-4 e IL-10, aumento da produção de IFN- γ com diminuição da resposta Th2, aumentando a resposta Th1 (OH & LIM, 2009).

Em estudo recente D'AURIOL-SOUZA et al. (2007; 2008) demonstraram o potencial do óleo de copaíba (*Copaifera guyanensis*) no tratamento da alergia alimentar induzida por ovalbumina em camundongos BALB/c. Neste estudo foi avaliado o potencial de duas espécies de Dioscoreaceae, *Dioscorea opposita* e *Dioscorea trifida* no tratamento da alergia alimentar induzida com ovalbumina em camundongos BALB/c.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Equipamentos

- Aparelho de GPS (Etrex)
- Balança analítica (Shimadzu, AY220)
- Banho Maria (Fisatom, 550)
- Bomba de vácuo (Tecnal, TE0581)
- Centrífuga refrigerada (Hermle, Z323K)
- Cromatógrafo composto de bomba quaternária, injetor automático e detector de UV-DAD (Agilent, 1100)
- Destilador (Quimis)
- Estufa para secagem de plantas (Sociedade Fabbe)
- Fatiador de legumes (Lucre, JR)
- Freezer (Electrolux, FE26)
- Homogeneizador (Omni Internacional, TH)
- Leitor de ELISA (Bio-tek Instruments, EL800)
- Microcâmera (JVC, TK-1270/RGB)
- Microscópio (Olympus, B201)
- Moinho de facas (Tecnal, TE-625)
- Rotavapor (Fisatom, 802)
- Sistema de purificação de água (MILLI-Q, Plus)
- Vórtex (Phoenix, AP56)

3.1.2. Reagentes e solventes

Os solventes utilizados eram de grau analítico, exceto o usado na CLAE, que era de grau cromatográfico (acetonitrila).

- Acetonitrila (Merck)
- Ácido sulfúrico (Synth)
- Adjuvante Hidróxido de Alumínio (Teuto)
- Água oxigenada (Synth)
- Alantoína (Aldrich®)
- Álcool etílico (Synth)
- Amido de Milho (Maisena)
- Anticorpo de rato anti-IgE de camundongo (*Rat anti-mouse IgE*) (Southern Biotechnology Associates®)
- Anticorpo IgE anti-ovalbumina (Southern Biotechnology Associates®)
- Bitartarato de colina (Vetec)
- Brometo de hexadeciltrimetilamônio (Aldrich®)
- Caseína (Vetec)
- Celulose (Vetec)
- Cloreto de Sódio (Vetec)
- Cloridrato de Xilazina (Syntec)
- Dexametasona (Achè)
- Diclorometano (Synth)
- Diosgenina (Aldrich)
- di-terc-butil metil fenol (Vetec)
- Estreptavidina conjugada com a peroxidase (Southern Biotechnology Associates®)
- Ivermectina (Bayer®)
- Metionina (Vetec)
- Mistura de minerais (Rhoster)
- Mistura de vitaminas (Rhoster)
- N-butanol (Synth)
- Nitrogênio líquido (White Martins)

- o-fenilenodiamina (Sigma Chemical Co)
- Óleo de soja (Lisa)
- Ovalbumina biotinizada (albumina da clara de ovo) Sigma
- Ovalbumina liofilizada (Saltos)
- Parafina histológica (Synth)
- Quetamina (Vetaset)
- Sacarose (União)
- Tween 20 (Sigma Chemical Co)

3.1.3. Outros materiais

- Alcoômetro (Alla France)
- Coluna para CLAE Lichrospher C₁₈ (250 x 4.6 mm) 5µm (Merck ®)
- Membrana filtrante (Milipore)
- Pipeta automática multicanal e de volume variável (HTL, Multimate)
- Placas de poliestireno (Nunc)

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Obtenção de *D. trifida* e *D. opposita*

Amostras de tubérculos de *Dioscorea trifida* L.f. foram adquiridas na Feira dos Produtores da cidade de Boa Vista, Roraima, em 30 de junho de 2009 (Figura 4). Para referência futura, alguns tubérculos foram cultivados na área da coleção de espécies vivas do Banco de Dados e Amostras de Plantas Aromáticas, Medicinais e Tóxicas (DATAPLAMT), localizado no Museu de História Natural e Jardim Botânico da Universidade Federal de Minas Gerais (MHNJB – UFMG). Os tubérculos são roxos e em forma de grandes dedos.



Figura 4 – Tubérculos de *Dioscorea trifida*.

Amostras de tubérculos de *Dioscorea opposita* Thunb. (Figura 5) foram coletadas na área de conservação do MHNJB – UFMG, Belo Horizonte, em 10 de junho de 2009. As coordenadas do local de coleta são latitude 19°53'38.67", longitude: 43°54'48.38". A planta cresce espontaneamente e é inclusive considerada daninha. Os tubérculos são brancos e muito pilosos.



Figura 5 – Tubérculos de *Dioscorea opposita*.

A identificação taxonômica de ambas as espécies foi feita pela botânica Dra. Juliana de Paula-Souza.

3.2.2. Preparação dos tubérculos para estudo

3.2.2.1. Secagem

Foram obtidos 24,612Kg de *D. opposita* e 4,201Kg de *D. trifida*. As amostras foram lavadas, cortadas em pedaços de aproximadamente 1cm x 1cm e secadas em estufa a 50°C, por 48 horas. As amostras de *D. trifida* foram secadas entre os dias 10 a 15 de julho de 2009 e as amostras de *D. opposita* entre 16 a 20 de julho de 2009. Após secagem, foram obtidos 1,166Kg de *D. trifida* e 3,905Kg de *D. opposita*, correspondendo a 27,77% e 15,87% de rendimento, respectivamente.

3.2.2.2. Moagem e acondicionamento

Após a secagem, os materiais foram pulverizados até a granulometria de 14mesh. As amostras secas e moídas de cada espécie foram armazenadas em frascos de vidro, em temperatura de -1°C, para posterior extração.

3.2.3. Preparação dos extratos e frações

Os pós de cada espécie foram percolados, separadamente, a frio, até exaustão com solução hidroalcoólica a 80% (Figura 6). Os extratos brutos de *D. trifida* (EBT) e *D. opposita* (EBO) foram obtidos a partir da evaporação dos líquidos, a pressão e temperaturas reduzidas (em rotavapor), até resíduo.



Figura 6 – Percolação do pó dos tubérculos de *D. opposita* e *D. trifida*.

Para a obtenção das frações, uma porção de extrato bruto de cada espécie foi separadamente diluída em água destilada, e submetida à partição líquido-líquido em funil de separação. A partição com diclorometano forneceu as frações em diclorometano (FD), sendo FDT para *D. trifida* e FDO para *D. opposita* (FDO). Este procedimento teve como objetivo separar as substâncias apolares, como as sapogeninas.

As frações aquosas resultantes do procedimento anterior foram submetidas à partição com n-butanol saturado com água. Obteve-se assim as frações n-butanol (FB) de *D. trifida* (FBT) e de *D. opposita* (FBO) e as frações aquosas (FA) de *D. trifida* (FAT) e *D. opposita* (FAO). As soluções obtidas das partições foram evaporadas a temperatura máxima de 55°C em rotavapor. Os extratos e frações obtidos foram mantidos refrigerados a -1°C. A Figura 7 representa o protocolo seguido para a preparação dos extratos e frações.

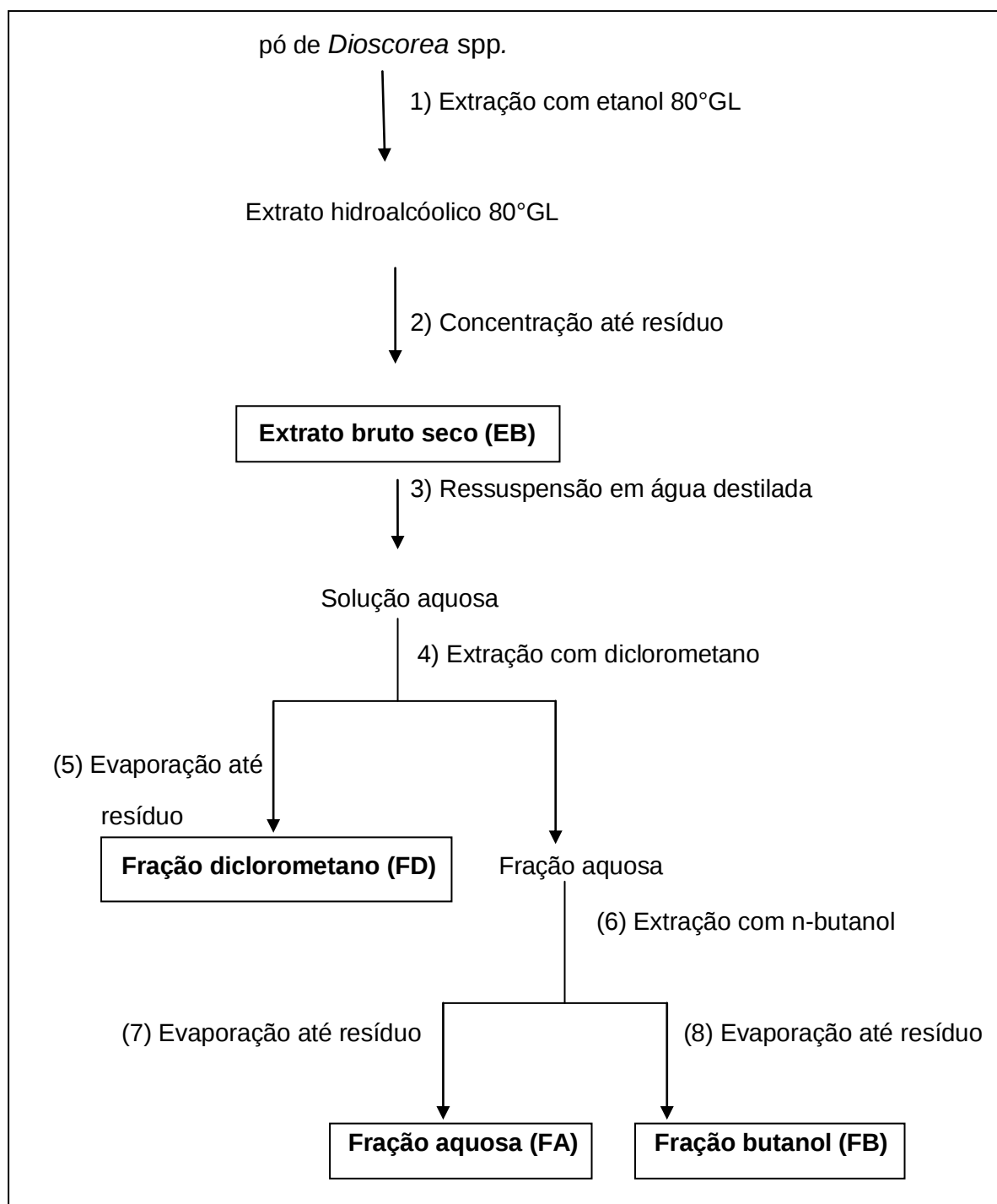


Figura 7 – Obtenção do extrato bruto e frações em diclorometano, butanol e água.

3.3. Determinação do perfil cromatográfico dos extratos e frações por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Os extratos e frações foram analisados, qualitativamente, por CLAE no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, Faculdade de Farmácia/UFMG.

Utilizou-se como fase móvel acetonitrila (A) e água (B), fluxo de 1mL/min e gradiente de eluição: 0 a 45min, 35% a 100% A; 45 a 50min, 100% A. Reequilíbrio: 50 a 55min, 100% a 35% A; 55 a 60min, 35%A. O volume de injeção das amostras foi de 40µL. As amostras foram preparadas em solução acetonitrila/água (1:1), sendo que os extratos brutos e frações na concentração de 6mg/mL e os padrões de referência na concentração de 0.5mg/mL. As substâncias foram identificadas pelo espectro no UV a λ 205nm, como descrito por MABRY et al (1970).

3.4. Ensaios biológicos

3.4.1. Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c jovens (idade aproximada de 6 a 8 semanas), provenientes Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO –ICB/UFMG). Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico, contendo, no máximo, 5 animais/gaiola no Biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAFAR/UFMG) .

Os procedimentos experimentais realizados nessa dissertação de mestrado foram executados de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), e foram aprovados conforme CERTIFICADO Nº 010/2010 (ANEXO II).

3.4.2. Vermifugação

Os animais foram vermifugados com ivermectina, solução a 0,08%, por 7 dias, veiculado na mamadeira de água. Os ensaios biológicos se iniciaram logo depois.

3.4.3. Preparo da ração de caseína e avaliação do peso corporal

Para impedir que o emagrecimento dos animais fosse gerado por uma dieta desbalanceada, as rações de caseína foram preparadas no próprio laboratório, conforme receita padrão para roedores, preconizada pela *American Institute of Nutrition* (AIN), 93G (Tabela 1) (MOREIRA, 2006; REEVES et al., 1993).

As rações foram pesadas diariamente (ração consumida/ não consumida), com o objetivo de avaliar o seu consumo e estabelecer as doses dos tratamentos com os extratos brutos e frações das duas espécies, bem como da dexametasona (controle ativo, DX).

O peso corporal dos animais foi avaliado individualmente, nos dias -1, 7, 14, 21 e 28. A variação do peso (delta de peso) foi calculada a partir da fórmula: {peso final - peso inicial (sensibilização primária)}. Os pesos finais foram os dias 7, 14, 21 e 28.

Tabela 1 – Receita padrão para roedores baseada na AIN-93G

Ingredientes	Nutrientes (em gramas)
Caseína	200,0
Metionina	3,0
Amido de milho	397,5
Sacarose	100,0
Maltodextrina	132,0
Celulose	50,0
Óleo de soja	70,0
BHT	0,014
Mistura de minerais	35,0
Mistura de vitaminas	10,0
Bitartarato de colina	2,5
Água	Qs
Extratos e frações de inhame	De acordo com peso dos animais
Total	1000,0

3.4.4. Sensibilização e desafio alergênico

O modelo de alergia alimentar utilizado neste estudo foi o desenvolvido por SALDANHA et al. (2004). Para indução da alergia (sensibilização primária), os camundongos foram sensibilizados com OVA, na dose de 10µg, adsorvida em hidróxido de alumínio (Al(OH)_3 - 1mg) em salina (0,2 mL), por via subcutânea no dorso (dia 0). O controle recebeu apenas adjuvante (Al(OH)_3). Os animais receberam uma segunda sensibilização (secundária) 14 dias depois (dia 14). Após o sétimo dia da sensibilização secundária, os animais receberam como única fonte hídrica, solução de ovalbumina (OVA). A Figura 8 ilustra o protocolo experimental usados para a indução da alergia.

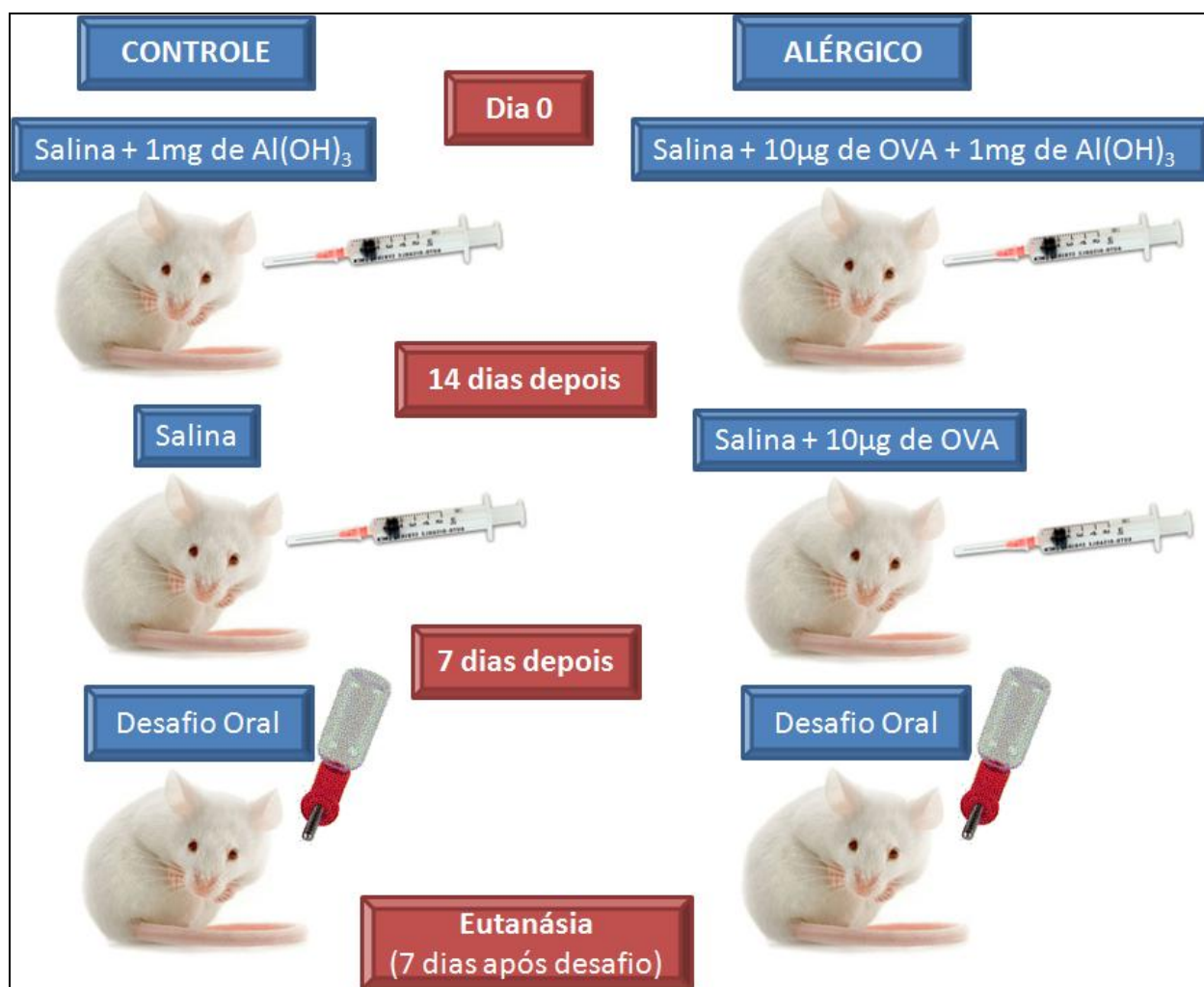


Figura 8 – Protocolo experimental de indução de alergia. Camundongos BALB/c foram sensibilizados (OVA+) com 10µg OVA + 1mg Al(OH)₃ no dia 0 e 10µg OVA no dia 14. O grupo controle (OVA-) recebeu apenas Al(OH)₃ no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária o desafio alérgico foi realizado substituindo-se a mamadeira de todos os grupos, que continha água, por solução de OVA e os tratamentos foram ministrados na ração de caseína, do dia -1 até dia 28 (eutanásia).

3.4.5. Esquema de tratamento

Os tratamentos com EBT EBO foram feitos nas doses de 100 mg/kg/dia e 300 mg/kg/dia. Já as FA, FB e FD das duas espécies foram administrados nas doses de 100 mg/kg/dia. Todos os tratamentos foram incorporados na ração de caseína. A relação de todos os tratamentos realizados e os respectivos grupos de animais estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Protocolo de tratamento

Grupos	Protocolo de Sensibilização	Dieta
1	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada sem suplementação
2	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com EB (100mg/kg/dia)
3	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com EB (300mg/kg/dia)
4	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com FA (100mg/kg/dia)
5	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com FB (100mg/kg/dia)
6	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com FD (100mg/kg/dia)
7	Controle (Não sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com Dexametasona (0,4 mg/kg/dia)
8	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada sem suplementação
9	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com EB (100mg/kg/dia)
10	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com EB (300mg/kg/dia)
11	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com FA (100mg/kg/dia)
12	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com FB (100mg/kg/dia)
13	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com FD (100mg/kg/dia)
14	Alérgico (Sensibilizado)	Ração balanceada suplementada com Dexametasona (0,4 mg/kg/dia)

3.4.6. Desenho Experimental

O desenho experimental com a escala temporal seguido para tratar os animais controles e alérgicos, por 29 dias (dia -1 ao dia 28), com ração de caseína suplementada está demonstrado na Figura 9. As mamadeiras contendo água, de todos os grupos, foram substituídas por solução de OVA na semana do desafio oral. A eutanásia ocorreu no dia 28 após sete dias de desafio alérgênico.

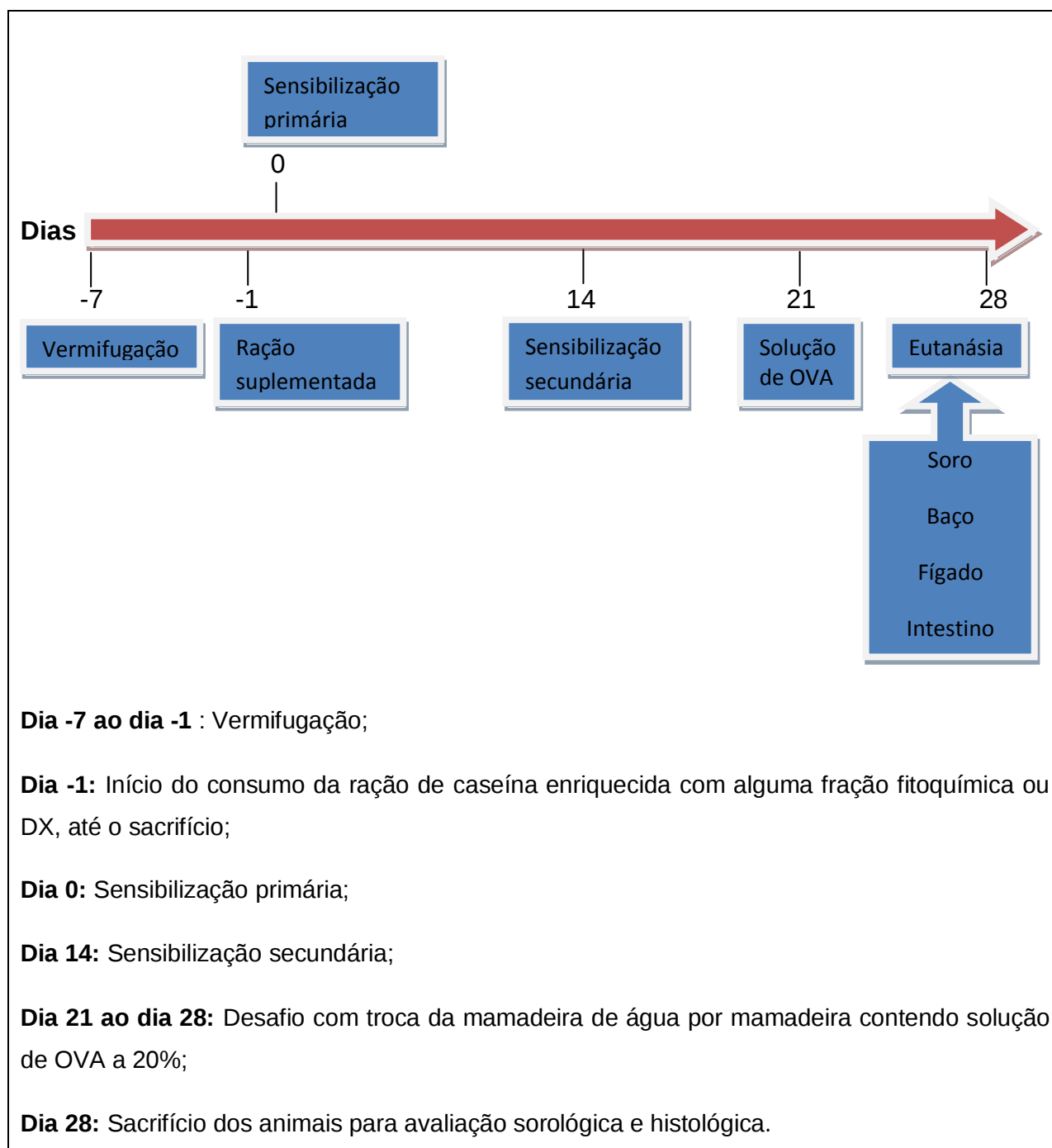


Figura 9 – Escala temporal do desenho experimental

3.4.7. Controle sem tratamento e controle ativo

Para os animais sem tratamento (sensibilizados ou não) foram utilizadas ração de caseína sem suplementação.

Como controle ativo, foi utilizada uma solução de dexametasona fosfato de sódio 4mg/mL, na dose de 0,4 mg/kg/dia, incorporada à ração contendo caseína (TATSUO et al., 1994).

3.4.8. Eutanásia

Após sete dias de consumo restrito e voluntário de solução de ovalbumina a 20%, os animais foram anestesiados com 100 mg/kg de quetamina e 10 mg/kg de xilazina para retirada do sangue e obtenção do soro. Posteriormente, e ainda sob anestesia, sofreram eutanásia através de deslocamento cervical.

Na necropsia, o soro e os órgãos foram retirados e congelados a -20°C (soro e jejuno proximal) ou fixados em formol (jejuno distal, fígado, baço).

3.4.9. Obtenção de soro

Após coagulação, o sangue foi centrifugado (3000 r.p.m.) por 10 minutos. O soro foi então retirado, colocado em tubos individuais e congelado (-20°C) para posterior dosagem sérica de anticorpo IgE- anti-OVA.

3.5. Avaliação morfológica da alergia

3.5.1. Histopatologia

O intestino foi lavado com salina fisiológica para retirada das fezes e então dividido em quatro partes, sendo da parte proximal para a distal, seu tamanho dividido em 20%, 30%, 30% e 20%. Essas porções foram designadas: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, respectivamente. Este procedimento foi adotado por não haver separação macroscópica nítida entre as porções do intestino delgado em camundongos, e foi utilizado o critério baseado em FERRARIS et al. (1992). A alergia alimentar foi avaliada, morfológicamente, pela observação de alterações no segmento de jejuno

distal, que foi retirado e fixado em formol tamponado a 10%, desidratado em soluções decrescentes de alcoóis e incluído em parafina. A partir desses blocos, cortes de 4µm foram obtidos e as lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), Periodic Acid Shiff (P.A.S.) e Azul de toluidina. As técnicas estão descritas no ANEXO I.

3.5.2. Avaliação da presença de muco contendo mucina neutra

Na avaliação da presença de muco intestinal, foi utilizada a coloração de P.A.S. (coloração para mucina neutra). Após a coloração, para a análise do muco, foram capturadas imagens de três campos da porção do intestino delgado a partir de uma microcâmera. As imagens foram analisadas com a utilização do software Image J. Para a determinação do volume das células caliciformes, todos os pixels verdes foram selecionados para a criação de uma imagem binarizada e subsequente cálculo da área total. O resultado foi expresso em µm² P.A.S./campo.

3.5.3. Avaliação do número de mastócitos

Lâminas histológicas coradas pelo azul de toluidina, utilizadas para contagem de mastócitos, foram examinadas em microscópio óptico. A contagem foi realizada observando 20 campos aleatórios em um aumento de 40X (53.333µm²/campo) e o resultado expresso em número de mastócitos/campo.

3.5.4. Avaliação do edema do intestino e do peso do tecido adiposo

A quantificação do edema foi realizada pela técnica de MOORE-OLUFEMI et al. (2005) modificada. Após a eutanásia, um pedaço de 1cm do duodeno foi pesado (peso úmido) e seco em estufa a 56°C, por 24 horas, e novamente pesado (peso seco). Para avaliação da perda de água utilizou-se a fórmula: {(Peso úmido – Peso seco)/ Peso seco}. O tecido adiposo da região periuterina também foi pesado (apenas peso úmido).

3.5.5. Dosagens enzimáticas da atividade de eosinófilos

A peroxidase eosinofílica (EPO) é uma enzima de eosinófilos que reflete indiretamente a quantidade desta célula. A EPO foi dosada no tecido do intestino delgado (jejuno proximal) congelado a -20°C. Este ensaio foi conduzido assim como descrito por STRATH et al. (1985). Foram pesados 100mg do jejuno dos animais e estes foram processados em um homogeneizador de tecidos com 1,9mL de PBS. O material foi centrifugado a 12.000 g (especificamente 10.000 r.p.m. no rotor utilizado) por 10min. O sobrenadante foi descartado e eventuais eritrócitos foram lisados pela adição de 1,5mL de salina 0,2% seguida de 1,5mL de salina 1,6% + glicose 5%. As amostras foram mais uma vez centrifugadas e o sobrenadante descartado. O precipitado (*pellet*) foi ressuspensão em 1,9mL de solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio, HTAB 0.5 % em PBS. As amostras foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido, centrifugadas a 12.000 g a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático, que foi feito da seguinte maneira: 75µL de cada amostra ou somente diluente (branco) foram adicionados a placas de 96 poços juntamente com 75µL da solução do substrato (1,5 mM o-fenilenodiamina, OPD, em tampão tris-HCl 0,075mM, pH 8,0 suplementado com H₂O₂ 6,6mM). Após o desenvolvimento de cor, a reação foi interrompida pela adição de 50µL de H₂SO₄ 1mol/L. A absorbância foi lida a 492nm. Os valores foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.). A dosagem de EPO no intestino dos animais tratados com DX não pode ser realizada.

3.5.6. Avaliação da IgE anti-OVA

Os anticorpos IgE anti-ovalbumina foram dosados por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Placas de poliestireno foram sensibilizadas com anticorpo de rato anti-IgE de camundongo diluído 1:250, na quantidade de 50µL/poço, por no mínimo, 18 horas a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas e bloqueadas (1 hora a temperatura ambiente) com 200µL/poço de PBS/caseína. Foram adicionados 50µL/poço de soro total das amostras de camundongos. Após incubação por 2 horas, as placas foram lavadas com salina-Tween por seis vezes. Foram adicionados 50µL da

OVA-biotinilada (1mg/mL) por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada com salina-Tween e incubada, agora, com a estreptavidina conjugada com a peroxidase em uma diluição de 1:5000 (50µL/poço) por mais 45 minutos. Em seguida, foi realizada a etapa de revelação com ortofenileno-diamino (OPD) mais H₂O₂ em tampão citrato (100µL/poço) e as amostras foram lidas em 492nm em leitor de ELISA. Em todas as placas foram colocados um controle positivo padrão (*pool* de plasma de animais imunes), um controle negativo (*pool* de plasma de animais normais), além de um controle da própria placa (branco). Os resultados foram computados através das densidades ópticas e foram expressos como unidades arbitrárias (UA), sendo atribuído um valor de 1000 unidades ao controle positivo e as amostras comparadas a esse valor.

3.6. Análise estatística

A análise das diferenças na resposta entre grupos relacionados foi feita pela análise de variância (ANOVA). Para comparações pareadas entre grupos foi usado ANOVA de *Tukey*. Nas análises das diferenças na resposta entre grupos relacionados foram feitas utilizando-se teste t de *Student*. O nível de significância foi considerado quando $p < 0.05$. As análises foram realizadas com o auxílio dos softwares de estatística: GraphPad *InStat*® e GraphPad *Prism*®3.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimento das extrações

Nos estudos de plantas medicinais é muito importante conhecer o conteúdo em metabólitos secundários da espécie em questão. Para isso foram preparados extratos brutos (EB) seguido de fracionamento com solventes com o objetivo de quantificar as classes de substâncias presentes nas plantas. Foram obtidas as seguintes quantidades e rendimentos dos extratos brutos (Tabela 3):

Tabela 3 – Rendimento do extrato bruto de *D. trifida* e *D. opposita*

Espécie	Pó da planta (g)	Sigla	Peso obtido(g)	Rendimento(%)
<i>D. trifida</i>	1.166,66	EBT	42,82	3,67%
<i>D. opposita</i>	3.905,45	EBO	126,09	3,23%

Cinco gramas de EBT e EBO foram separados para os ensaios biológicos. O restante foi submetido à partição líquido-líquido e foram obtidas as seguintes quantidades e rendimentos de fração aquosa (FA), butanol (FB), e em diclorometano (FD) (Tabela 4):

Tabela 4 – Rendimento das frações de *D. trifida* e *D. opposita*

Espécie	Partição	Sigla	Peso (g)	Rendimento (%)
<i>D. trifida</i>	Extrato bruto	EBT	37,29	-
	Aquoso	FAT	30,1	79,58%
	Butanol	FBT	4,3	11,34%
	Diclorometano	FDT	2,89	7,64%
<i>D. opposita</i>	Extrato bruto	EBO	120,98	-
	Aquoso	FAO	77,87	64,30%
	Butanol	FBO	12,04	9,94%
	Diclorometano	FDO	31,07	25,65%

Os maiores rendimentos foram observados para as frações aquosas, indicando uma elevada concentração de substâncias polares nos tubérculos de ambas as espécies. As concentrações de FB e FD foram diferentes entre as espécies, tendo a *D. trifida*,

apresentado maior rendimento de substâncias de polaridade intermediária, enquanto *D. opposita* apresentou maior rendimento de substâncias apolares.

4.2. Perfis cromatográficos por CLAE dos padrões de referência

Para definir o perfil cromatográfico dos extratos brutos e frações obtidos das plantas foi realizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.2.1. Perfil cromatográfico do padrão alantoína (Aldrich®)

Na Figura 10 está demonstrado o cromatograma, acompanhado do respectivo espectro no UV (Figura 11), obtido para o padrão de referência alantoína. Esta substância foi estudada porque existem citações na literatura (SAGARA et al., 1989; NIU et al., 2010) que descrevem sua presença em várias espécies de *Dioscorea*, e para qual são atribuídas várias atividades biológicas

O padrão de alantoína apresentou-se como um pico no tR 2.14min. O espectro no UV apresentou um máximo de absorção próximo de 200nm.

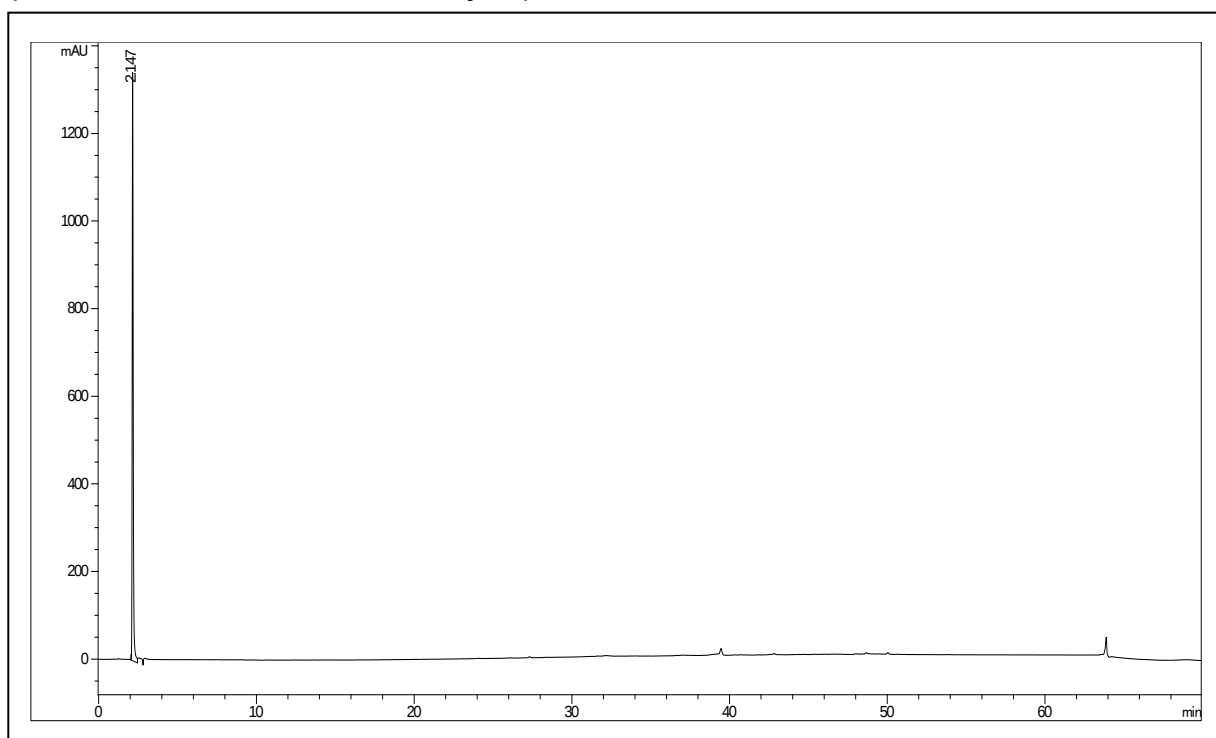


Figura 10 – Cromatograma do padrão de referência alantoína obtido por CLAE-DAD a λ 205nm.

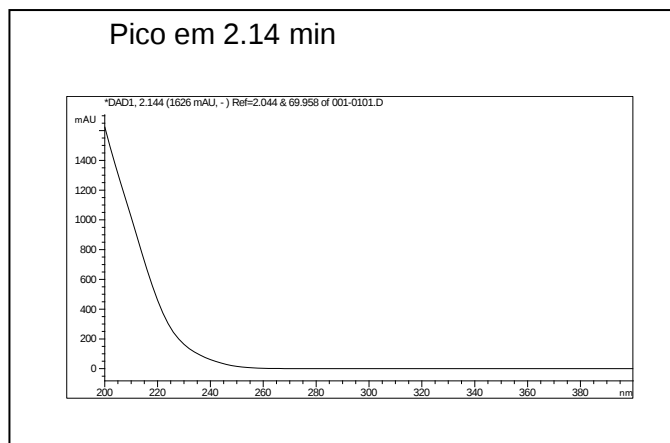


Figura 11 – Espectro no UV do padrão alantoína.

4.2.2. Perfil cromatográfico do padrão diosgenina (Aldrich®)

Na Figura 12 está demonstrado o cromatograma, acompanhado do seu respectivo espectro no UV (Figura 13) do padrão diosgenina, obtido no CLAE-DAD. O cromatograma apresentou um pico em tR 52.80min., acompanhado de outro de menor intensidade em tR 39.54min. O espectro no UV da diosgenina apresentou absorção próxima a 200nm, resultado condizente para substâncias de núcleo esteroidal. O pico observado no tempo de retenção 63,08min., que se repete nas várias análises, foi atribuído ao eluente.

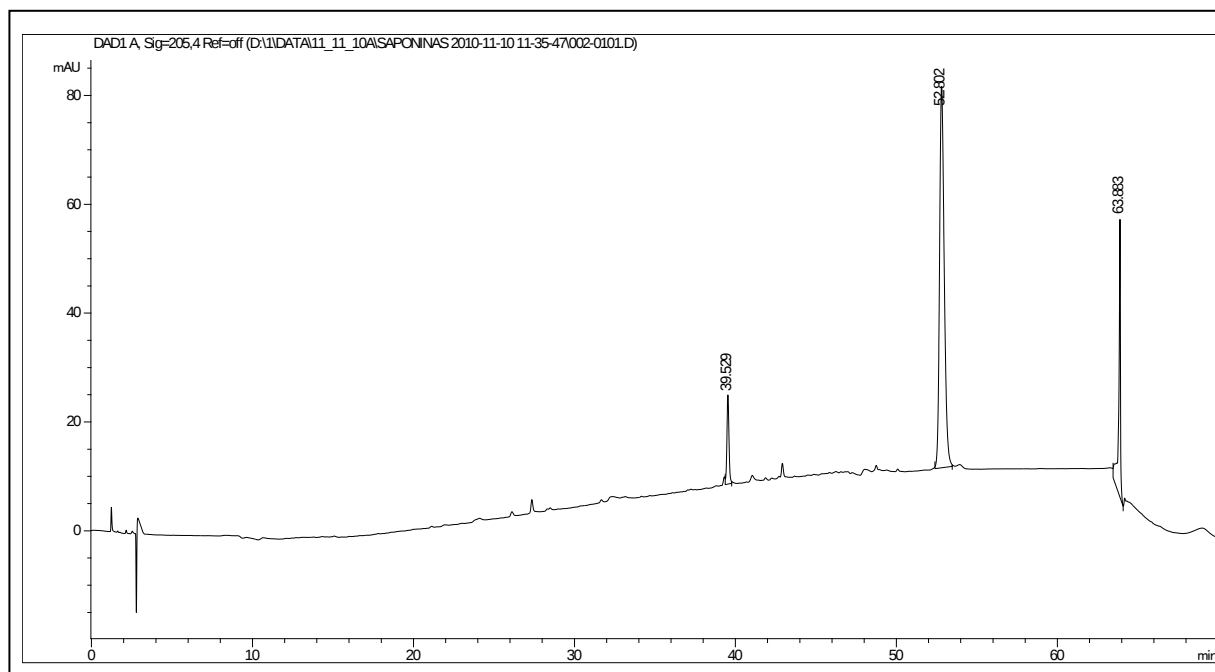


Figura 12 – Cromatograma do padrão de referência diosgenina obtido por CLAE-DAD a λ 205nm.

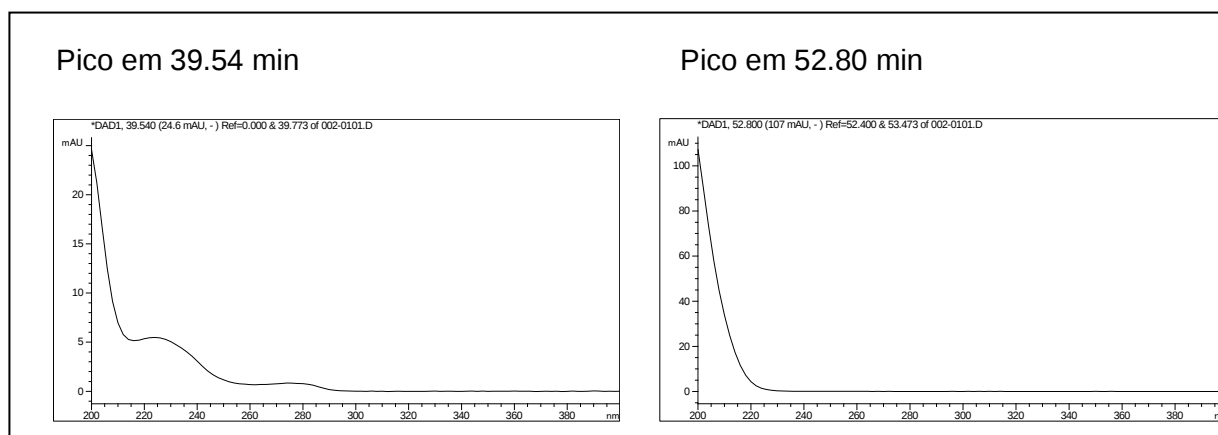


Figura 13 – Espectros no UV do padrão de referência diosgenina.

4.3. Perfis cromatográficos por CLAE dos extratos e frações de *D. trifida* e *D. opposita*

Os cromatogramas de todos os extratos e frações obtidos das plantas apresentaram três regiões bem definidas, correspondendo a classes distintas de substâncias de polaridades diferentes: de 0 a 6 minutos são observados picos para substâncias de elevada polaridade; de 6 a 37 minutos observam-se picos de polaridade intermediária, especialmente substâncias fenólicas; e de 38 a 70 minutos nota-se a presença de substâncias de baixa polaridade, especialmente as sapogeninas.

4.3.1. Perfil cromatográfico do extrato bruto de *D. trifida* (EBT)

Na Figura 14 está demonstrado o cromatograma e na Figura 15 os espectros no UV para o EBT. O cromatograma apresenta nove picos principais, sendo três na região das substâncias de elevada polaridade (tR 1,72, 2,18 e 2,74min.), dois (11,99 e 15,56 min.) na região de polaridade intermediária e quatro na região de baixa polaridade (39,56, 43,54, 45,74 e 51,09min.). Os picos em tR 2,18 e 51,09 apresentaram o mesmo tempo de retenção e espectros no UV observados para os padrões de referência alantóina e diosgenina. É interessante notar a presença da substância no tR 39,56min., também observada acompanhando o padrão de referência de diosgenina. Os

espectros no UV das duas principais substâncias detectadas na região de polaridade intermediária (tR 11,99 e 15,56min.) apresentaram absorção características para flavonóides. Todos os picos detectados na região de baixa polaridade do cromatograma apresentaram absorção no UV somente próximo a 200nm, condizente com a estrutura terpênica das sapogeninas.

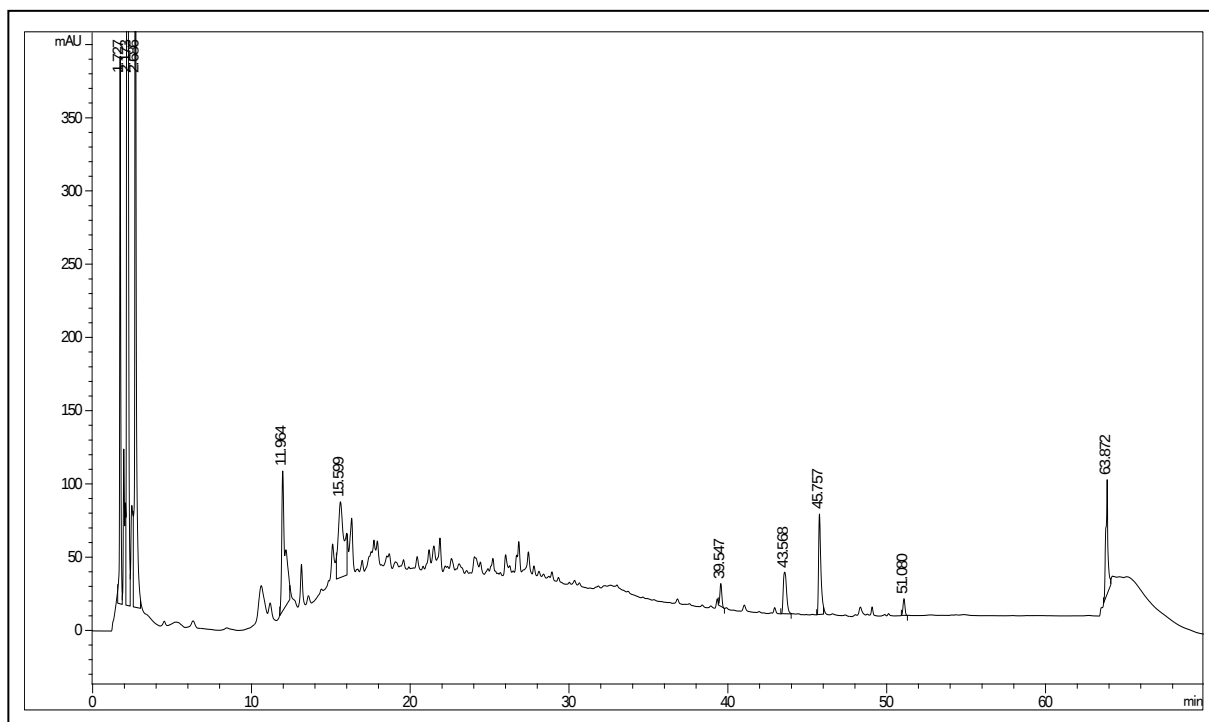
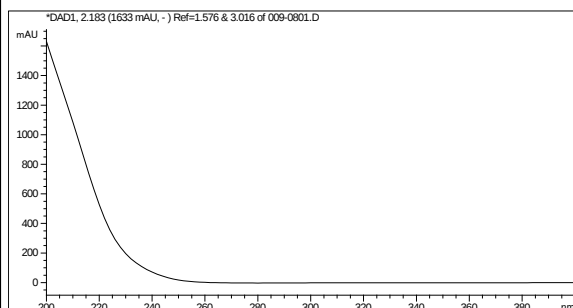
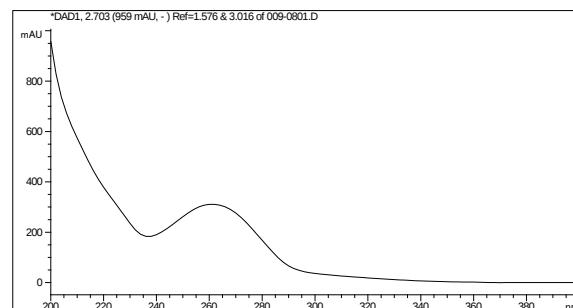


Figura 14 – Cromatograma de EBT obtido por CLAE-DAD a λ 205nm.

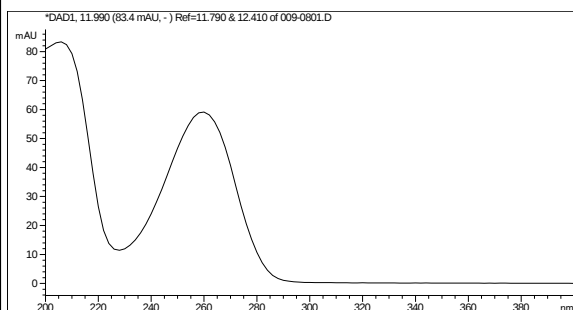
Pico em 2.18 min



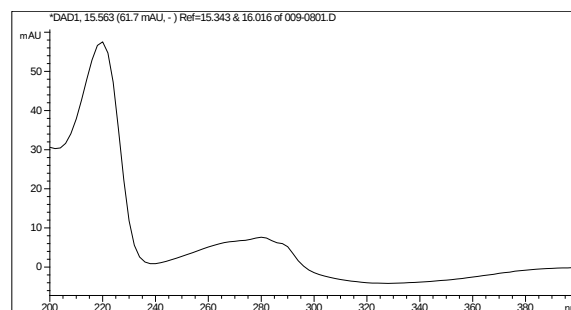
Pico em 2.74 min



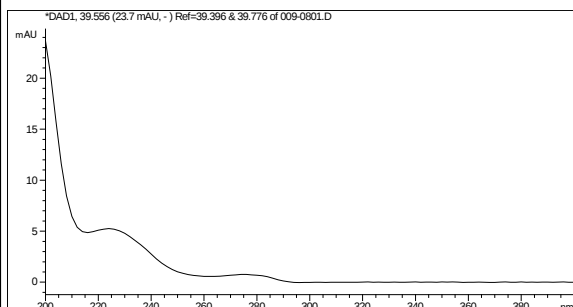
Pico em 11.99 min



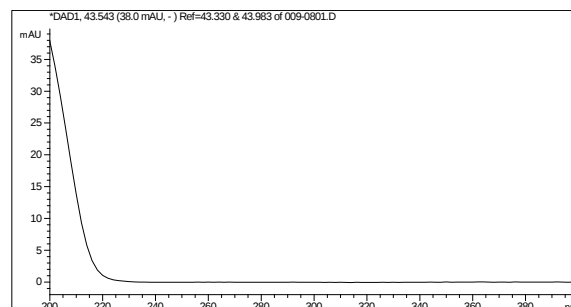
Pico em 15.56 min



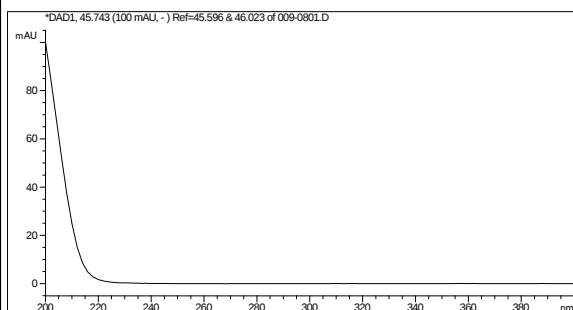
Pico em 39.56 min



Pico em 43.54 min



Pico em 45.74 min



Pico em 51.09 min

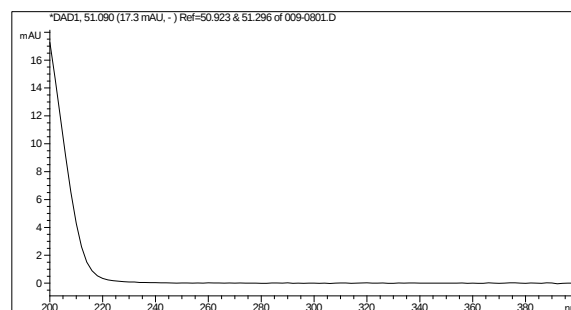


Figura 15 – Espectros no UV de EBT

4.3.2. Perfil cromatográfico da fração aquosa de *D. trifida* (FAT)

O cromatograma e os espectros no UV obtidos para a FAT estão demonstrados nas Figuras 16 e 17. Conforme o esperado foi observado um maior número de picos na região das substâncias de elevada polaridade (1,64 a 2,69min.). A alantoína foi detectada no tR 2,17min. A presença de picos na região de polaridade intermediária (tR 11,17 a 15,67 min.) são devidos, provavelmente, à substâncias que foram carregadas em resíduos de n-butanol, resultante da extração líquido-líquido. Não foi detectado o pico referente à diosgenina, que é uma substância de baixa polaridade.

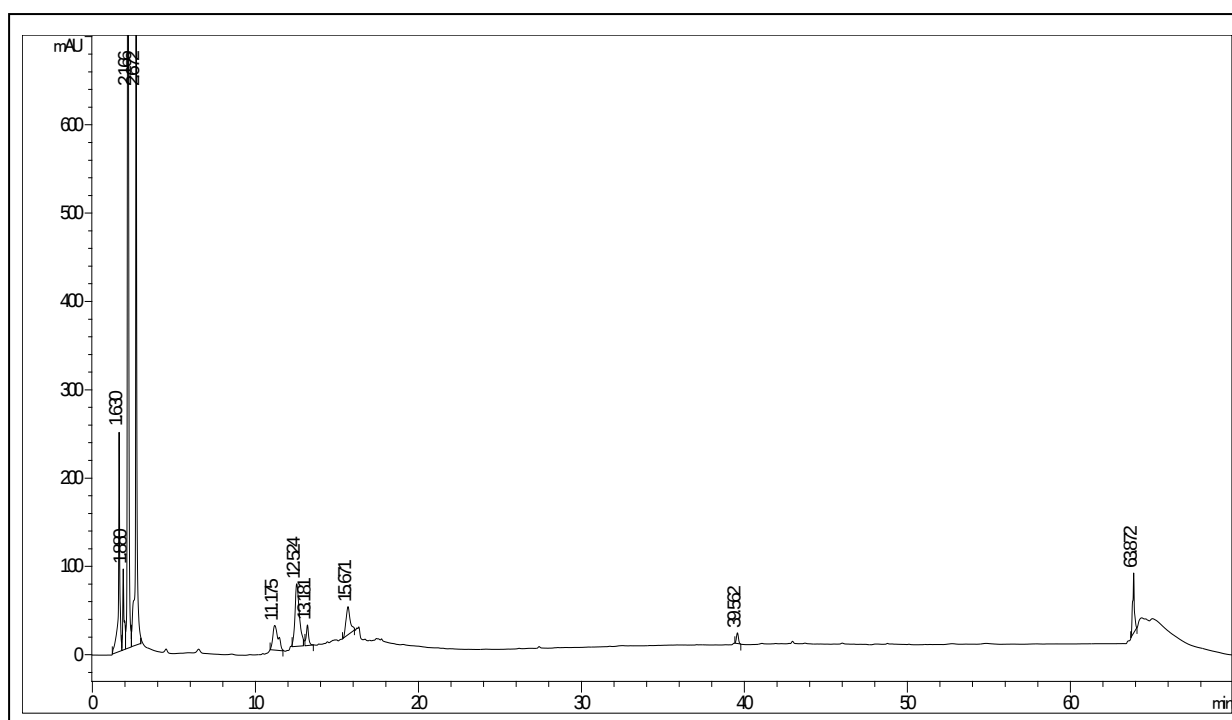


Figura 16 – Cromatograma de FAT obtido por CLAE-DAD a λ 205nm.

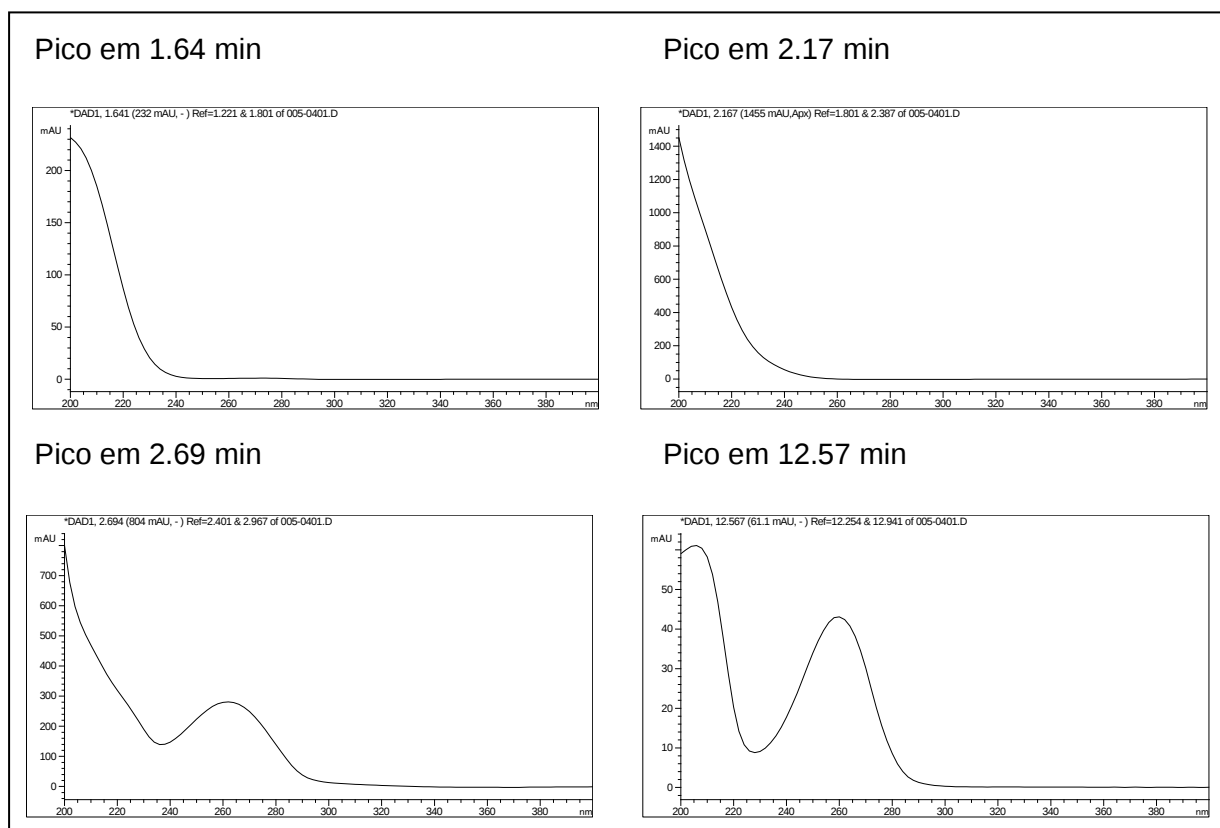


Figura 17 – Espectros no UV de FAT

4.3.3. Perfil cromatográfico da fração butanol de *D. trifida* (FBT)

O cromatograma e os espectros no UV de FBT podem ser observados nas Figuras 18 e 19. Nota-se a presença de vários picos na região das substâncias de polaridade intermediária, todos com absorção no UV condizente para substâncias fenólicas, entre elas chalconas (17,95, 19,54 e 21,53min.) e flavonóides (15,90 e 26,54min.). O aumento observado na concentração dessas substâncias, em relação ao EBT, indica que a partição líquido-líquido foi eficiente, concentrando o grupo de substâncias de acordo com sua polaridade. O pico no t_R 2,18min. pode ser atribuído à presença de alantoína. Não foi observado o pico no t_R referente a diosgenina.

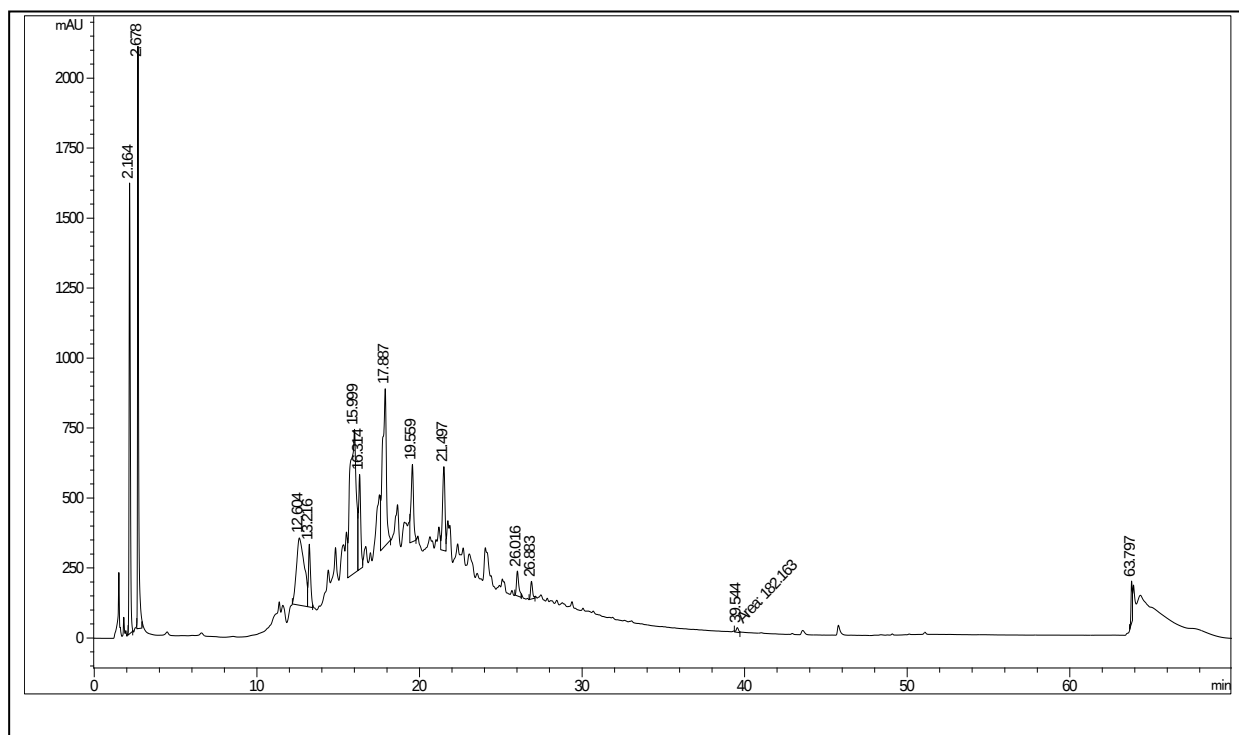
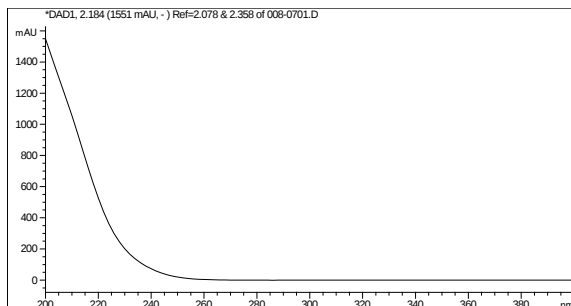
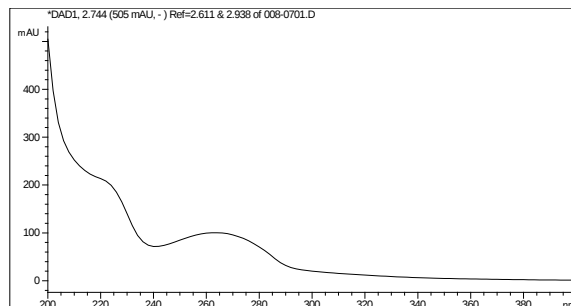


Figura 18 – Cromatograma de FBT obtido por CLAE-DAD a λ 205nm.

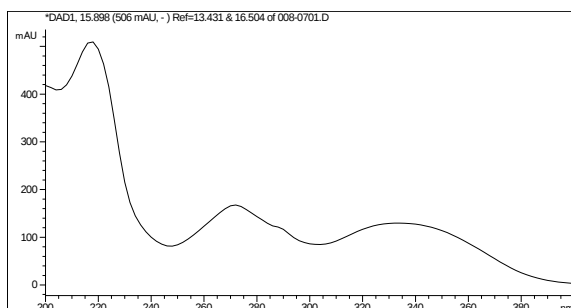
Pico em 2.18 min



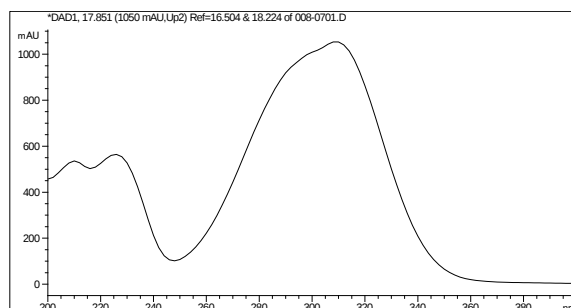
Pico em 2.74 min



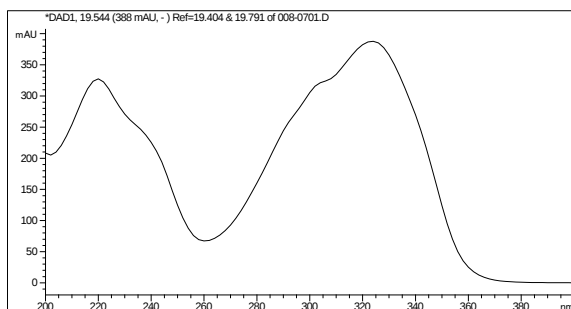
Pico em 15.90 min



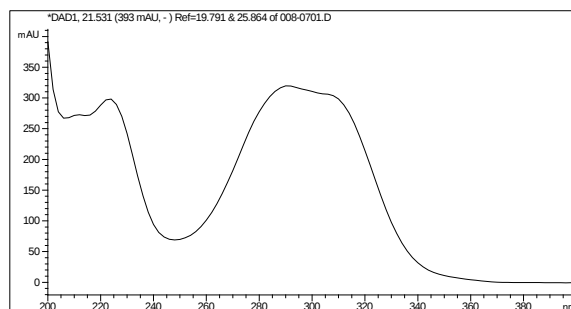
Pico em 17.85 min



Pico em 19.54 min



Pico em 21.53 min



Pico em 26.04 min

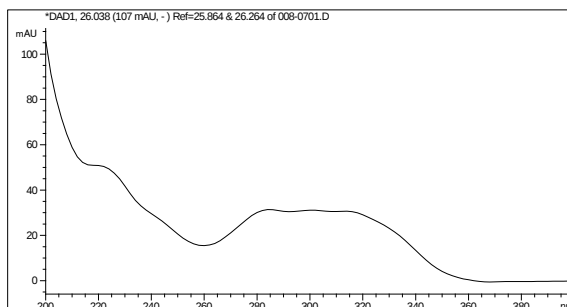


Figura 19 – Espectros no UV de FBT.

4.3.4. Perfil cromatográfico da fração diclorometano de *D. trifida* (FDT)

Na Figura 20 está demonstrado o cromatograma de FDT, acompanhado de seus respectivos espectros no UV (Figuras 21 e 22). Diferente dos cromatogramas anteriores, ele apresentou vários picos, muito bem definidos, na região das substâncias de baixa polaridade (tR 40,98, 43,44, 45,65 e 48,99min.). A diosgenina foi detectada em tR 51,00min. Conforme o esperado, substâncias de elevada polaridade, inclusive a alantoína, não estão presentes. As substâncias fenólicas, presentes em FBT, também foram detectadas nesta fração, mas em menor proporção (tR 18,62, 21,84, 22,65, 24,05, 26,09, 26,85, 27,44, 28,16, 28,96 e 36,81min.).

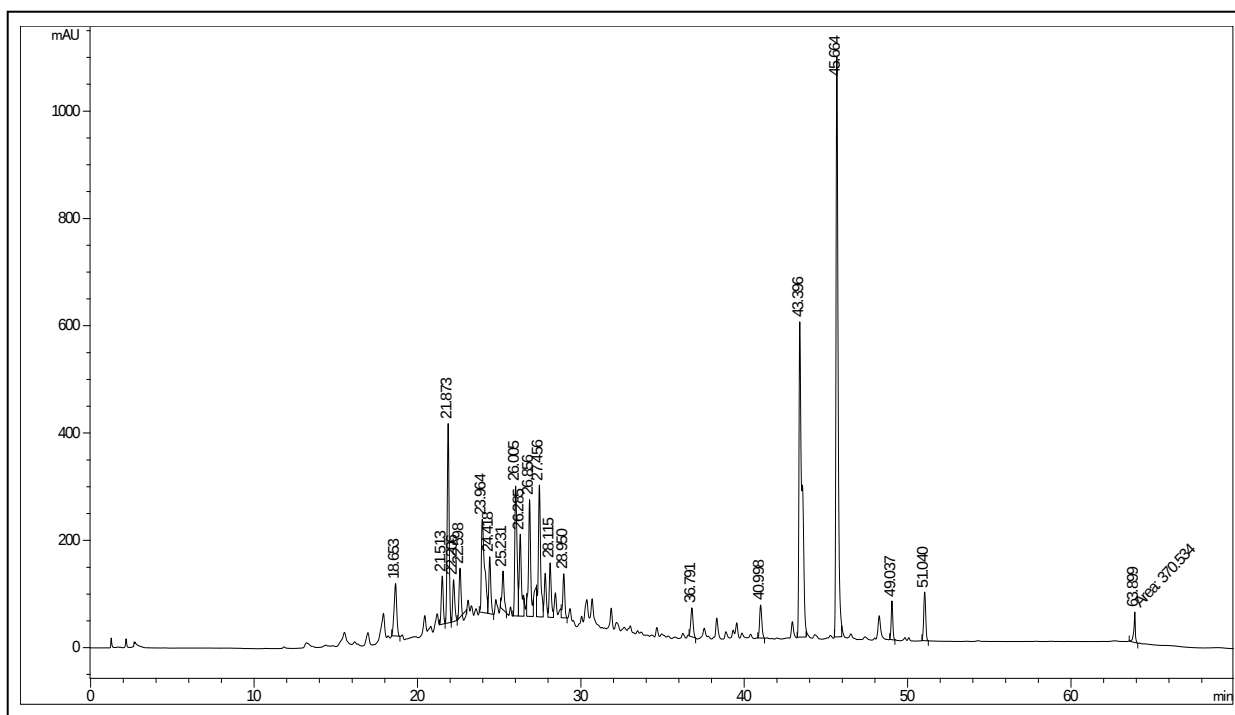
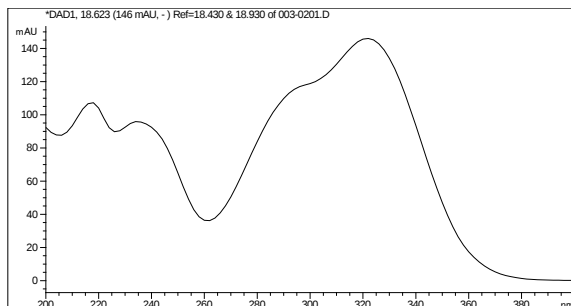
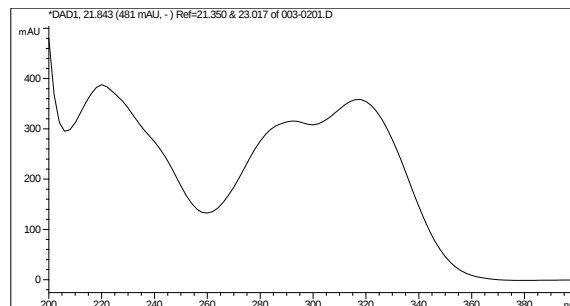


Figura 20 – Cromatograma de FDT obtido por CLAE-DAD a λ 205nm.

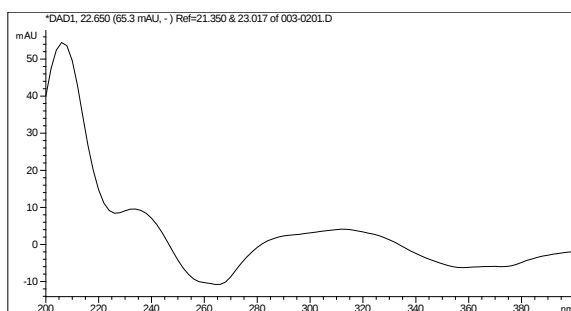
Pico em 18.62 min



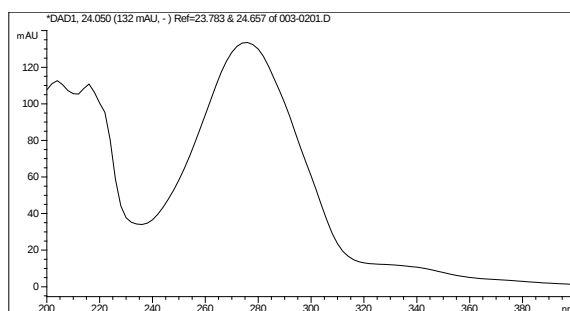
Pico em 21.84 min



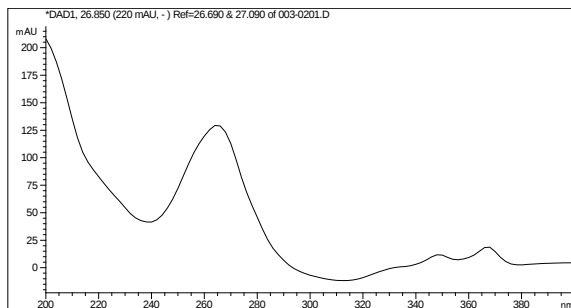
Pico em 22.65 min



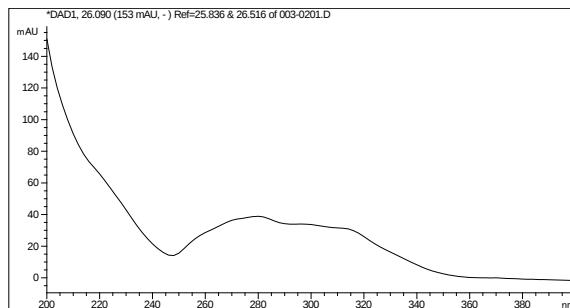
Pico em 24.05 min



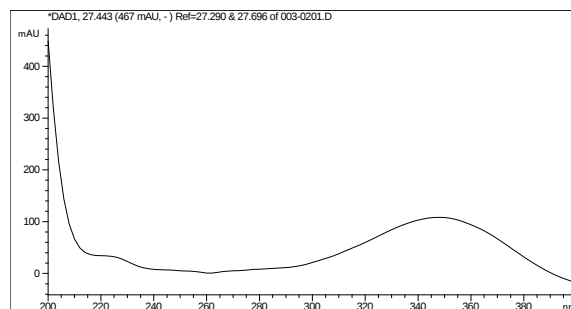
Pico em 26.85 min



Pico em 26.09 min



Pico em 27.44 min



Pico em 28.16 min

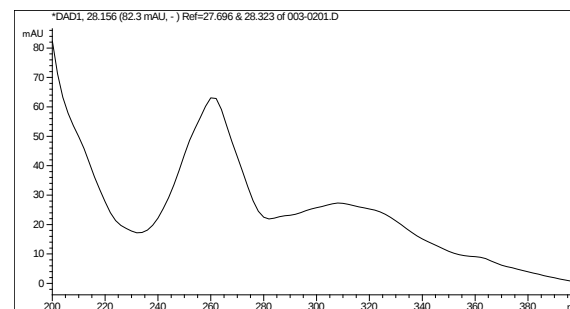
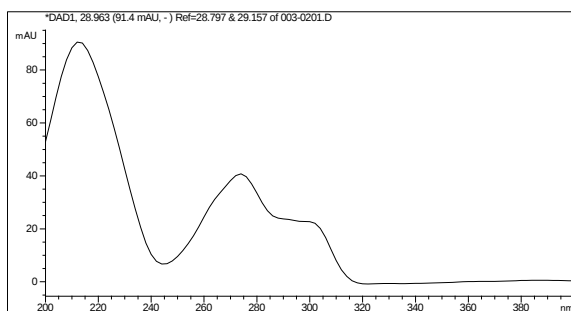
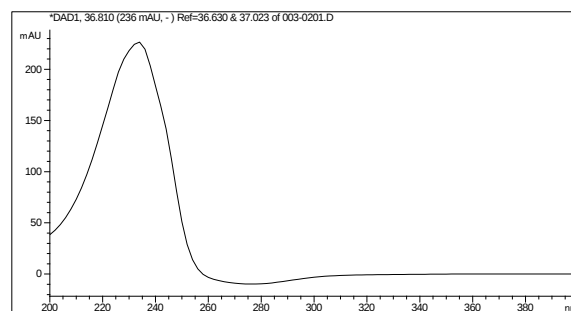


Figura 21 – Espectros no UV de FDT

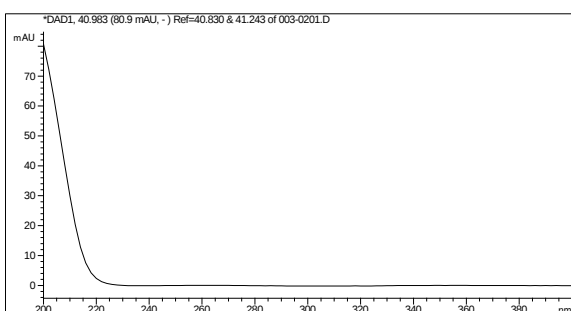
Pico em 28.96 min



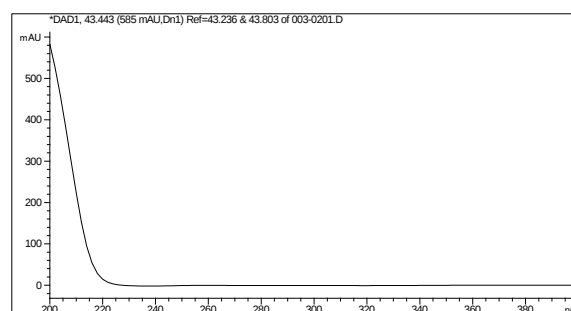
Pico em 36.81 min



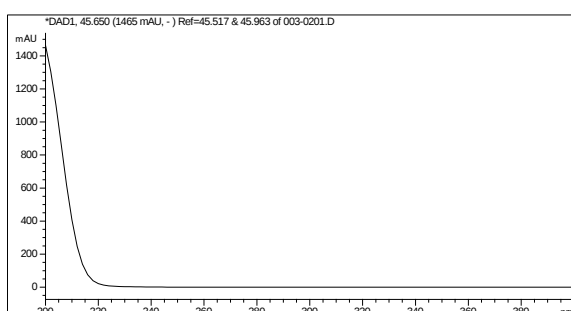
Pico em 40.98 min



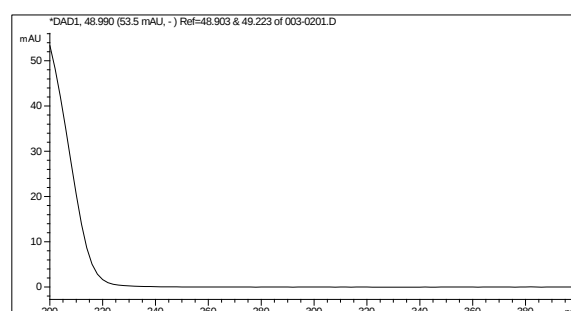
Pico em 43.44 min



Pico em 45.65 min



Pico em 48.99 min



Pico em 51.00 min

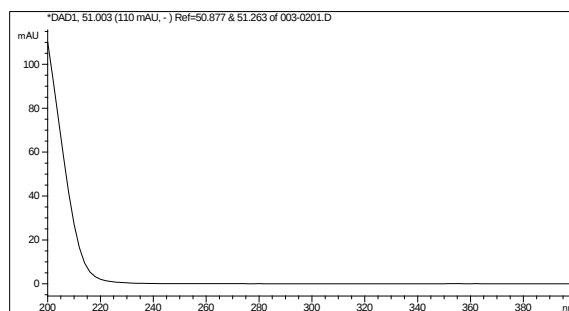


Figura 22 – Espectros no UV de FDT.

4.3.5. Perfil cromatográfico do extrato bruto de *D. opposita* (EBO)

Na Figura 23 está demonstrado o cromatograma do EBO, acompanhado de seus respectivos espectros no UV (Figuras 24 e 25). Ele mostra a presença de dezesseis picos principais, sendo três na região das substâncias de elevada polaridade (tR 1,25, 2,17, 2,68min.), seis (tR 21,51, 21,91, 25,99, 21,91, 25,99, 28,99min.) na região de polaridade intermediária e sete na de baixa polaridade (tR 39,55, 41,00, 43,41, 45,70, 47,43, 49,08 e 51,05min.). Os picos em tR 2,17 e 51,05min. apresentaram o mesmo tempo de retenção e espectros no UV observados para o padrões de alantoína e diosgenina, respectivamente. Os espectros no UV das substâncias detectadas na região de polaridade intermediária apresentaram absorção características de substâncias fenólicas, inclusive flavonóides e chalconas. Os picos detectados na região de baixa polaridade do cromatograma apresentaram absorção no UV somente próximo a 200nm, condizente com a estrutura terpênica das sapogeninas. A elevada concentração dessas substâncias em EBO, quando comparado com EBT, é condizente com o maior rendimento obtido para FDO.

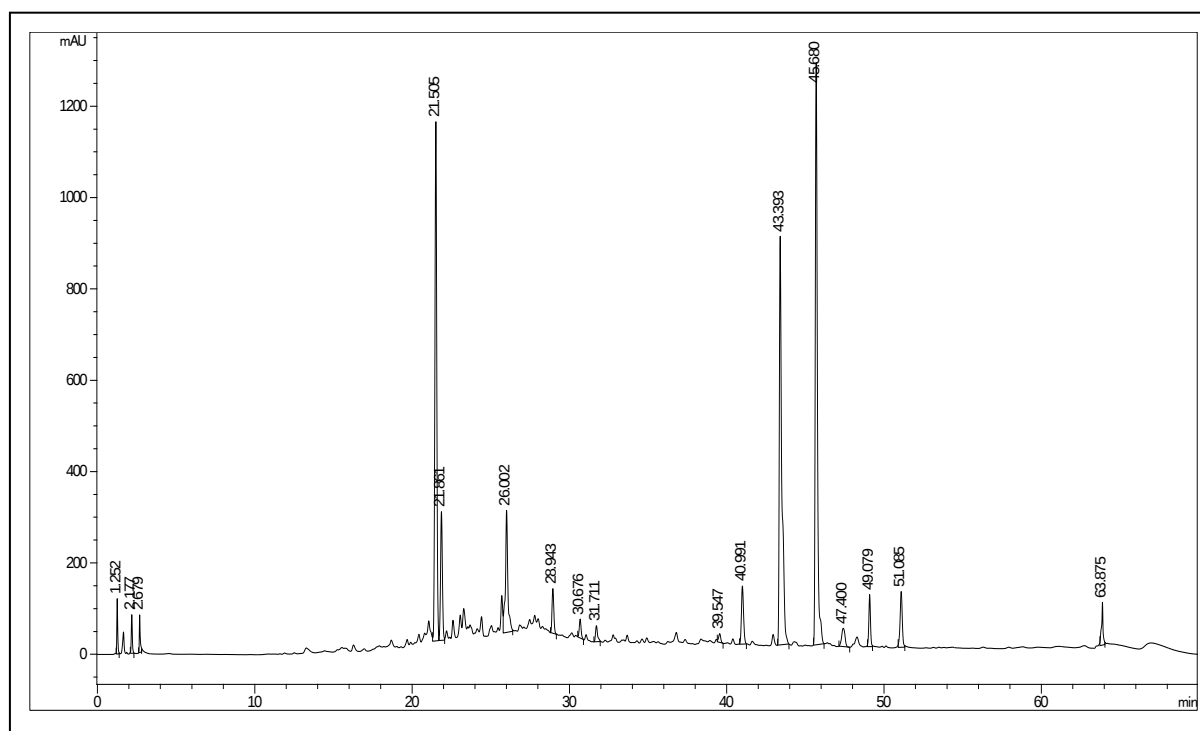
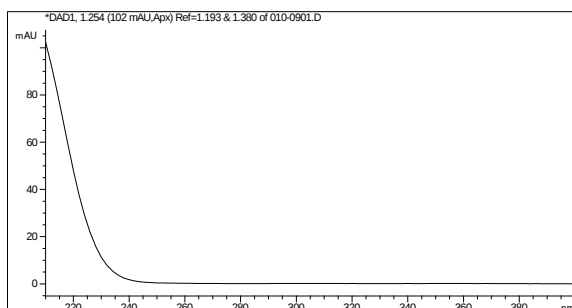
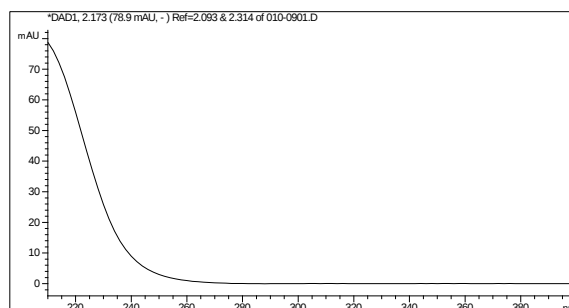


Figura 23 – Cromatograma de EBO obtido por CLAE-DAD a λ 205nm.

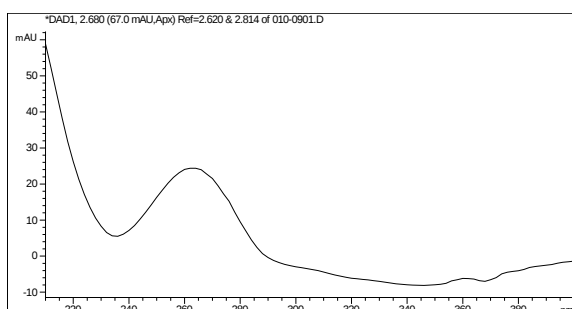
Pico em 1.25 min



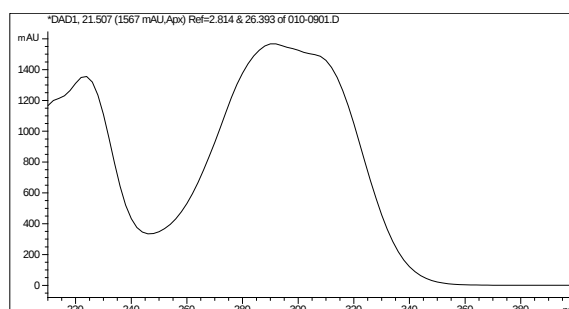
Pico em 2.17 min



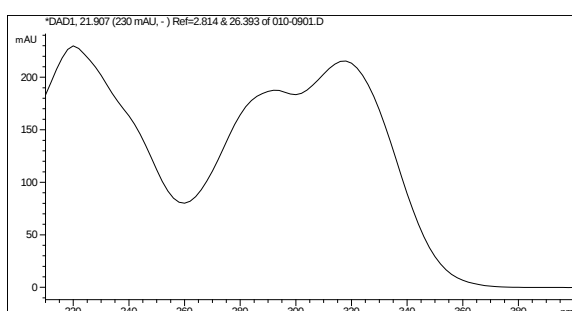
Pico em 2.68 min



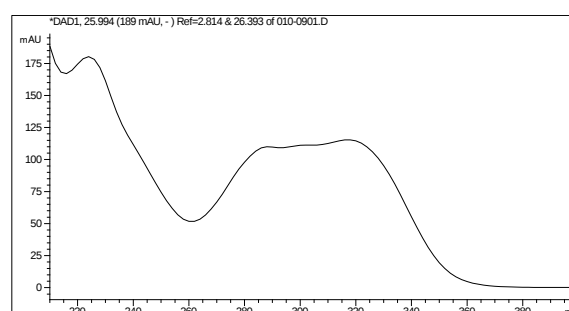
Pico em 21.51 min



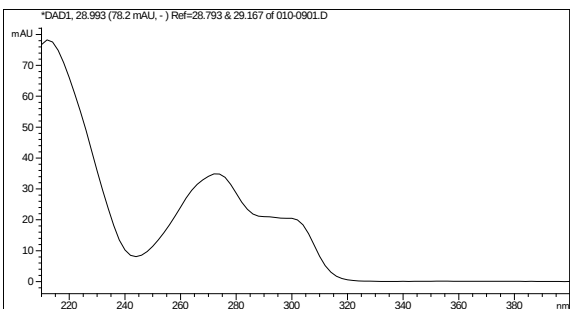
Pico em 21.91 min



Pico em 25.99 min



Pico em 28.99 min



Pico em 39.55 min

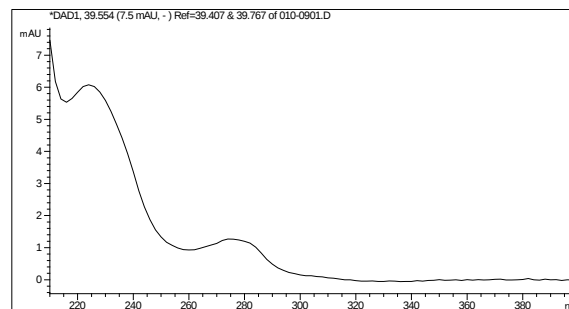


Figura 24 – Espectros no UV de EBO

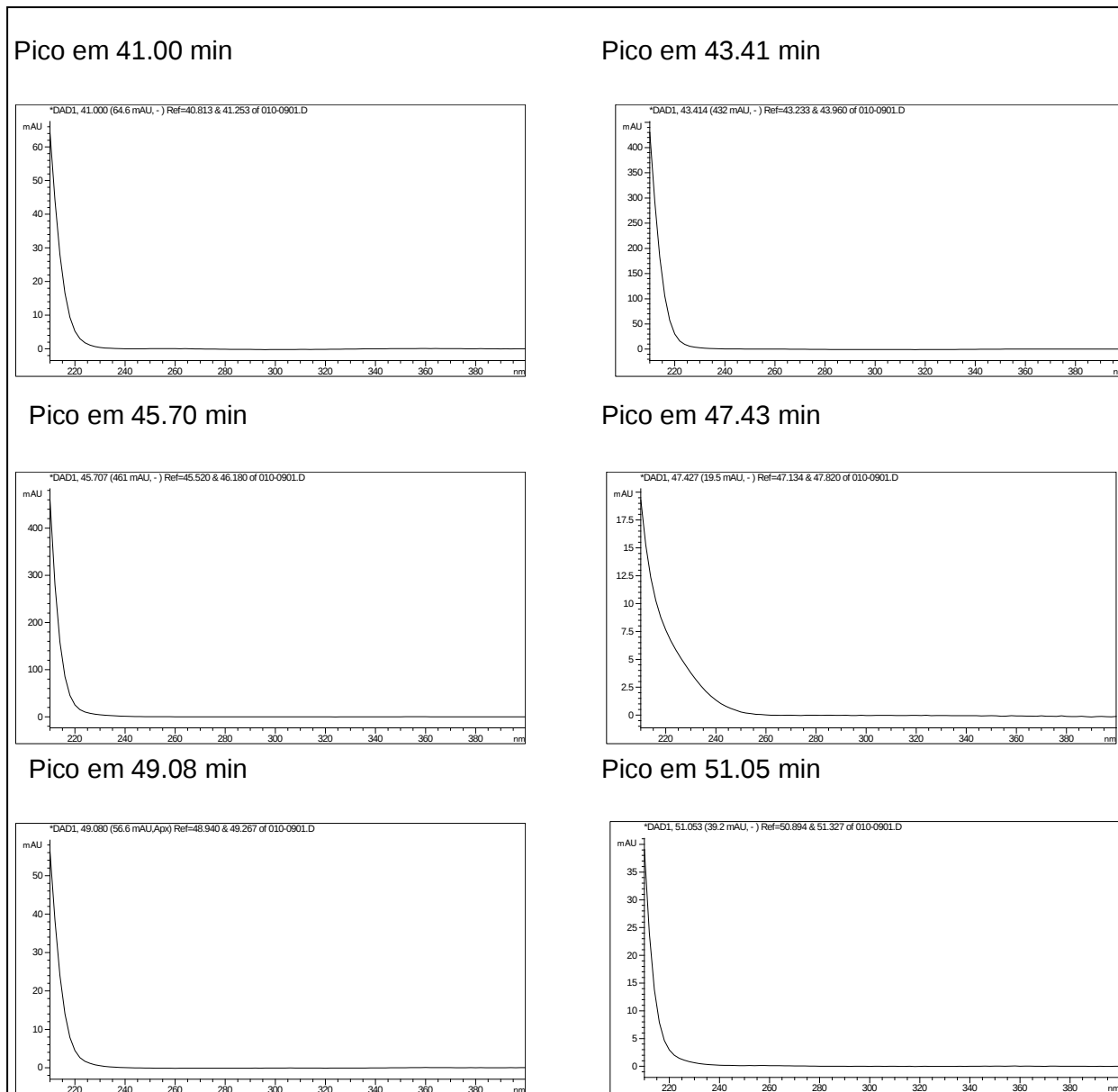


Figura 25 – Espectros no UV de EBO.

4.3.6. Perfil cromatográfico da fração aquosa de *D. opposita* (FAO)

O cromatograma obtido para a FAO, juntamente com seus respectivos espectros no UV, estão demonstrados nas Figuras 26 e 27. Observa-se uma elevada concentração de substâncias de alta polaridade entre tR 1,37 e 2,68min., indicando que a extração líquido-líquido foi eficiente para concentrar essas substâncias. A alantoína foi detectada no tR 2,17min. As demais substâncias detectadas anteriormente no EBO foram observadas nesta fração em baixa concentração. Não foi detectado o pico referente à diosgenina, que é uma substância de baixa polaridade.

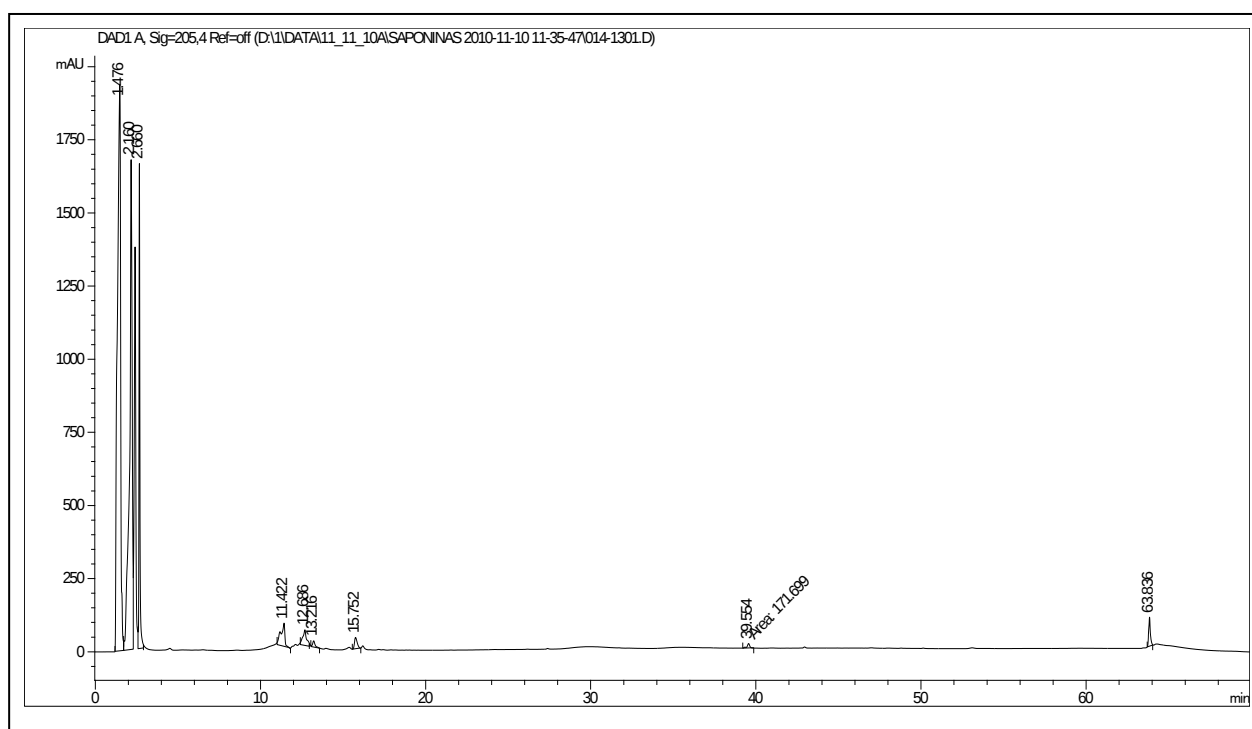


Figura 26 – Cromatograma de FAO obtido por CLAE-DAD a λ 205nm.

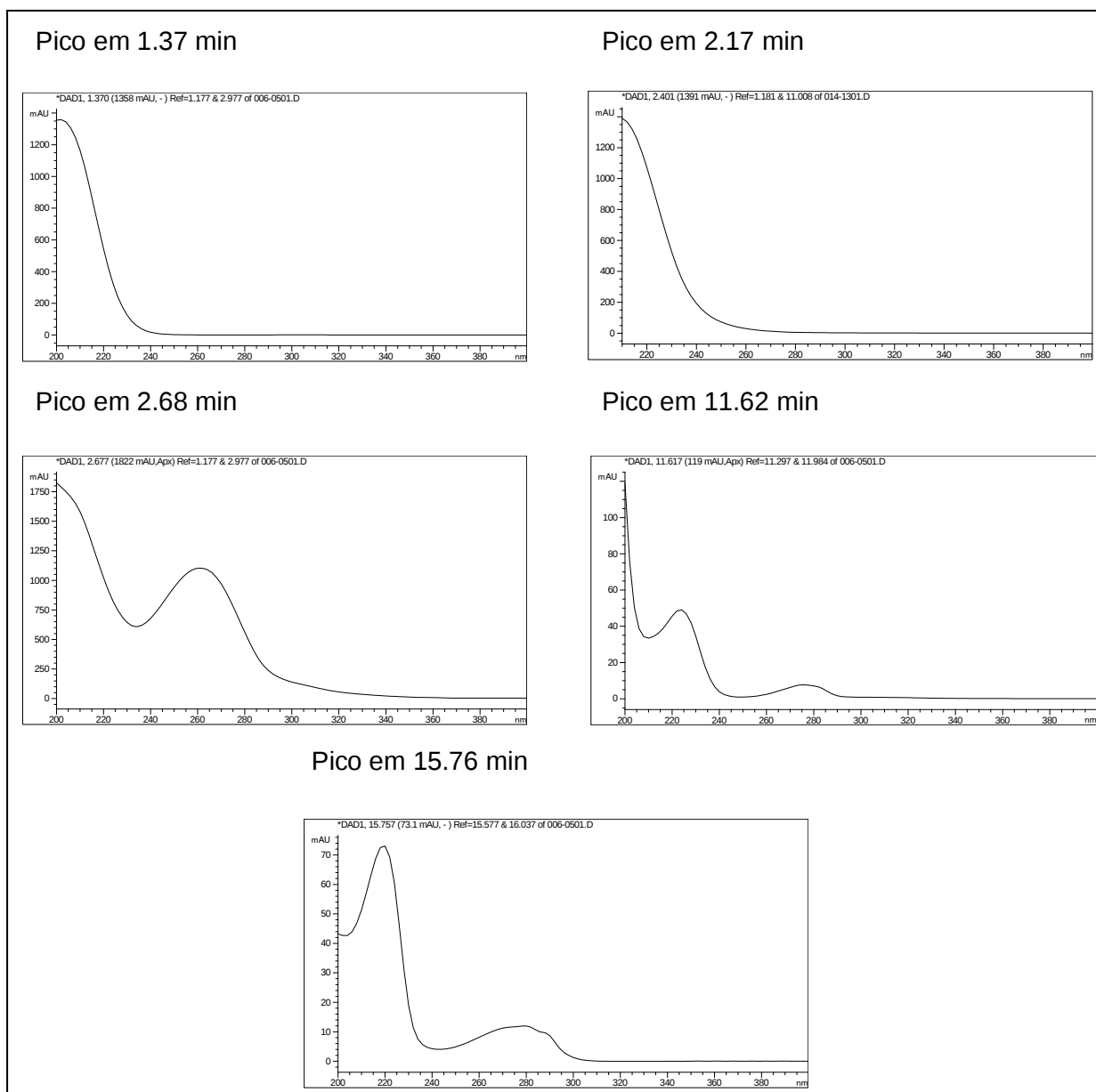


Figura 27 – Espectros no UV de FAO.

4.3.7. Perfil cromatográfico da fração butanol de *D. opposita* (FBO)

Pode ser observado, na Figura 28 o cromatograma e os espectros no UV de FBO (Figura 29). Nota-se a presença de picos na região das substâncias de polaridade intermediária, com absorção no UV condizente para chalconas (tR 21,48 e 21,83min.) e flavonóides (tR 11,78min). O pico no tR 2,16min. pode ser atribuído à presença de alantoína. Não foi observado o pico no tR referente a diosgenina.

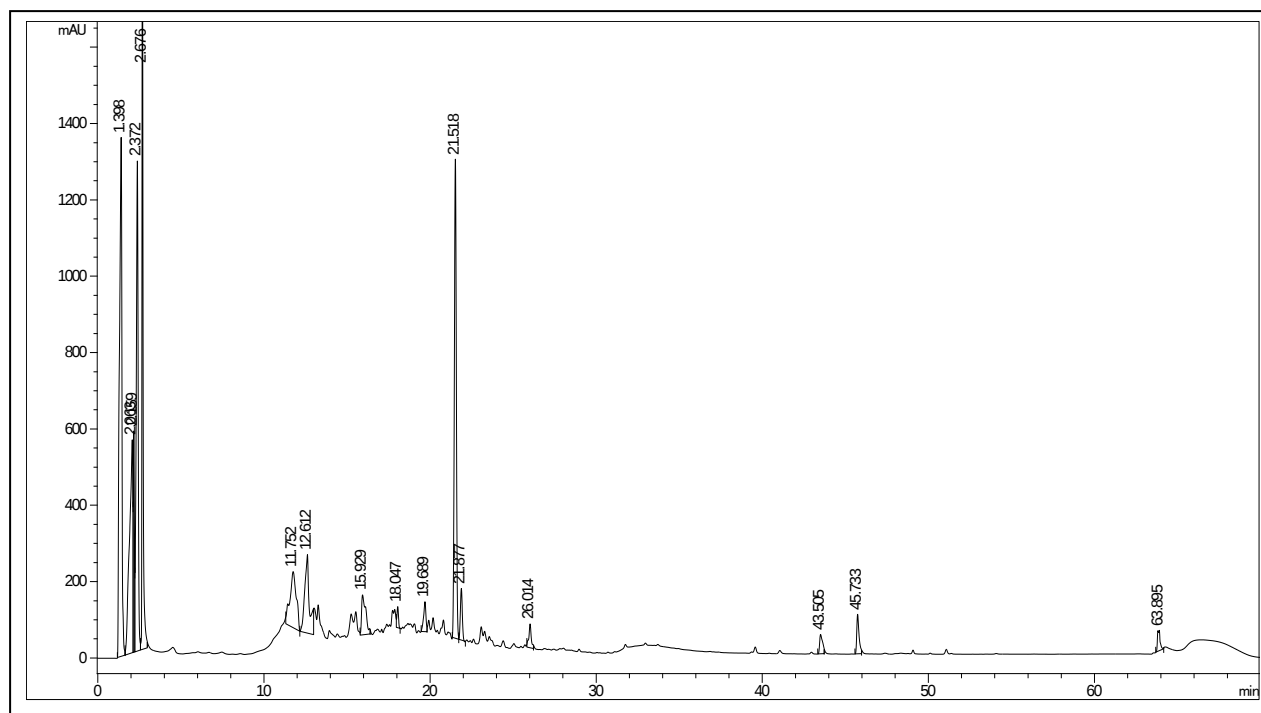
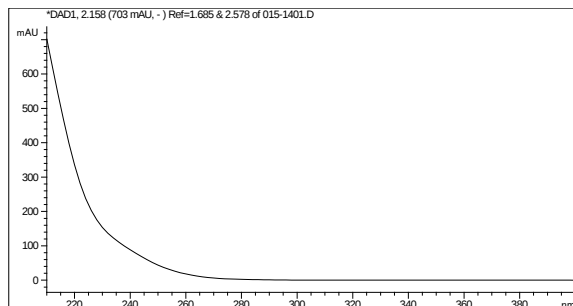
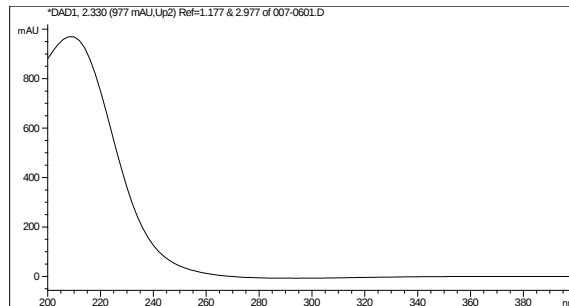


Figura 28 – Cromatograma de FBO obtido por CLAE-DAD a λ 205nm.

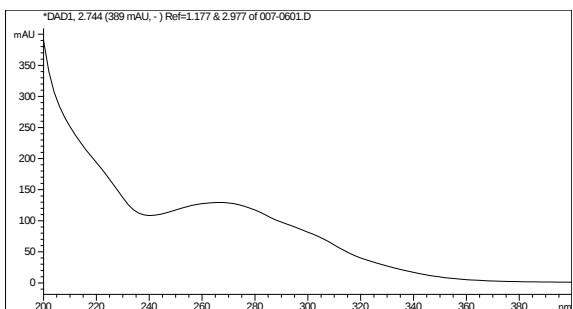
Pico em 2.16 min



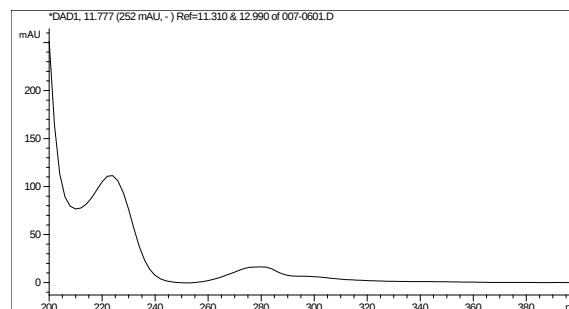
Pico em 2.33 min



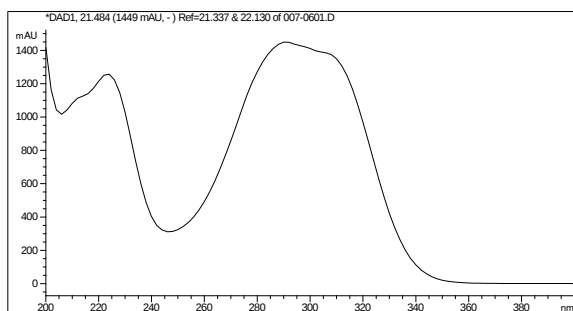
Pico em 2.74 min



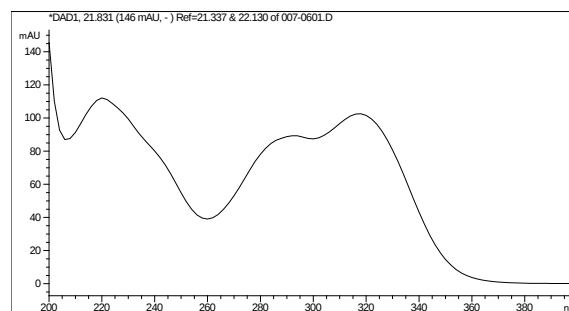
Pico em 11.78 min



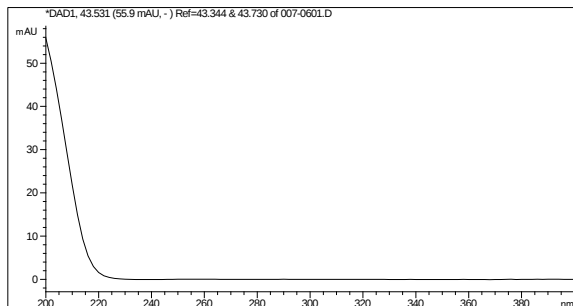
Pico em 21.48 min



Pico em 21.83 min



Pico em 43.53 min



Pico em 45.74 min

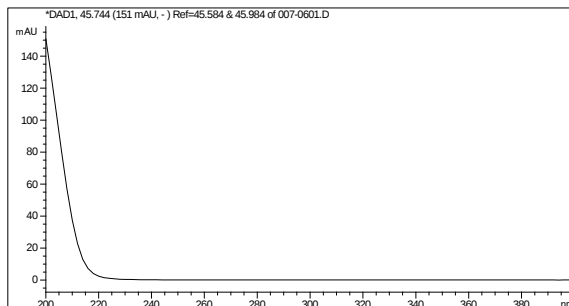


Figura 29 – Espectros no UV de FBO.

4.3.8. Perfil cromatográfico da fração diclorometado de *D. opposita* (FDO)

Na Figura 30 está demonstrado o cromatograma de FDO, acompanhado de seus respectivos espectros no UV (Figura 31 e 32). O perfil obtido é muito semelhante ao EBO, exceto pela ausência de substâncias de elevada polaridade. O cromatograma apresentou vários picos, muito bem definidos, na região das substâncias de baixa polaridade (tR 41,02, 43,55, 45,77 e 49,01min.). A diosgenina foi detectada em tR 51,09min. Conforme o esperado, substâncias de elevada polaridade, inclusive a alantoína, não estão presentes. As substâncias fenólicas, presentes em FBT, também foram detectadas nesta fração nos tRs 21,50, 21,85, 22,65, 26,03, 28,93 e 30,64min.

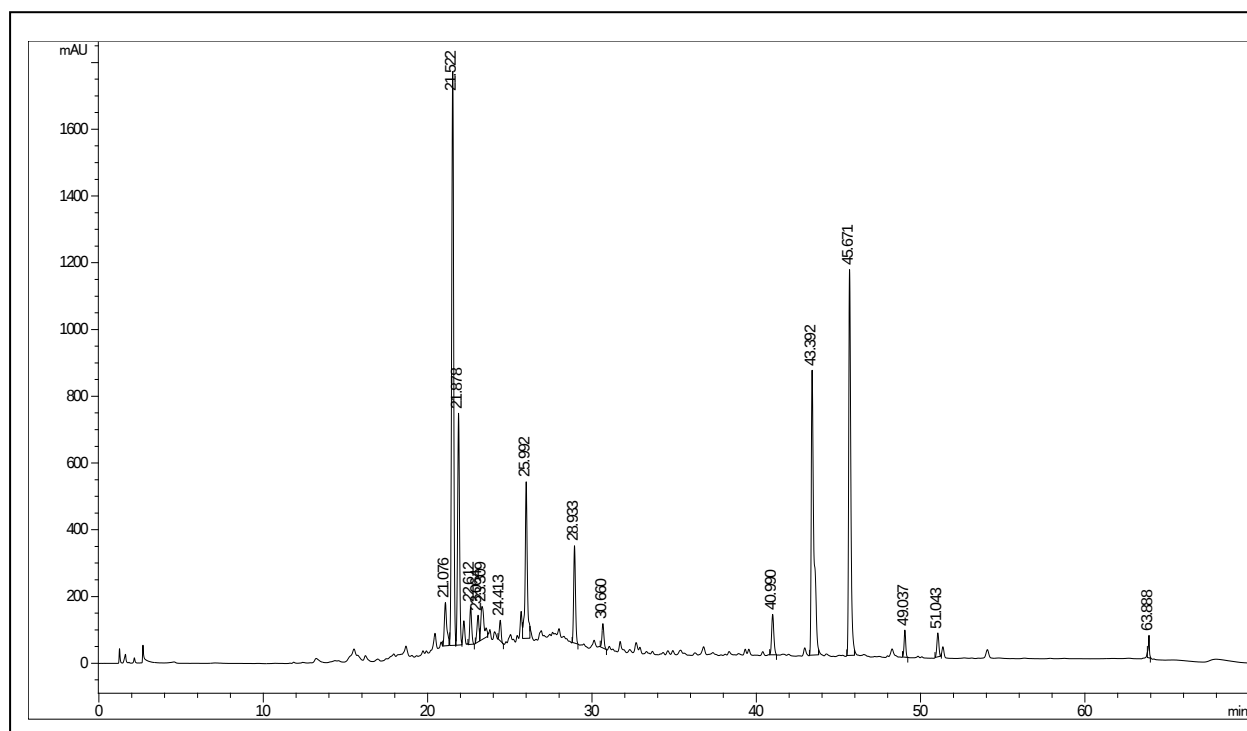
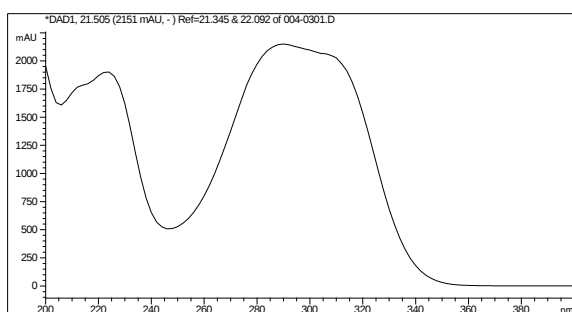
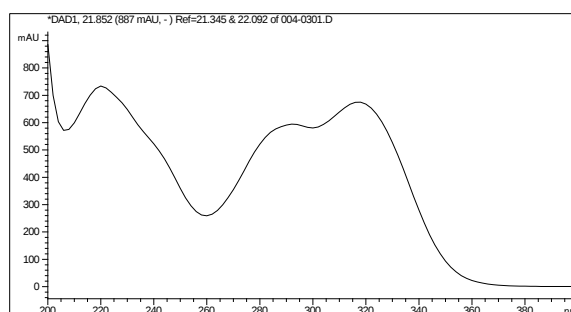


Figura 30 – Cromatograma de FDO obtido por CLAE-DAD a λ 205nm.

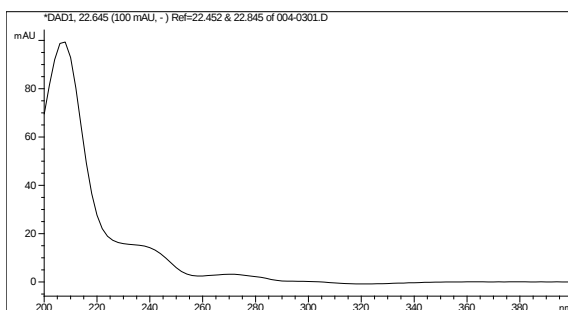
Pico em 21.50 min



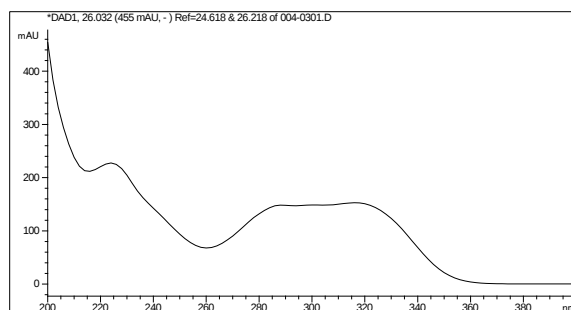
Pico em 21.85 min



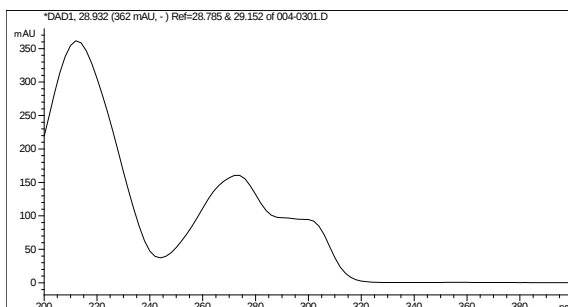
Pico em 22.65 min



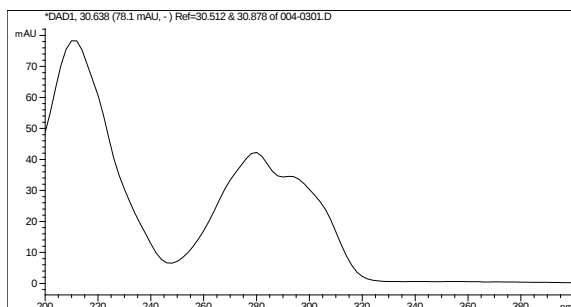
Pico em 26.03 min



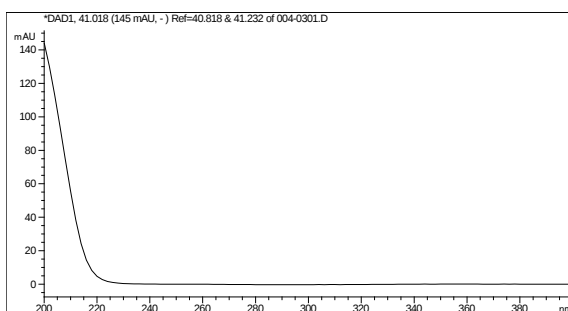
Pico em 28.93 min



Pico em 30.64 min



Pico em 41.02 min



Pico em 43.55 min

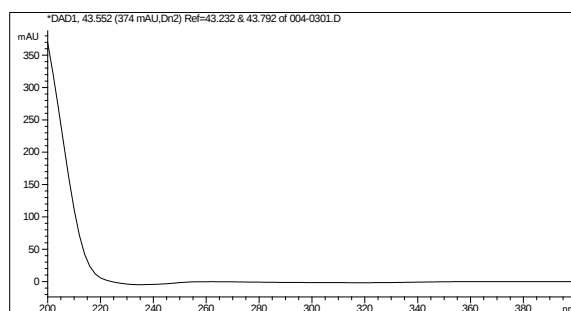


Figura 31 – Espectros no UV de FDO

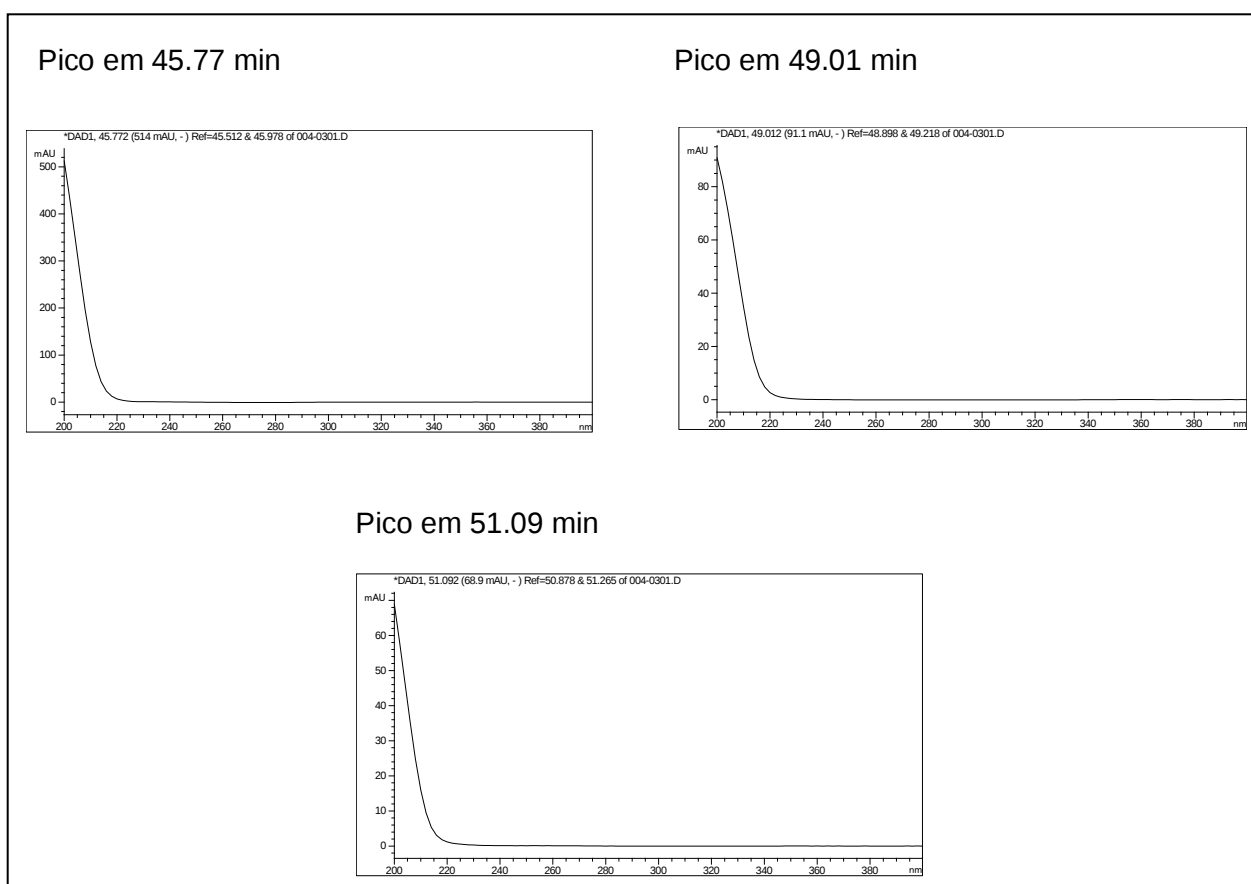


Figura 32 – Espectros no UV de FDO.

Nas análises cromatográficas dos extratos pode-se confirmar a presença de alantoína e diosgenina, conforme descrito para as espécies do gênero *Dioscorea* (CHOI et al., 2004). Quando da separação pelo método de partição com n-butanol, nota-se nas frações FAT, FBT, FAO e FBO a presença de alantoína, acompanhada de outras substâncias polares. A diosgenina e outras sapogeninas não foram observadas nessas frações. Já FDT e FDO, obtidas com diclorometano, apresentaram, prioritariamente, as sapogeninas. Este resultado demonstra que o método de partição líquido-líquido foi eficiente na separação e concentração de substâncias de diferentes polaridades, o que poderia permitir averiguar qual(is) classe(s) apresentaria(m) melhor(es) resultado(s) para o tratamento da alergia alimentar.

4.4. Ensaios biológicos

A alergia alimentar é um importante problema de saúde mundial, pois além de ter sua incidência aumentada nas últimas décadas, há carência de tratamentos eficazes. Ela acomete aproximadamente 6% das crianças e de 3 a 4% dos adultos nos países ocidentais e pode ser até fatal (SICHERER & SAMPSON, 2009).

As características clínicas da alergia alimentar advêm de reações imunes subjacentes, associadas à produção de IgE (reações alérgicas agudas e anafilaxia) (SAMPSON & WANG, 2009). Para estudar a alergia alimentar nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo que reproduz muitos parâmetros encontrados na doença espontânea (SALDANHA et al., 2004). Neste modelo, camundongos BALB/c, sensibilizados com ovalbumina (OVA), recebem como única fonte hídrica solução de OVA. Eles apresentam aumento da produção de IgE e IgG1, edema intestinal nas primeiras 24 horas, além de infiltrado de eosinófilos de 48 horas a 14 dias na mucosa intestinal. Há também um aumento do número de mastócitos na mucosa intestinal, assim como um aumento da produção de muco pelas células caliciformes.

Para avaliar o potencial dos inhames no tratamento da alergia alimentar, os animais sensibilizados com OVA ou não, desafiados oralmente com solução de OVA, receberam suplementação da dieta com extratos brutos e frações aquosa, butanol e diclorometano das espécies *D. trifida* e *D. opposita*. O objetivo foi averiguar se os tratamentos interfeririam nos parâmetros clínicos na doença, indicando o potencial das plantas no seu tratamento.

Primeiramente, foi necessário determinar quais doses de extratos obtidos de *D. trifida* e *D. opposita* seriam adequadas para o estudo. Sabe-se que as espécies de Dioscoreaceae apresentam, em sua maioria, a sapogenina esteroidal, diosgenina. Estudos com esta substância bioativa pura, nas doses de 100mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia (HUANG et al., 2009) em um modelo de alergia alimentar experimental proposto por VAN HALTEREN et al. (1997) obtiveram diminuição da inflamação intestinal, do número de mastócitos, e da produção de IgE. Este mesmo grupo de pesquisa (HUANG et al., 2010) demonstrou, com o uso de diosgenina, a diminuição de

IL-4 e GATA-3 e o aumento da produção de IL-10, atenuando as respostas imunes via Th2. Em outro estudo com um modelo de alergia respiratória experimental utilizando diosgenina pura nas doses de 200mg/kg/dia e 400mg/kg/dia, JAN et al. (2007) encontraram apenas uma tendência à diminuição na produção de IgE total e IgE anti-OVA ($p>0,05$). Entretanto, esses mesmos pesquisadores encontraram aumento da produção de IFN- γ e aumento da expressão do fator de transcrição para diferenciação das células Th1 T-bet ($p<0,05$). Já HUANG et al. (2009) demonstraram a redução de IgE total e IgE anti-OVA em camundongos com alergia alimentar a OVA, tratados com diosgenina na dose de 200mg/kg/dia.

Outro composto bioativo encontrado nas espécies de inhame é a alantoína (SAGARA et al., 1989; NIU et al., 2010). A alantoína, 5-ureído hidantoína, tem sido amplamente citada na literatura como responsável por numerosas atividades farmacológicas, entre elas cicatrizante, anti-irritante, hidratante e removedor de tecido necrótico (SAITO & OLIVEIRA, 1986), estimulador de mitose celular, como também promotor de estimulação epitelial, analgésico e queratolítico (SHESTOPALOV et al., 2006; VERALDI et al., 2008). Devido a essas ações a alantoína tem sido utilizada em preparações cosméticas e medicamentosas ao longo dos últimos 70 anos com diferentes propósitos, especialmente como cicatrizante. Entretanto, apesar dessas inúmeras citações e ampla aplicação terapêutica, o mecanismo de ação da alantoína permanece desconhecido (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2001). Em um estudo de alergia respiratória experimental, a alantoína pura foi utilizada nas doses de 25mg/kg/dia e 50mg/kg/dia para avaliar seus efeitos supressivos na inflamação alérgica. Nas duas doses testadas, ela promoveu diminuição do número de eosinófilos, da produção de muco pelas células caliciformes no tecido pulmonar, e da produção de IL-4, IL-5, IgE anti-OVA e IgE total (LEE ET AL., 2010).

De acordo com estes resultados citados e levando em consideração que estaríamos testando extratos brutos e não as substâncias isoladas purificadas, foi determinado que as doses de extrato bruto de *D. trifida* e *D. opposita* a serem testadas seriam 100 mg/kg/dia e 300 mg/kg/dia. Ao testar extratos brutos estamos tentando mimetizar o efeito da ingestão do alimento e sua atuação como nutracêutico. Nos extratos brutos existe uma mistura de várias substâncias bioativas em baixas concentrações. Entretanto, tem sido bem estabelecido que a mistura complexa de compostos bioativos em frutas e vegetais pode prover benefícios a saúde através da combinação dos

efeitos aditivos e sinérgicos. Os compostos bioativos em frutas e vegetais podem ter complementaridade e ultrapassar o efeito dos compostos isolados, exercendo diversas ações como diminuição do estresse oxidativo, atuação no sistema imune, na expressão gênica da proliferação de células e da apoptose, no metabolismo hormonal e exercendo atividades antibacteriana e antiviral (LIU, 2002; SEERAM et al.; 2004).

Para avaliar se a separação e a concentração das substâncias presentes em EBT e EBO afetariam a atividade, ou seja, se alguma fração do EB teria sua atividade pronunciada quando da separação dos demais componentes, foi realizada a partição dos extratos brutos em frações de diferentes polaridades. A partir do resultado para os extratos brutos, em que ambos foram ativos na dose de 100mg/kg/dia, foi determinada a dose de 100 mg/kg/dia para testar as frações aquosa, butanol e diclorometano.

Antes de iniciar os estudos com *D. trifida* e *D. opposita*, foi necessário escolher um controle ativo para o experimento. Um controle ativo é uma substância cuja ação é comprovada sobre os efeitos a serem estudados. A sua utilização nos experimentos visa comparar o seu potencial com a droga a ser testada. Neste estudo foi escolhido como controle ativo a dexametasona (DX), um anti-inflamatório esteroide de escolha no tratamento de alergias (HOLMES, 1991). Ela apresenta efeitos potentes, tanto como anti-inflamatório, quanto como imunossupressor. Como um glicocorticóide, a DX liga-se a receptores intracelulares, que pertencem à superfamília de receptores nucleares, agindo como um fator de transcrição ativado pelo hormônio. Em seguida, ocorre dimerização e há migração para o núcleo. A interação com o DNA modifica a transcrição gênica. Diferente de seus análogos, a DX apresenta propriedades mineralocorticóides reduzidas. É aproximadamente 25 vezes mais potente que seu análogo natural, o cortisol (DE CASTRO, 2005). Foi possível encontrar na literatura uma dose que não acarretasse tantos efeitos colaterais pelo uso crônico, sendo o trabalho de TATSUO et al. (1994) a referência para o presente estudo. Eles utilizaram a dose de DX mais baixa (0,4 mg/kg/dia), por um período de tempo mais longo (21 dias), obtendo os resultados como controle ativo esperados (TATSUO et al., 1994). Além disso, nessa mesma dose, a DX foi também capaz de inibir a aversão a ingestão de OVA induzida imunologicamente com este mesmo modelo experimental (CARA et al., 1994).

No presente estudo, a DX apresentou inibição dos sintomas da alergia alimentar. Houve redução na produção de IgE, melhora no consumo de solução de OVA, diminuição do edema e diminuição do número de mastócitos. Entretanto, os animais tratados com DX apresentaram retardo do crescimento, mantendo seu peso constante durante as 4 semanas do tratamento. O desenvolvimento retardado do organismo destes animais é um dos efeitos colaterais relatados na literatura e pode ser explicado pelas modificações metabólicas como o nível de aminoácidos plasmáticos elevado, devido ao aumento no catabolismo e diminuição do anabolismo, por isso o peso constante (GRAMSBERGER & MULDER, 1998). Outros efeitos colaterais relatados são o retardo do desenvolvimento do tecido linfóide, que foi observado pela diminuição do índice esplênico, por possível redução da expansão clonal de linfócitos T e B (SCHACKE et al., 2004).

4.5. Tratamentos com ração de caseína e desafio com solução de OVA a 20%

4.5.1. Consumo da ração de caseína

O extratos bruto de *D. trifida* (EBT), nas doses de 100 mg/kg/dia (T100) e 300mg/kg/dia (T300) e suas frações aquosa (FAT) 100mg/kg/dia, butanol (FBT) 100mg/kg/dia e diclorometano (FDT) 100mg/kg/dia e o extrato bruto de *D. opposita* (EBO) na dose de 100mg/kg/dia (O100) e 300mg/kg/dia (O300) e suas frações aquosa (FAO) 100mg/kg/dia, butanol (FBO) 100mg/kg/dia e diclorometano (FDO) 100mg/kg/dia foram adicionadas à ração de caseína. O consumo médio por grupo de ração suplementada, no período de tratamento de 29 dias, está apresentado na Tabela 5 abaixo:

Tabela 5 – Média do consumo por grupo da ração de caseína suplementada ou não durante o período de tratamento.

Grupos	Consumo de ração de caseína (g)
ST (sem tratamento)	5,17 +/- 0,14
T100 (EB de <i>D. trifida</i>) 100mg/kg/dia	5,13 +/- 0,13
T300 (EB de <i>D. trifida</i>) 300mg/kg/dia	4,98 +/- 0,13
O100 (EB de <i>D. opposita</i>) 100mg/kg/dia	4,72 +/- 0,14
O300 (EB de <i>D. opposita</i>) 300mg/kg/dia	3,83 +/- 0,25
FAT 100mg/kg/dia	4,98 +/- 0,10
FBT 100mg/kg/dia	5,28 +/- 0,15
FDT 100mg/kg/dia	5,03 +/- 0,11
FAO 100mg/kg/dia	5,28 +/- 0,19
FBO 100mg/kg/dia	5,15 +/- 0,17
FDO 100mg/kg/dia	4,81 +/- 0,17
Dexametasona 0,4mg/kg/dia	4,67 +/- 0,25

Observou-se que a adição dos extratos e frações não interferiu no consumo de ração, tanto em camundongos controle (OVA-), quanto em camundongos alérgicos (OVA+) excetuando-se os grupos controle e alérgico O300, quando comparados aos grupos ST. Os animais do grupo controle e alérgico de O300 consumiram menos ração durante todo o período do experimento, mostrando que o tratamento interferiu na ingestão diária dos animais.

O consumo de ração, dentro do mesmo grupo de tratamento, não apresentou diferença estatística em nenhum dos tratamentos ($p > 0,05$), mostrando que o grupo sensibilizado (OVA+) não foi tratado com uma dose maior ou menor que o grupo não-sensibilizado (OVA-).

A Figura 33 representa o consumo médio diário de ração dos animais sensibilizados ou não, tratados ou não, com os extratos e frações de *D. trifida* e *D. opposita*.

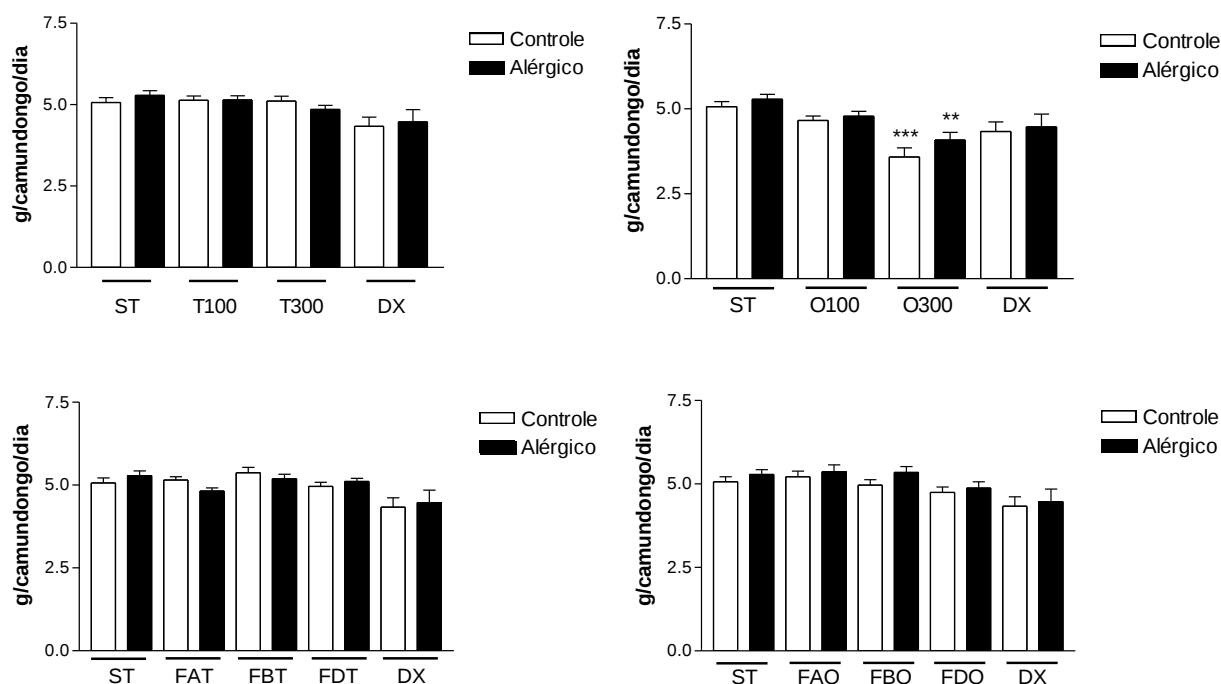


Figura 33 – Avaliação do consumo diário da ração de caseína. Camundongos BALB/c sensibilizados (alérgicos) ou não (controles), receberam ou não tratamento na ração (ST: sem tratamento; T100: extrato bruto *D. Trifida* dose 100mg/kg/dia; T300: extrato bruto *D. trifida* dose 300mg/kg/dia; O100: extrato bruto *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; O300: extrato bruto *D. opposita* dose 300mg/kg/dia; FAT: fração aquosa de *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FAO: fração aquosa de *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; DX: dexametasona dose 0,4mg/g camundongo/dia). Tratamentos iniciaram no dia -1, a sensibilização ocorreu dia 0, o reforço dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam solução de OVA a 20% na mamadeira. As barras representam a média (+/- EPM) dos valores de cada grupo de todos os dias avaliados (-1 ao 28). N= 5 animais/ grupo. **P<0,05 em relação ao grupo alérgico ST (OVA+); ***P<0,05 em relação ao grupo controle ST (OVA-).

Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística na média de consumo de ração dentro do mesmo grupo de tratamento (intragrupos), evidenciando que os animais controle receberam a mesma dose do que os respectivos animais alérgicos. Também não houve diferença estatística na média de consumo de ração intergrupos, exceto o grupo O300, que apresentou diminuição do consumo ração, quando comparado ao grupo ST. O fato do grupo O300 apresentar diminuição do

consumo de ração pode ser explicado por uma possível aversão ao gosto da ração suplementada com o extrato bruto de *D. opposita*, na dose de 300mg/kg/dia. É relatado na literatura que algumas espécies de inhame podem conter substâncias amargas, fato este que leva aos consumidores deste alimento a fazerem a lavagem em água corrente, ou sua decocção antes da ingestão (OMORUYI, 2008). Devido ao fato de usarmos extratos brutos, onde as substâncias estão presentes em elevada concentração, e do produto não ter sofrido nenhum dos processos citados acima, é possível que a ração tenha um gosto desagradável, podendo ser este o fato que levou a inibição do consumo, pelo sabor.

4.5.2. Consumo de solução de OVA a 20%

Na semana do desafio alergênico, as mamadeiras contendo a solução de OVA a 20% foram pesadas diariamente. Observou-se animais controles têm uma tendência a ingerir mais solução de OVA que animais alérgicos, mas essa diferença só foi significativa com o grupo ST. Entretanto apenas o tratamento com DX permitiu que os animais alérgicos tratados ingerissem mais solução de OVA que os animais alérgicos ST ($P < 0,05$) (Figura 34).

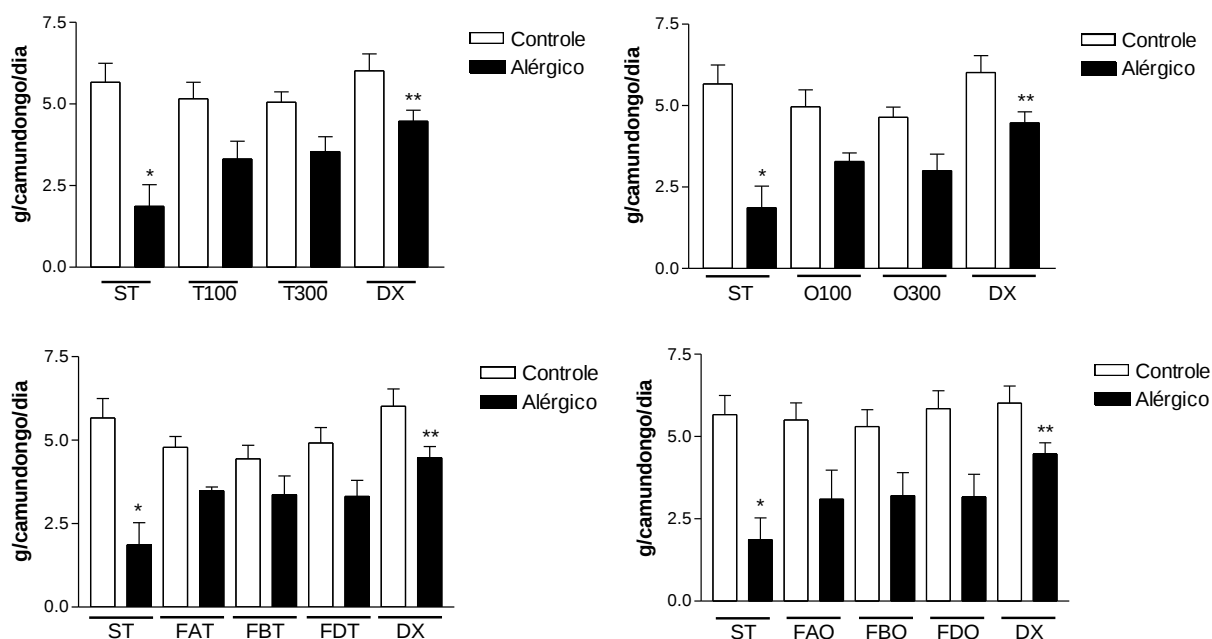


Figura 34 – Avaliação do consumo diário de solução de OVA na semana do desafio oral.

Camundongos BALB/c sensibilizados (alérgicos) ou não (controles), receberam ou não tratamento na ração (ST: sem tratamento; T100: extrato bruto *D. Trifida* dose 100mg/kg/dia; T300: extrato bruto *D. trifida* dose 300mg/kg/dia; O100: extrato bruto *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; O300: extrato bruto *D. opposita* dose 300mg/kg/dia; FAT: fração aquosa de *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FAO: fração aquosa de *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FBO: fração butanol *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FDO: fração diclorometano *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; DX: dexametasona dose 0,4mg/g camundongo/dia). Tratamentos iniciaram no dia -1, a sensibilização ocorreu dia 0, o reforço dia 14 e do dia 21 ao dia 28 todos receberam solução de OVA a 20% na mamadeira. As barras representam a média (+/- EPM) dos valores de cada grupo de todos os dias avaliados (-1 ao 28). N= 5 animais/grupo. *P<0,05 em relação ao grupo controle (OVA-); **P<0,05 em relação ao grupo alérgico ST (OVA+).

Em estudos anteriores ficou evidenciado que, frente à opção de ingerir água ou solução de OVA adocicada, animais sensibilizados com OVA demonstram aversão à ingestão da solução de OVA, ao contrário dos animais controle (CARA et al., 1994, CARA et al., 1997). No presente estudo, este dado foi confirmado com os animais não sensibilizados, que ingeriram mais solução de OVA do que os animais sensibilizados. Acredita-se, então, que a ingestão de solução de OVA causou um desconforto nos animais sensibilizados, devido a presença do alérgeno na solução no período inicial da ingestão, e isto os levou a relacionar o sabor da ovalbumina a um possível mal estar. No entanto, mesmo os animais sensibilizados, que ingeriram menor volume de solução

de OVA, esta quantidade foi suficiente para causar alergia, com produção de anticorpos anti-ovalbumina e todos os sintomas da doença.

Neste estudo animais sensibilizados, tratados com extratos e frações de inhame, não apresentaram melhora na ingestão de solução de OVA. Já os animais tratados com o padrão, dexametasona, apresentaram melhora na ingestão desta proteína, resultado também encontrado no estudo de CARA et al. (1997).

4.6. Quantificação da IgE anti-OVA sérica

Um dos parâmetros utilizados para avaliar o processo alérgico é a dosagem sérica de anticorpos IgE. No dia 28, antes da necropsia, foi realizada a sangria dos animais e o sangue foi posteriormente separado por centrifugação para obtenção do soro. Como mostra a Figura 35, a produção de IgE anti-OVA do grupo alérgico ST foi estatisticamente maior quando comparado ao seu respectivo grupo controle ($p < 0,001$), comprovando que os animais ficaram alérgicos. Os tratamentos com T100, T300, O100, O300, FAT, FBT e FDT se mostraram eficazes na diminuição da produção dessa imunoglobulina no soro dos animais alérgicos ($p < 0,05$), quando comparados aos animais alérgicos não tratados ST. Observa-se, no entanto, que a diminuição não foi tão acentuada quanto à do tratamento com DX. Já os grupos FAO, FBO e FDO não foram capazes de diminuir a produção de IgE quando comparados ao grupo alérgico tratado ST.

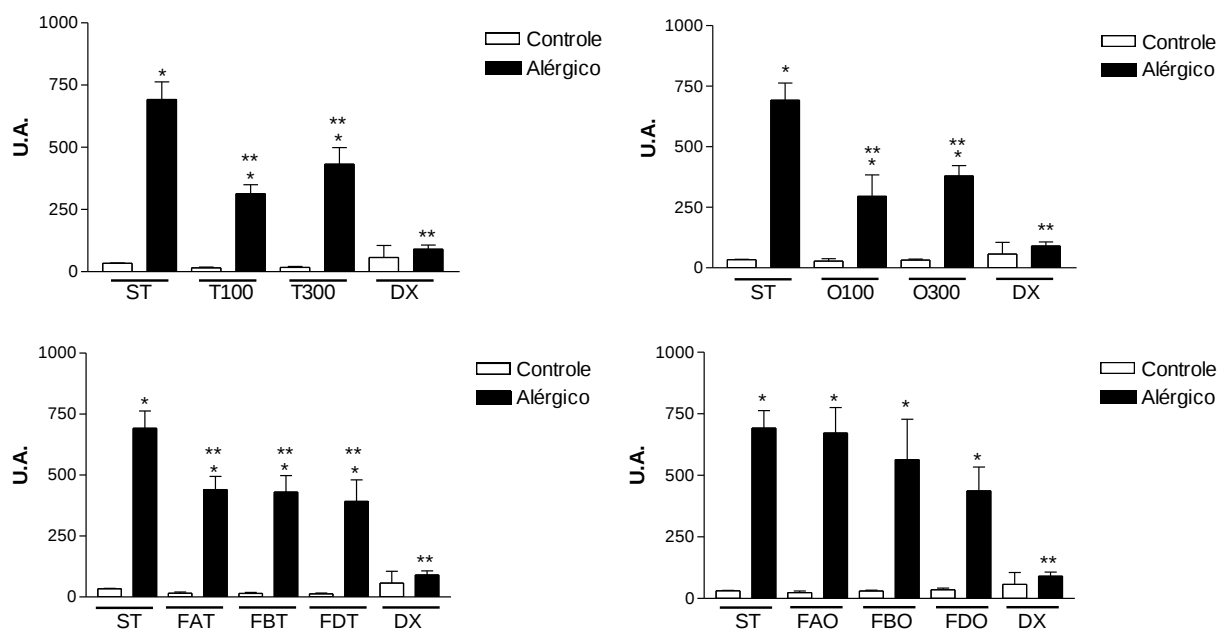


Figura 35 – Avaliação dos anticorpos IgE anti-OVA após o desafio com solução de OVA.

Camundongos BALB/c sensibilizados (alérgicos) ou não (controles), receberam ou não tratamento na ração (ST: sem tratamento; T100: extrato bruto *D. Trifida* dose 100mg/kg/dia; T300: extrato bruto *D. trifida* dose 300mg/kg/dia; O100: extrato bruto *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; O300: extrato bruto *D. opposita* dose 300mg/kg/dia; FAT: fração aquosa de *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FAO: fração aquosa de *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FBO: fração butanol *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FDO: fração diclorometano *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; DX: dexametasona dose 0,4mg/kg/dia). Tratamentos iniciaram no dia -1, a sensibilização ocorreu dia 0, o reforço no dia 14 e no dia 21 ao dia 28 todos receberam solução de OVA a 20% na mamadeira. As barras representam a média (+/- EPM) dos valores de cada grupo obtidos em amostras de soro total para IgE comparados ao soro positivo que foi considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A.). N=5 animais/grupo. *P<0,05 em relação ao grupo controle (OVA-); **P<0,05 em relação ao grupo alérgico ST (OVA+).

Indivíduos que sofrem com doenças alérgicas têm os níveis elevados de IgE específicas a um determinado antígeno. Estas imunoglobulinas se ligam aos seus respectivos receptores FcεRI na superfície dos mastócitos/basófilos e, com a exposição do alérgeno, ocorre liberação de mediadores inflamatórios que irão gerar os sintomas característicos da alergia.

Analisando o tratamento com EBT e EBO, nas duas doses testadas, nota-se que ambos foram capazes de inibir a produção de IgE anti-OVA ($p<0,05$) quando comparado aos animais alérgicos ST, mas não foram tão potentes como DX. Nota-se,

pelo perfil em CLAE, que as classes de substâncias bioativas encontradas nesses extratos são bastante similares, diferenciando apenas nas suas concentrações. Foram encontrados em ambos os extratos brutos alantoína e diosgenina. Adicionalmente, foi avaliado se as frações aquosa, butanol e diclorometano teriam o mesmo resultado que seu respectivo extrato bruto. As frações obtidas de *D. trifida* (FAT, FBT e FDT) continuaram inibindo a produção de IgE anti-OVA ($p < 0,05$), indicando a presença de substâncias ativas em concentrações suficientes para exercerem esta ação. Já as frações obtidas de *D. opposita* (FAO, FBO e FDO) não apresentaram esta capacidade. No estudo de HUANG et al. (2009), animais com alergia alimentar a OVA tratados com diosgenina também apresentaram diminuição da produção de IgE total e IgE anti-OVA. Da mesma forma, LEE et al. (2010) demonstraram redução da produção de IgE total e IgE anti-OVA em camundongos tratados com alantoína. É possível que exista uma sinergia entre os compostos bioativos presentes nos extratos e frações testados, inclusive entre a alantoína e diosgenina, e conjunto delas sejam os responsáveis pela inibição da produção de IgE anti-OVA. A diminuição da produção de IgE pode ser também explicada pela regulação da diferenciação das células T. JAN et al. (2007) detectaram aumento da produção de t-bet, o fator de transcrição para linfócitos Th1, em animais alérgicos tratados com diosgenina. Este achado está de acordo com o encontrado por HUANG et al. (2009), que determinaram a concentração de INF- γ e IL-4, em animais alérgicos a OVA e tratados com diosgenina. Esses detectaram que houve uma diminuição da produção de IL-4 (relacionada à resposta Th2) e aumento de INF- γ (relacionada à resposta Th1). A alantoína, no estudo de LEE et al. (2010), também foi capaz de inibir a produção de IL-4 em animais alérgicos a OVA. Conforme discutido anteriormente, a alantoína pode estar agindo sinergicamente com diosgenina e outras substâncias para a obtenção dos resultados encontrados. Desta forma, estas substâncias estariam modulando a resposta alérgica alimentar (uma resposta imune tipicamente Th2) para uma resposta imune do tipo Th1.

4.7. Avaliação do edema intestinal

O edema foi avaliado pela fórmula $[(\text{peso úmido} - \text{peso seco}) / \text{peso seco}]$. Foi observado que os animais alérgicos ST apresentam maior extravasamento de líquidos e proteínas que os animais não alérgicos ST (Figura 36). Apesar de todos os extratos e

frações testados serem ativos, nenhum dos tratamentos conseguiu diminuir o extravasamento de líquido e proteínas como DX, que chegou a 39%.

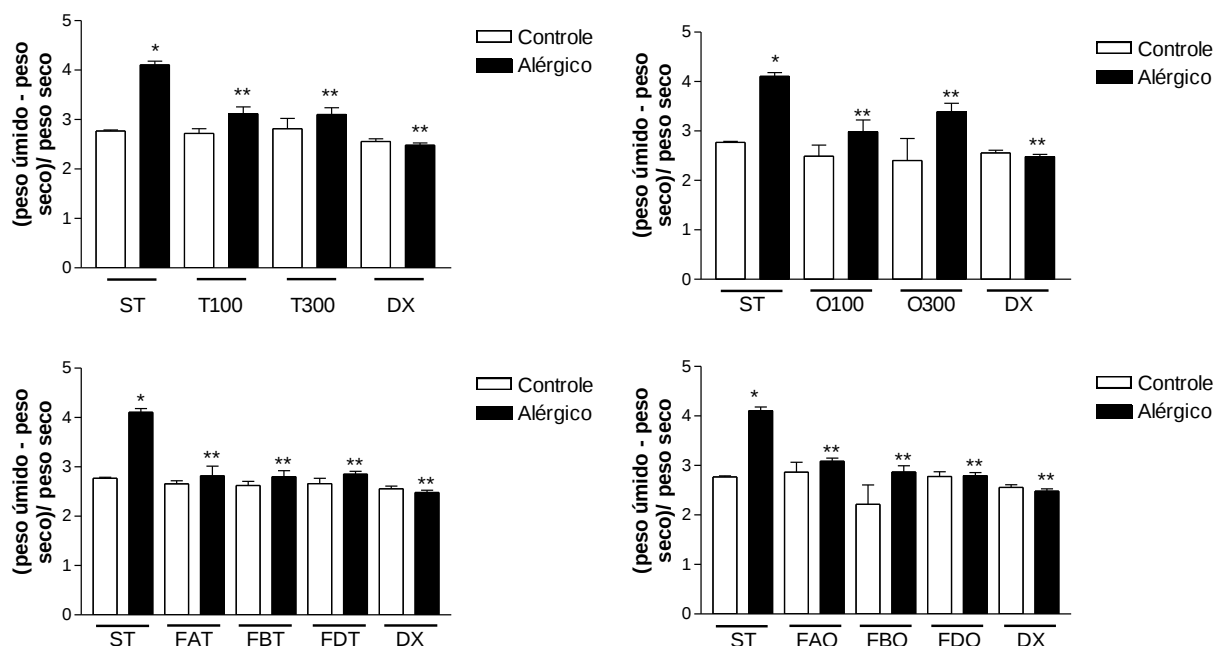


Figura 36 – Avaliação do edema intestinal. Camundongos BALB/c sensibilizados (alérgicos) ou não (controles), receberam ou não tratamento na ração (ST: sem tratamento; T100: extrato bruto *D. Trifida* dose 100mg/kg/dia; T300: extrato bruto *D. trifida* dose 300mg/kg/dia; O100: extrato bruto *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; O300: extrato bruto *D. opposita* dose 300mg/kg/dia; FAT: fração aquosa de *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FAO: fração aquosa de *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FBO: fração butanol *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FDO: fração diclorometano *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; DX: dexametasona dose 0,4mg/kg/dia). Tratamentos iniciaram no dia -1, a sensibilização ocorreu dia 0, o reforço no dia 14 e no dia 21 ao dia 28 todos receberam solução de OVA a 20% na mamadeira. As barras representam a média (+/- EPM) dos valores de cada grupo obtidos pela fórmula [(peso úmido – peso seco) / peso seco]. N= 5 animais/grupo. *P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle (OVA-); **P<0,05 em relação ao grupo alérgico ST (OVA+).

Na reação alérgica, a ligação de OVA com IgE específica para OVA ligada a superfície dos mastócitos leva a liberação de grânulos de mediadores. Entre estes mediadores estão a histamina e a citocina TNF- α , que geram aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo local. A vasodilatação está relacionada ao aumento da permeabilidade vascular, permitindo que os leucócitos acessem o local da lesão (BINGHAM & AUSTEN, 2000). Isso ocasiona o extravasamento de proteínas (como a albumina) e líquido para o interstício (GUO et al. 2009). Proteínas plasmáticas

exsudadas aumentam a pressão oncótica intersticial, favorecendo a retenção de água fora dos vasos. A circulação linfática encontra-se sobrecarregada, e seus vasos, comprimidos ou deformados pelo exsudato, perdem a eficiência da drenagem, agravando a retenção de água no interstício. Tudo isso, portanto, contribui para a formação do edema inflamatório (BRASILEIRO-FILHO, 2006).

A histamina estimula as células endoteliais a sintetizarem relaxantes vasculares para as células dos músculos lisos, como o óxido nítrico (NO), que provoca vasodilatação. Em estado fisiológico, o óxido nítrico tem papel protetor, mas sob condições de produção exacerbada, como no processo inflamatório, pode provocar danos teciduais através da reação com superóxidos para formar peroxinitrito (GAUT et al., 2002). Inibidores da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) são capazes de reduzir a inflamação em vários estudos, sugerindo que a iNOS pode contribuir para a inflamação intestinal (TEWTRAKUL & ITHARAT, 2007).

Os animais tratados com EBT apresentaram diminuição do edema nas duas doses propostas de 100mg/kg/dia (23%) e 300mg/kg/dia (24%), assim como os animais tratados com as doses de 100mg/kg/dia (27%) e 300mg/kg/dia (17%) de EBO ($p < 0,05$). Todas as frações também atuaram na inibição do edema, sendo essa diminuição de 31% com FAT, 32% com FBT, 30% com FDT, 25% com FAO, 30% com FBO e 32% com FDO. Nenhuma das amostras testadas foi tão potente quanto DX, que promoveu uma diminuição de 39%, quando comparado aos animais alérgicos ST. Uma das possibilidades é que a diminuição do edema intestinal pelas espécies de inhame testadas seja devida à alantoína, presente em EBT e EBO e nas frações FAT. FBT, FAO e FBO, conforme seus cromatogramas em CLAE. A alantoína foi relacionada à diminuição da inflamação das vias respiratórias em um modelo experimental de asma induzida por OVA (LEE et al., 2010). Estes dados estão de acordo com o estudo de OLAYEMI & AJAIYEOBA (2007) que correlacionaram a atividade antiedematogênica do extrato bruto de *Dioscorea esculenta* à presença de alantoína. Os perfis em CLAE de EBT, EBO e suas frações também apresentaram um grupo de substâncias fenólicas, com capacidade antioxidante (flavonóides e chalconas). A presença dessas substâncias pode estar relacionada à diminuição das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, geradas na inflamação (VANNUCCHI et al., 1998; BARREIROS et al., 2006). HOU et al. (2001), por exemplo, demonstrou uma atividade antioxidante *in vitro*

da espécie *D. batatas* (sin. *D. opposita*). Em outro estudo, YANG et al. (2009), também observaram a atividade antioxidante de compostos fenólicos de *D. opposita*.

Outra possibilidade para a diminuição do edema intestinal é a presença de diosgenina e outras sapogeninas em EBT, EBO, FDT e FDO conforme observado em seu perfil de CLAE. HUANG et al. (2009), por exemplo, demonstraram que diosgenina atua na diminuição da produção de IgE anti-OVA e do infiltrado inflamatório do intestino de camundongos BALB/c alérgicos, levando a diminuição do edema. Este resultado está de acordo com os estudos realizados por TEWTRAKUL & ITHARAT (2006; 2007) em que extratos brutos das espécies *D. membranaceae* e *D. birmania*, com presença de sapogeninas em sua constituição, foram capazes de inibir a produção de NO (possivelmente por inibir a iNOS) e TNF- α . Essa inibição de NO e TNF- α pode estar relacionada à diminuição do edema intestinal.

4.8. Avaliação do número de mastócitos na submucosa intestinal

Com o objetivo de avaliar se os inhames também atuariam na diminuição do edema por outra via, foi analisado se os extratos e frações de *D. trifida* e *D. opposita* atuariam no infiltrado de mastócitos na submucosa do epitélio intestinal, por serem células importantes na resposta imediata e tardia da alergia. No grupo alérgico ST, a contagem de mastócito na submucosa intestinal teve um aumento significativo ($p < 0,05$) quando comparado ao respectivo grupo controle. Os animais alérgicos tratados com as doses T100, T300, FAT, FBT, FDT O100, O300, FBO e FDO tiveram sua contagem de mastócitos diminuída quando comparados aos animais alérgicos do grupo ST ($p < 0,05$). Já os animais tratados com a fração FAO, não apresentaram diminuição estatisticamente significativa do número de mastócitos ($p = 0,0556$) quando comparado ao grupo ST (Figura 37).

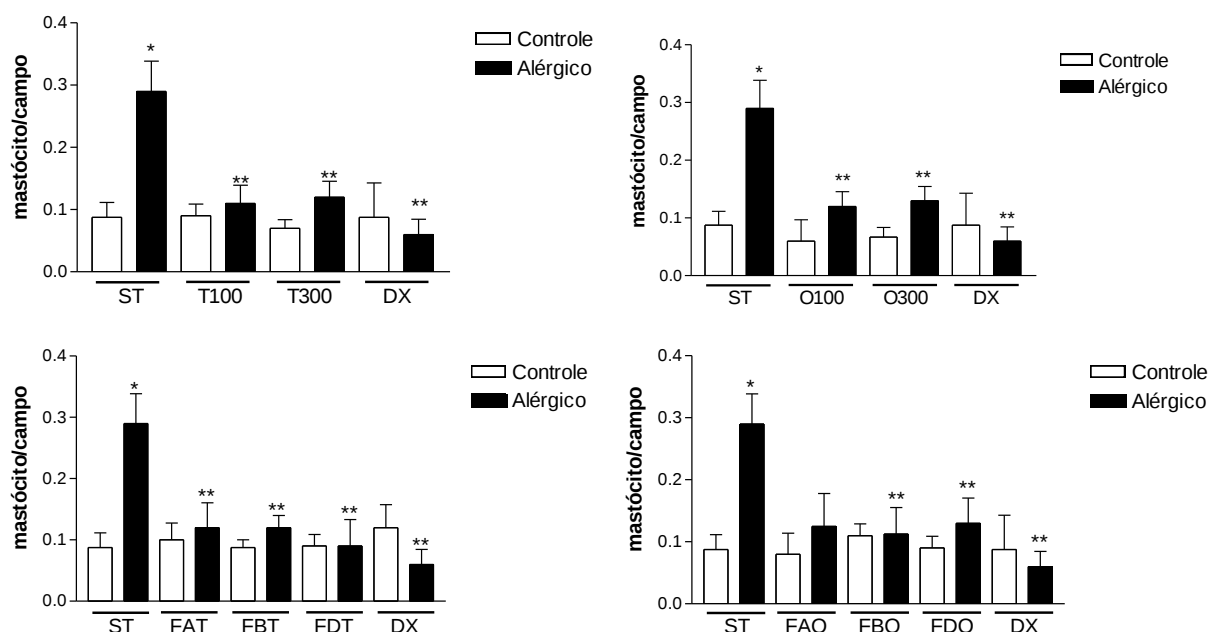


Figura 37 – Infiltrado de mastócitos na submucosa intestinal. Camundongos BALB/c sensibilizados (alérgicos) ou não (controles), receberam ou não tratamento na ração (ST: sem tratamento; T100: extrato bruto *D. Trifida* dose 100mg/kg/dia; T300: extrato bruto *D. trifida* dose 300mg/kg/dia; O100: extrato bruto *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; O300: extrato bruto *D. opposita* dose 300mg/kg/dia; FAT: fração aquosa de *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FAO: fração aquosa de *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FBO: fração butanol *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FDO: fração diclorometano *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; DX: dexametasona dose 0,4mg/kg/dia). Tratamentos iniciaram no dia -1, a sensibilização ocorreu dia 0, o reforço no dia 14 e no dia 21 ao dia 28 todos receberam solução de OVA a 20% na mamadeira. As barras representam a média ($\pm$ EPM) dos valores de cada grupo pela contagem de mastócitos hiperplásicos na submucosa (20 campos aleatórios). N= 5 animais/grupo. *P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle (OVA-); **P<0,05 em relação ao grupo alérgico ST (OVA+).

Os mastócitos são células altamente especializadas e são residentes proeminentes dos tecidos mucosos e epiteliais. Eles são ativados quando os antígenos fazem ligações cruzadas com a IgE ligada em seus receptores específicos de membrana. A degranulação ocorre em segundos, liberando uma série de mediadores inflamatórios pré-formados (YU & PERDUE, 2001). Esses mediadores produzem um aumento imediato do fluxo sanguíneo local e permeabilidade vascular, gerando o edema (CARA et al., 2004).

A contagem destas células em lâminas histológicas coradas pelo azul de toluidina (grânulos metacromáticos diferenciam esta célula das outras estruturas presentes na

lâmina) mostrou que os animais alérgicos tratados com as duas doses de EBT e EBO apresentaram diminuição do número de mastócitos na submucosa do epitélio intestinal. As frações FAT, FBT e FDT também apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$). Já das frações oriundas de EBO, apenas FBO e FDO apresentaram diminuição significativa do número de mastócitos. HUANG et al. em 2009 observaram a diminuição do infiltrado de mastócitos e de sua degranulação no TGI de animais alérgicos a OVA quando tratados com diosgenina. Este dado pode explicar a diminuição do número de mastócitos promovido por EBT, EBO FDT e FDO. Entretanto a diminuição do número de mastócitos por FAT não pode ser explicada por este fato, por não apresentar diosgenina em sua composição. Nota-se que FAO apresentou tendência a diminuição do número de mastócitos (com $p = 0,0556$). Talvez, com o aumento do número de animais esta diminuição se mostraria significativa, como foi a diminuição por FAT. LEE et al. observaram o efeito anti-inflamatório da alantoína, que é presente em FAT, com diminuição do infiltrado total de células inflamatórias, mas não citaram especificamente os mastócitos (2010). FAT pode estar atuando devido a presença de outras substâncias fenólicas também presentes em sua composição.

4.9. Quantificação de peroxidase eosinofílica (EPO) na mucosa intestinal

A Figura 38 representa o resultado obtido na quantificação da peroxidase eosinofílica na mucosa intestinal. Observa-se que todos os tratamentos foram capazes de diminuir o infiltrado de eosinófilos quando comparado ao grupo ST.

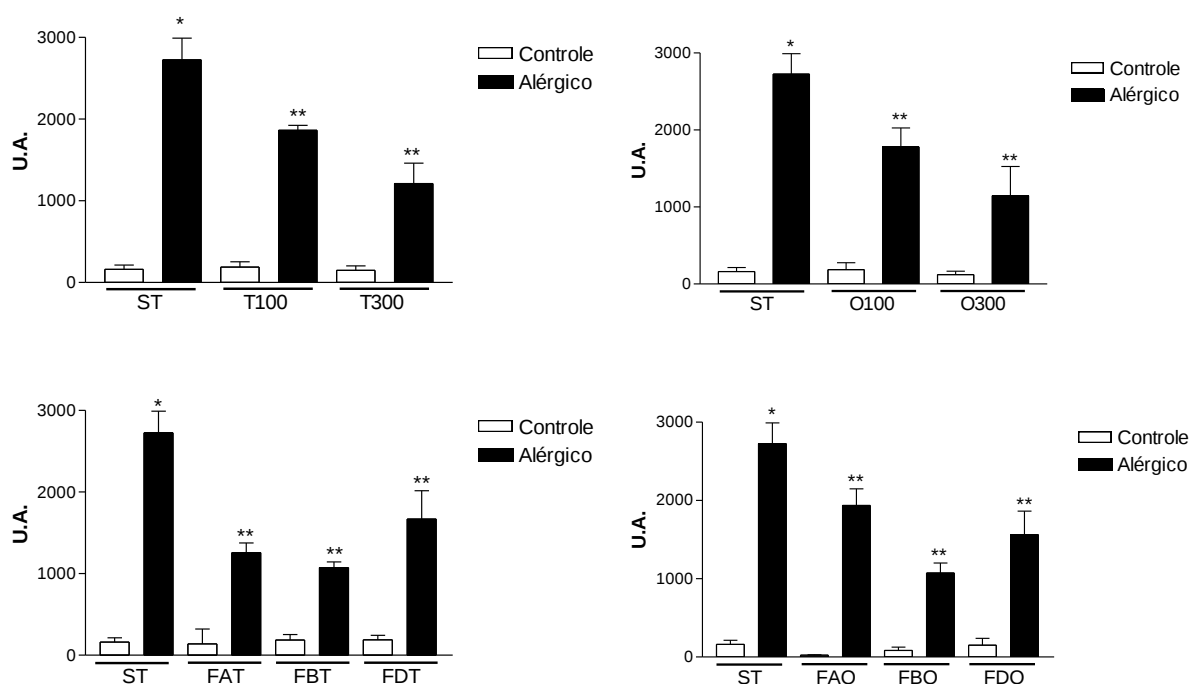


Figura 38 – Quantificação da peroxidase eosinofílica no jejuno distal. Camundongos BALB/c sensibilizados (alérgicos) ou não (controles), receberam ou não tratamento na ração (ST: sem tratamento; T100: extrato bruto *D. Trifida* dose 100mg/kg/dia; T300: extrato bruto *D. trifida* dose 300mg/kg/dia; O100: extrato bruto *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; O300: extrato bruto *D. opposita* dose 300mg/kg/dia; FAT: fração aquosa de *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FAO: fração aquosa de *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FBO: fração butanol *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FDO: fração diclorometano *D. opposita* dose 100mg/kg/dia. Tratamentos iniciaram no dia -1, a sensibilização ocorreu dia 0, o reforço no dia 14 e no dia 21 ao dia 28 todos receberam solução de OVA a 20% na mamadeira. As barras representam a média ($\pm$ EPM) dos valores de cada grupo e os resultados expressos em unidades arbitrárias (U.A). N= 5 animais/grupo. *P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle (OVA-); **P<0,05 em relação ao grupo alérgico ST (OVA+).

Em doenças alérgicas crônicas, os eosinófilos são ativados e atraídos para a mucosa intestinal via IL-5 e eotaxina (BAE et al., 1999). Essas células são responsáveis pela fase tardia da reação alérgica imediata, produzindo proteína básica e outras substâncias que são tóxicas ao epitélio (CARA et al., 2000). Estas células têm dois tipos de funções efetoras: em primeiro lugar, elas liberam proteínas altamente tóxicas e radicais livres de seus grânulos, que podem matar parasitos, mas também produzir lesão tecidual significativa nas reações alérgicas; em segundo lugar, eosinófilos produzem moléculas, incluindo prostaglandinas, leucotrienos e citocinas, que

amplificam a resposta inflamatória, recrutando e ativando mais eosinófilos e leucócitos (HOGAN, et al. 2008; ROTHENBERG et al., 2001). No local da lesão, os eosinófilos liberam uma abundância de mediadores altamente citotóxicos e pró-citotóxicos, como a proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica e peroxidase, contribuindo para a fase tardia da reação que ocorre três a doze horas depois da degranulação dos mastócitos (HOLGATE & POLOSA, 2008). SALDANHA et al. (2004), observaram uma maior infiltração de eosinófilos na mucosa intestinal de camundongos alérgicos, tendo início após 6 horas de desafio e mantendo-se até três semanas (SALDANHA, 2004). Foi avaliado, então, se a ação antiedematogênica dos extratos e frações de inhame poderia ter sido causada pela diminuição de células inflamatórias que utilizam como enzima a peroxidase e que poderiam causar lesão endotelial.

Com o objetivo de verificar se os extratos brutos e frações de inhame atuavam no recrutamento de eosinófilos foi dosado a peroxidase eosinofílica (EPO), já que esta enzima reflete indiretamente a quantidade destas células. Animais tratados com as doses 100 e 300mg/kg/dia de EBT, EBO e suas respectivas frações aquosa, butanol e diclorometano mostraram redução de EPO. Este dado também foi encontrado por LEE et al. (2010), em que animais com inflamação respiratória induzida com OVA tratados com alantoína tiveram redução no infiltrado de células inflamatórias, entre elas, os eosinófilos, no lavado broncoalveolar. A análise histológica de tecido pulmonar também mostrou esta mesma redução. Como já citado, a IL-5 está envolvida no recrutamento de eosinófilos no sítio da lesão. LEE et al. (2010) demonstraram que o nível de IL-5 estava diminuído nos animais tratados com alantoína, podendo ser este o mecanismo de atuação da diminuição do número de eosinófilos nos animais alérgicos tratados com as frações de inhame, que apresentam alantoína em sua composição.

4.10. Quantificação do muco intestinal pela coloração P.A.S.

A análise do muco produzido pelas células caliciformes da porção do jejuno distal do intestino delgado foi realizada através da coloração dos cortes histológicos por P.A.S, referência para mucinas neutras. A área das células caliciformes foi determinada através de morfometria, utilizando o software ImageJ. Nos animais alérgicos tratados

com as duas doses de extrato bruto de *D. trifida*, T100 e T300, a redução da produção de muco foi de 33% e 31% respectivamente. Já as frações FAT, FBT e FDT promoveram redução de 22%, 20% e 31%. As duas doses de extrato bruto de *D. opposita*, O100 e O300 e a fração FDO reduziram a produção de muco em 22%, 26% e 20%, respectivamente. Nos animais alérgicos tratados com as frações FAO e FBO, por sua vez, não houve diminuição significativa ($p>0,05$) na produção de muco quando comparado ao grupo alérgico ST (Figura 39). Nenhum dos extratos e frações testadas apresentaram diminuição como DX, que foi de 38%. As Figuras 40 e 41 apresentam as imagens obtidas da avaliação histológica do muco neutro produzido pelas células caliciformes do intestino delgado dos camundongos tratados com os extratos e frações de *D. trifida* e *D. opposita*.

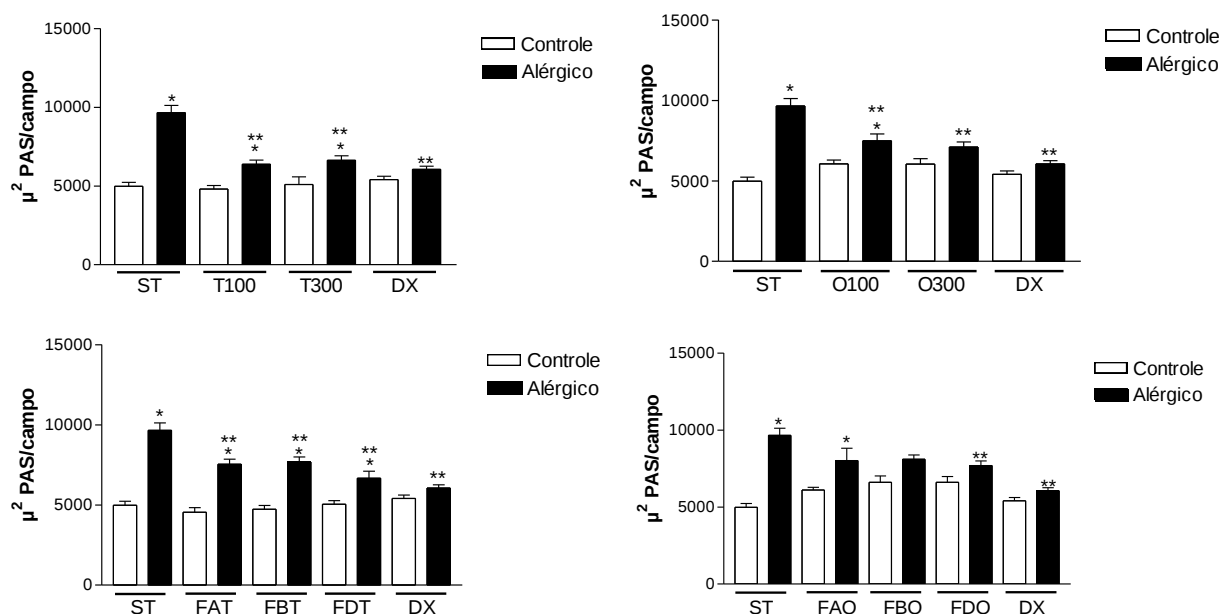
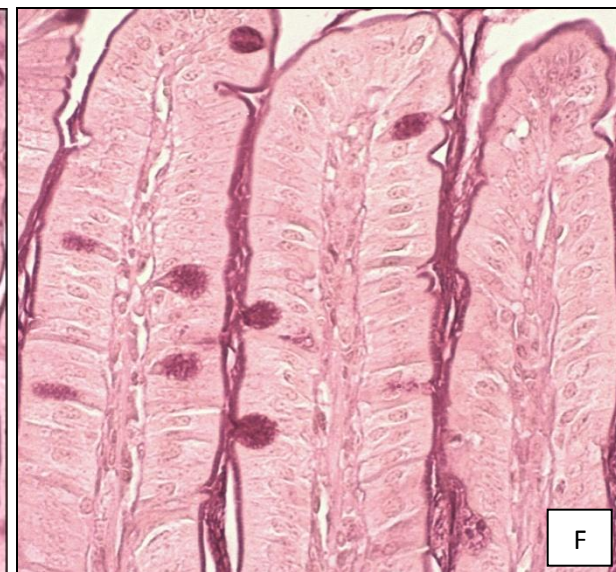
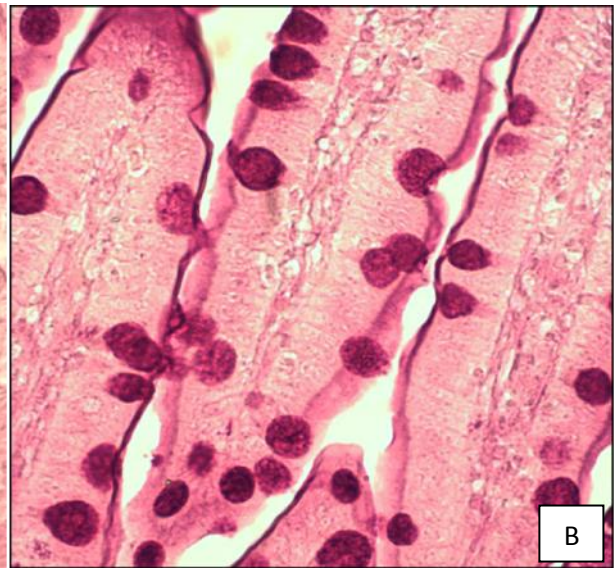
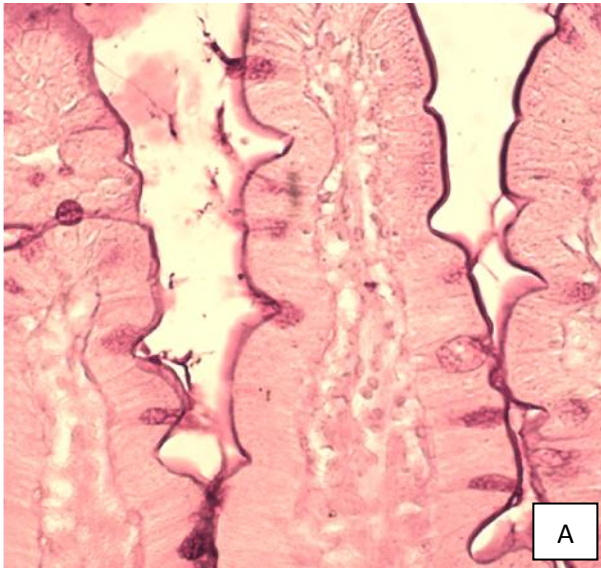
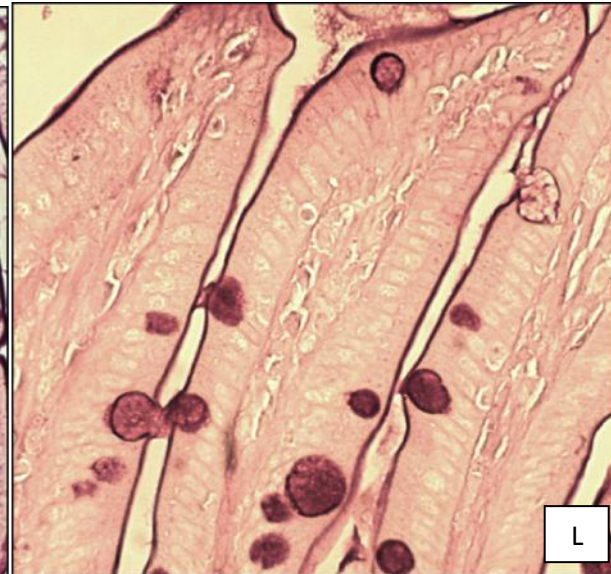
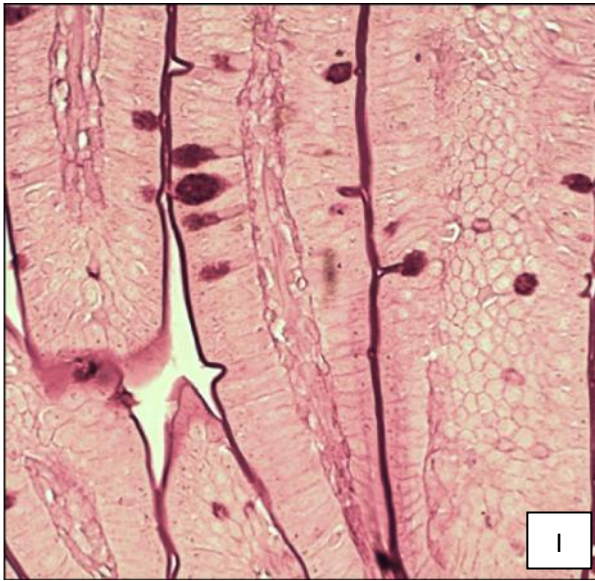
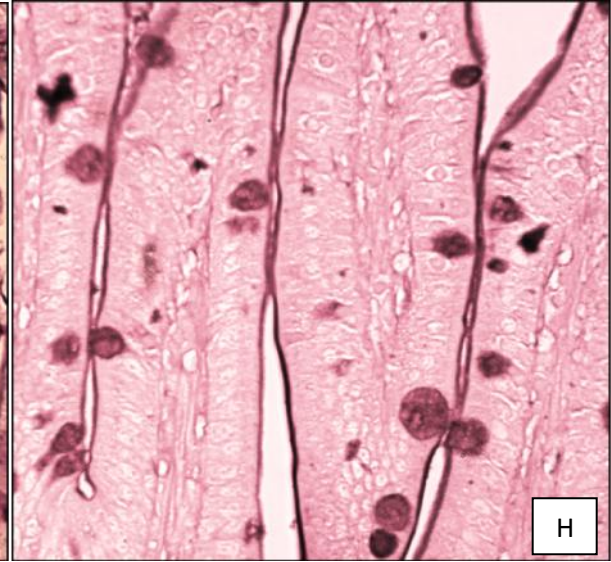
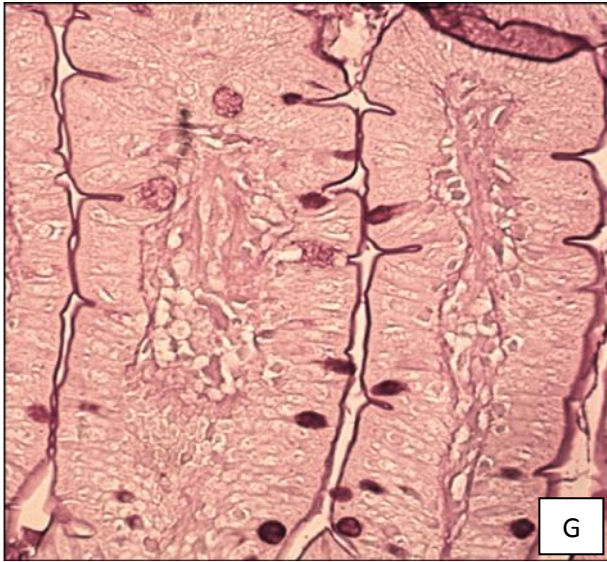


Figura 39 – Avaliação do muco produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongos BALB/c evidenciado pela coloração de PAS. Camundongos BALB/c sensibilizados (alérgicos) ou não (controles), receberam ou não tratamento na ração (ST: sem tratamento; T100: extrato bruto *D. Trifida* dose 100mg/kg/dia; T300: extrato bruto *D. trifida* dose 300mg/kg/dia; O100: extrato bruto *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; O300: extrato bruto *D. opposita* dose 300mg/kg/dia; FAT: fração aquosa de *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FAO: fração aquosa de *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FBO: fração butanol *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FDO: fração diclorometano *D. opposita* dose 100mg/kg/dia. Tratamentos iniciaram no dia -1, a sensibilização ocorreu dia 0, o reforço no dia 14 e no dia 21 ao dia 28 todos receberam solução de OVA a 20% na mamadeira. As barras representam a média ($\pm$ EPM) dos valores de cada grupo e os resultados foram analisados 3 campos aleatórios do jejuno distal morfometricamente. N= 5 animais/grupo. *P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle (OVA-); **P<0,05 em relação ao grupo alérgico ST (OVA+). Aumento de 40X.





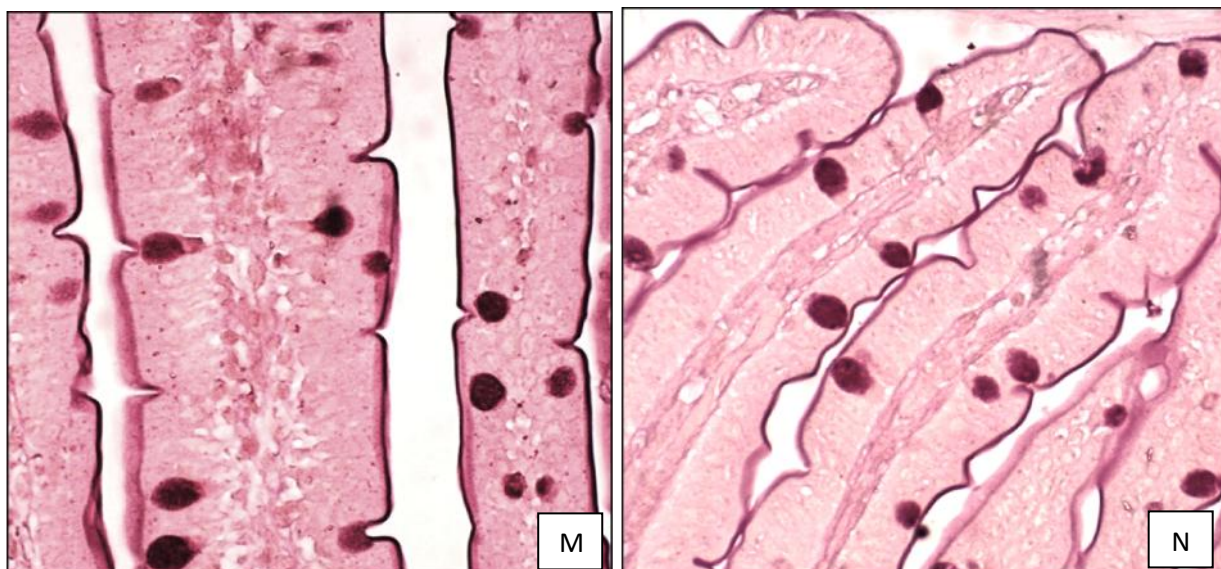
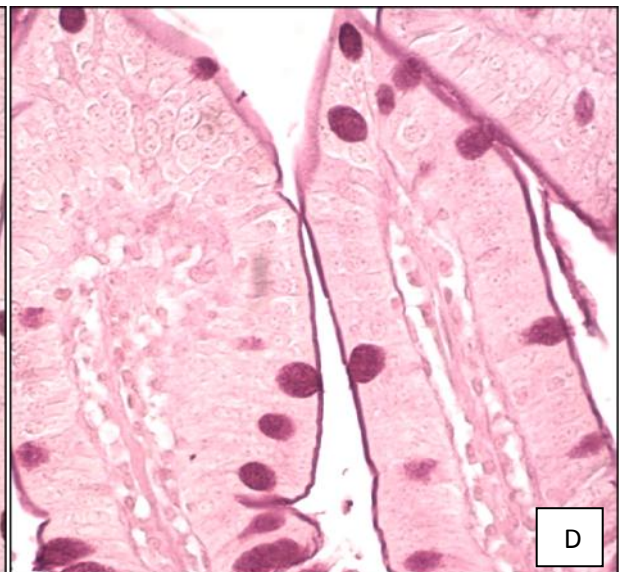
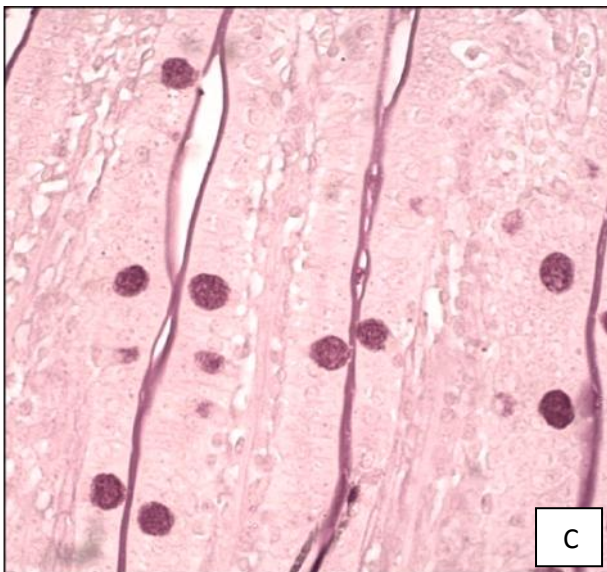
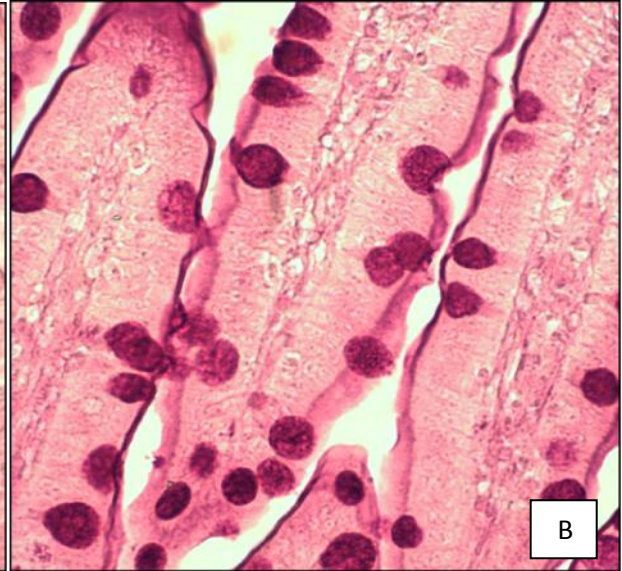
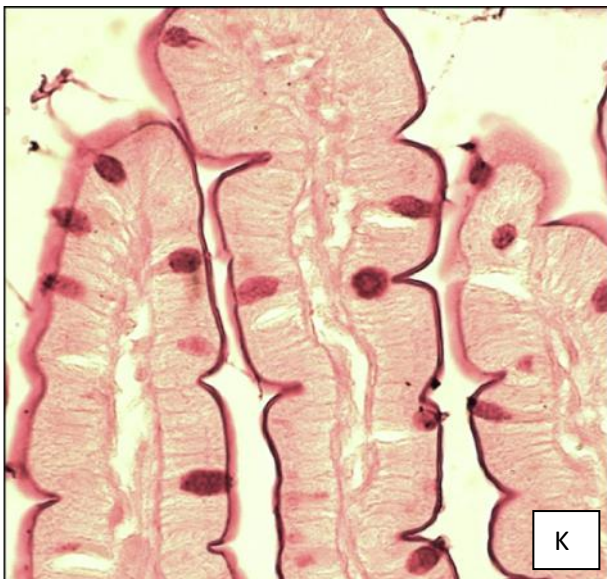
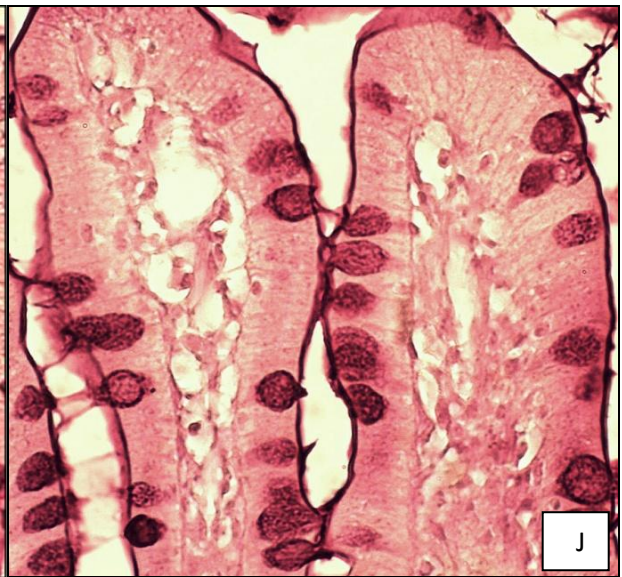
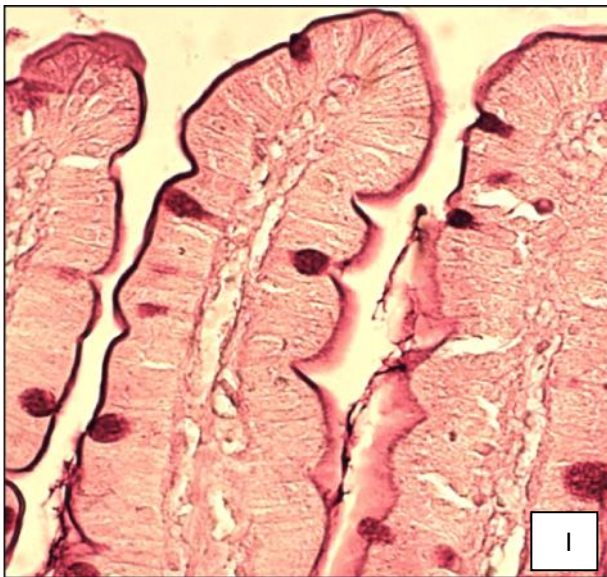
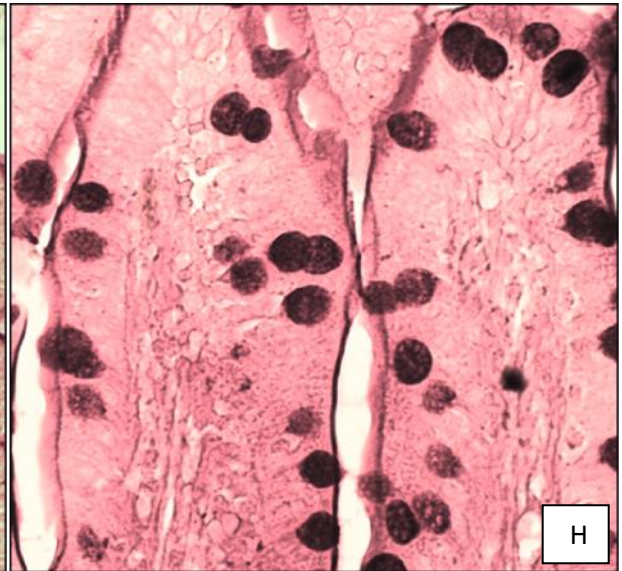
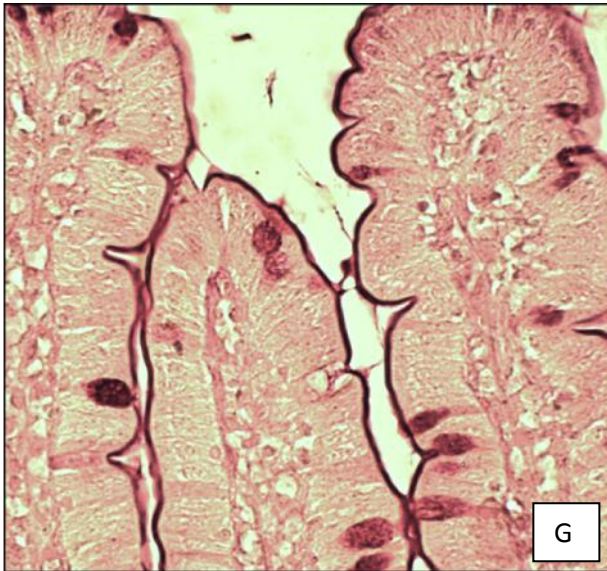


Figura 40 – Avaliação histológica do muco neutro produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongo BALB/c tratados com *D. trifida*. Camundongos BALB/c sensibilizados (alérgicos) ou não (controles), receberam ou não tratamento na ração (ST: sem tratamento; T100: extrato bruto *D. Trifida* dose 100mg/kg/dia; T300: extrato bruto *D. trifida* dose 300mg/kg/dia; FAT: fração aquosa de *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; DX: dexametasona dose 0,4mg/kg/dia). Tratamentos iniciaram no dia -1, a sensibilização ocorreu dia 0, o reforço no dia 14 e no dia 21 ao dia 28 todos receberam solução de OVA a 20% na mamadeira. Após desafio, o intestino delgado foi coletado e o muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado através de coloração por P.A.S. A: camundongo BALB/c controle ST; B: camundongo BALB/c alérgico ST; C: camundongo BALB/c controle T100; D: camundongo BALB/c alérgico T100; E: camundongo BALB/c controle T300; F: camundongo BALB/c alérgico T300; G: camundongo BALB/c controle FAT; H: camundongo BALB/c alérgico FAT; I: camundongo BALB/c controle FBT; J: camundongo BALB/c alérgico FBT; K: camundongo BALB/c controle FDT; L: camundongo BALB/c alérgico FDT; M: camundongo BALB/c controle DX; N: camundongo BALB/c alérgico DX. Aumento de 40X.





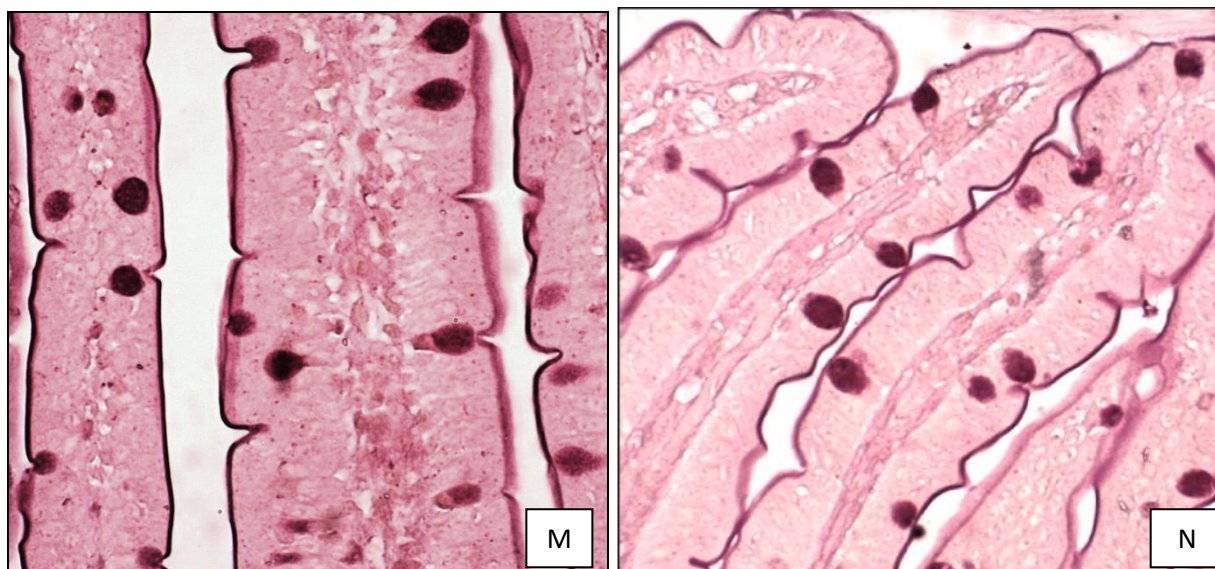


Figura 41 – Avaliação histológica do muco neutro produzido pelas células caliciformes do intestino delgado de camundongo BALB/c tratados com *D. opposita*. Camundongos BALB/c sensibilizados (alérgicos) ou não (controles), receberam ou não tratamento na ração (ST: sem tratamento; O100: extrato bruto *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; O300: extrato bruto *D. opposita* dose 300mg/kg/dia; FAT: fração aquosa de *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; DX: dexametasona dose 0,4mg/kg/dia). Tratamentos iniciaram no dia -1, a sensibilização ocorreu dia 0, o reforço no dia 14 e no dia 21 ao dia 28 todos receberam solução de OVA a 20% na mamadeira. Após desafio, o intestino delgado foi coletado e o muco produzido pelas células caliciformes foi quantificado através de coloração por P.A.S. A: camundongo BALB/c controle ST; B: camundongo BALB/c alérgico ST; C: camundongo BALB/c controle O100; D: camundongo BALB/c alérgico O100; E: camundongo BALB/c controle O300; F: camundongo BALB/c alérgico O300; G: camundongo BALB/c controle FAO; H: camundongo BALB/c alérgico FAO; I: camundongo BALB/c controle FBO; J: camundongo BALB/c alérgico FBO; K: camundongo BALB/c controle FDO; L: camundongo BALB/c alérgico FDO; M: camundongo BALB/c controle DX; N: camundongo BALB/c alérgico DX.

No modelo de alergia alimentar utilizado (SALDANHA et al., 2004), células caliciformes do intestino delgado dos camundongos apresentam aumento da produção de muco. Este fato ocorreu com os animais alérgicos do grupo ST, que apresentaram aumento da produção de muco de forma significativa ($p < 0,05$). A hipersecreção de muco é uma característica nas alergias que ocorrem em mucosas, inclusive na alergia alimentar. Ela é induzida por IL-4 e IL-13 com a função de proteger o intestino, ao limitar a absorção de antígenos (SALDANHA et al. 2004; DOURADO et al. 2010).

HUANG et al. (2009) demonstraram a diminuição de muco pelas células caliciformes do TGI em animais alérgicos a OVA quando tratados com diosgenina. A presença de

diosgenina em EBT, EBO, FDT e FDO pode explicar a observada redução do muco. Já a inibição da produção de muco pelas frações FAT e FBT pode ser devida à presença de alantoína. LEE et al. (2010) observaram a diminuição da produção de muco pelas células caliciformes das vias respiratórias em animais alérgicos a OVA tratados com alantoína. Da mesma forma, a diminuição de muco observada com o tratamento com EBT e EBO pode ser justificada pela presença de alantoína em sua composição. Conforme citado anteriormente, a IL-4 está envolvida na hiperplasia e hipertrofia das células caliciformes (BLANCHARD et al., 2004, DOURADO et al., 2010). HUANG et al. (2009) observaram que a diosgenina atenua a produção de IL-4, podendo ser este o mecanismo de ação da diminuição de muco pelas células caliciformes pelos extratos e frações de inhame testados. Outro estudo que corrobora esta suposição é o de LEE et al. (2010) em que a administração de alantoína diminuiu a produção dessa mesma citocina. Foi detectado níveis reduzidos no líquido broncoalveolar e do *mRNA* de IL-4 no tecido pulmonar. Entretanto, outras substâncias encontradas nas espécies de Dioscoreaceae também podem estar envolvidas nesta diminuição de IL-4 e, portanto da produção de muco. No estudo de OH & LIM (2009) foi demonstrado, por exemplo, que glicoproteínas obtidas de *D. batatas* (sin. *D. opposita*) apresentaram inibição da produção desta citocina *in vitro*, podendo ser esta a via de atuação da inibição da produção de muco pelas células caliciformes. No estudo de TEWTRAKUL & ITHARAT (2006), substâncias isoladas de *D. membranacea* (fenatraquinonas e naftofuranoxepinas) também apresentaram diminuição de IL-4.

4.11. Avaliação da gordura corporal pela variação do peso (delta)

Os grupos tratados tiveram aumento do peso do início do tratamento até a semana do desafio oral, exceto os animais controle e alérgico do grupo O300, que apresentaram leve perda de peso gradual durante as 4 semanas de tratamento. Já os animais controle e alérgico do grupo DX mantiveram o peso durante todo o tratamento.

Os tratamentos com T100, T300, O100, FAT, FBT, FDT, FAO, FBO e FDT não inibiram a perda de peso durante a semana do desafio oral, mas o delta se manteve positivo. Os animais alérgicos e controles do tratamento com O300 apresentaram delta

negativo, ou seja, ao final do experimento estavam pesando menos do que quando iniciaram (Figura 42).

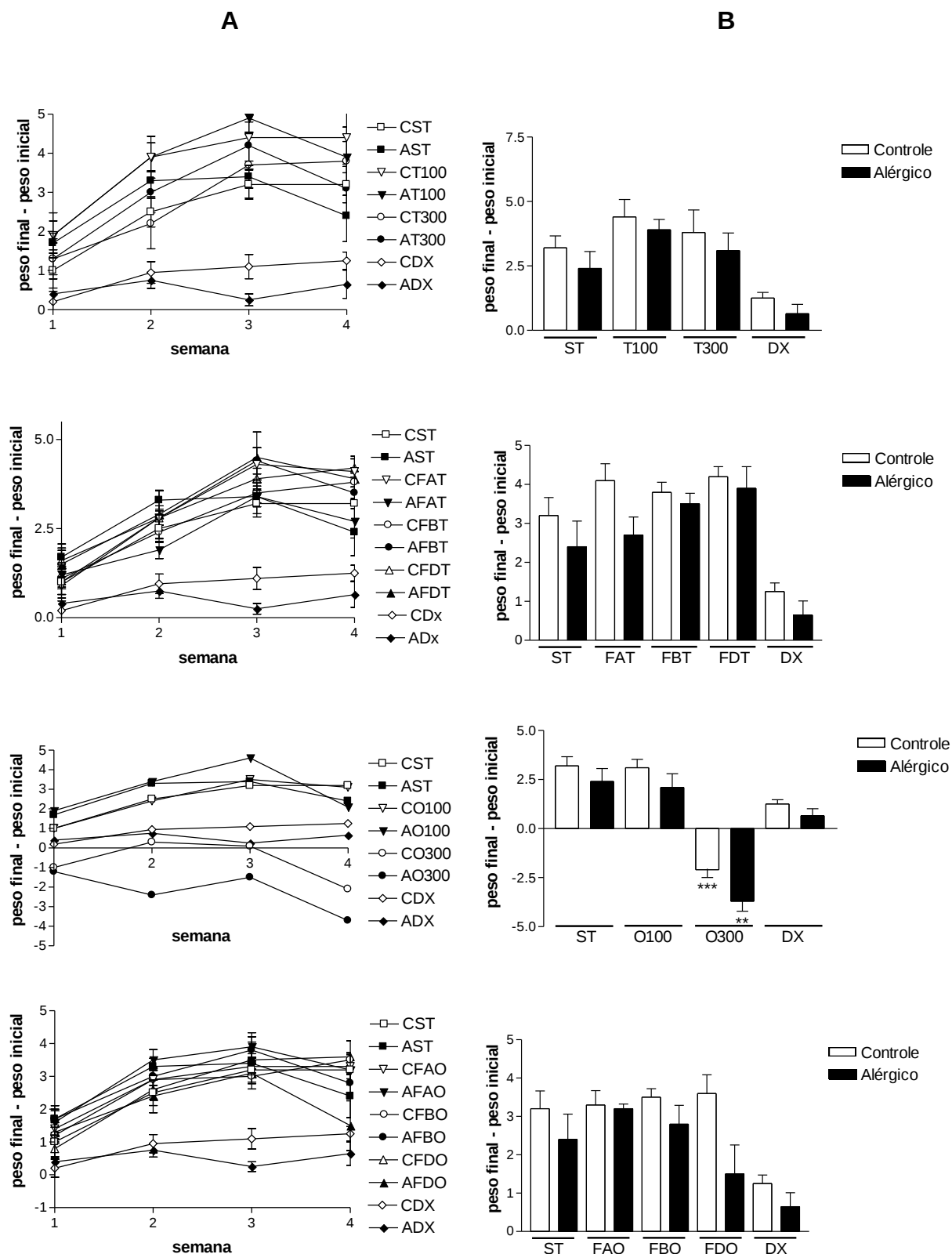


Figura 42 – Avaliação do peso corpóreo. Camundongos BALB/c sensibilizados (alérgicos) ou não (controles), receberam ou não tratamento na ração (ST: sem tratamento; T100: extrato

bruto *D. Trifida* dose 100mg/kg/dia; T300: extrato bruto *D. trifida* dose 300mg/kg/dia; O100: extrato bruto *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; O300: extrato bruto *D. opposita* dose 300mg/kg/dia; FAT: fração aquosa de *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FAO: fração aquosa de *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FBO: fração butanol *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FDO: fração diclorometano *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; DX: dexametasona dose 0,4mg/kg/dia). Tratamentos iniciaram no dia -1, a sensibilização ocorreu dia 0, o reforço no dia 14 e no dia 21 ao dia 28 todos receberam solução de OVA a 20% na mamadeira. A: Variação do peso durante todo o experimento. B: Delta da semana do desafio. As barras representam a média ($\pm$ EPM) dos valores de cada grupo pesados os dias avaliados (-1 ao 28), utilizando a fórmula (peso final- peso inicial). N= 5 animais/grupo. (↓) Semana do desafio oral. *P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle (OVA-); **P<0,05 em relação ao grupo alérgico ST (OVA+); ***P<0,05 em relação ao grupo controle ST (OVA-).

No estudo de JAN et al. (2007), animais alérgicos tratados com diosgenina 200mg/kg/dia e 400mg/kg/dia foram avaliados quanto a perda de peso durante o tratamento. Os autores não encontraram diferenças significativas no peso dos animais tratados com diosgenina, quando comparados aos animais ST ($p>0,05$). Isso indica que diosgenina não promove perda de peso. Conforme discutido anteriormente, a diminuição do peso corporal, observada em O300, pode ser devido à diminuição do consumo de ração suplementada como consequência à aversão ao gosto da ração.

4.12. Avaliação da perda da gordura corporal pelo peso da gordura periuterina

Conforme citado anteriormente, o delta de peso dos grupos alérgicos não apresentou redução significativa ($P>0,05$) do peso na semana do desafio oral, exceto para o grupo O300. Para avaliar se a não perda de peso corpóreo dos animais alérgicos estava sendo mascarada por uma possível retenção de líquido, como ocorre quando animais da linhagem C57/BL6 são sensibilizados com OVA (MOREIRA, 2006), foi feita uma avaliação do peso da gordura periuterina.

Na Figura 43 pode ser observado que não houve perda significativa ($p>0,05$) da gordura periuterina em nenhum dos grupos tratados, com exceção do grupo O300. Este resultado indica que não houve retenção de líquidos e os tratamentos não atuam gerando emagrecimento, com exceção do tratamento T300.

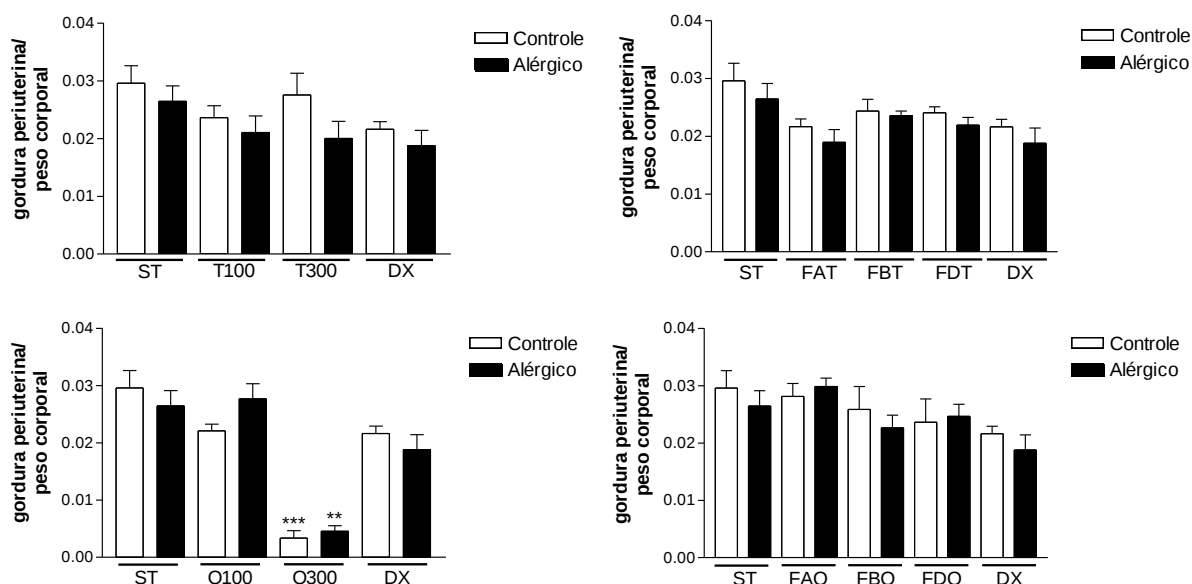


Figura 43 – Avaliação do deslocamento das reservas energéticas por visualização da perda de gordura periuterina. Camundongos BALB/c sensibilizados (alérgicos) ou não (controles), receberam ou não tratamento na ração (ST: sem tratamento; T100: extrato bruto *D. Trifida* dose 100mg/kg/dia; T300: extrato bruto *D. trifida* dose 300mg/kg/dia; O100: extrato bruto *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; O300: extrato bruto *D. opposita* dose 300mg/kg/dia; FAT: fração aquosa de *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FAO: fração aquosa de *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; DX: dexametasona dose 0,4mg/kg/dia). Tratamentos iniciaram no dia -1, a sensibilização ocorreu dia 0, o reforço no dia 14 e no dia 21 ao dia 28 todos receberam solução de OVA a 20% na mamadeira. As barras representam a média ($\pm$ EPM) dos valores de cada grupo da gordura periuterina pesada no dia 28 (eutanásia) e pela fórmula (peso da gordura/peso corporal). N= 5 animais/grupo. *P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle (OVA-); **P<0,05 em relação ao grupo alérgico ST (OVA+); ***P<0,05 em relação ao grupo controle ST (OVA-).

Conforme citado anteriormente, JAN et al. (2007) demonstraram que animais alérgicos tratados com diosgenina não apresentaram diferenças significativas na redução do peso, quando comparados aos animais ST ($p>0,05$).

A partir destes dados pode-se supor que a aversão ao gosto da ração levou a diminuição do consumo e gerou perda de peso corporal e da gordura periuterina dos animais do grupo O300.

4.13. Avaliação do peso do fígado

Para avaliar se os tratamentos com os extratos brutos e frações das espécies de *D. trifida* e *D. opposita* poderiam estar levando a algum dano hepático, foi avaliado o peso do fígado destes animais. A hepatotoxicidade pode ser verificada pelo peso do fígado, pois uma das primeiras manifestações da sua lesão é o acúmulo de gorduras, via inibição da secreção de triglicerídeos (CHAN et al., 2010).

Os resultados demonstram que não houve aumento do peso do fígado em nenhum dos tratamentos (Figura 44). O estudo anatomopatológico também não constatou alterações macroscópicas significativas no fígado dos animais sacrificados ao final do experimento (resultado não demonstrado).

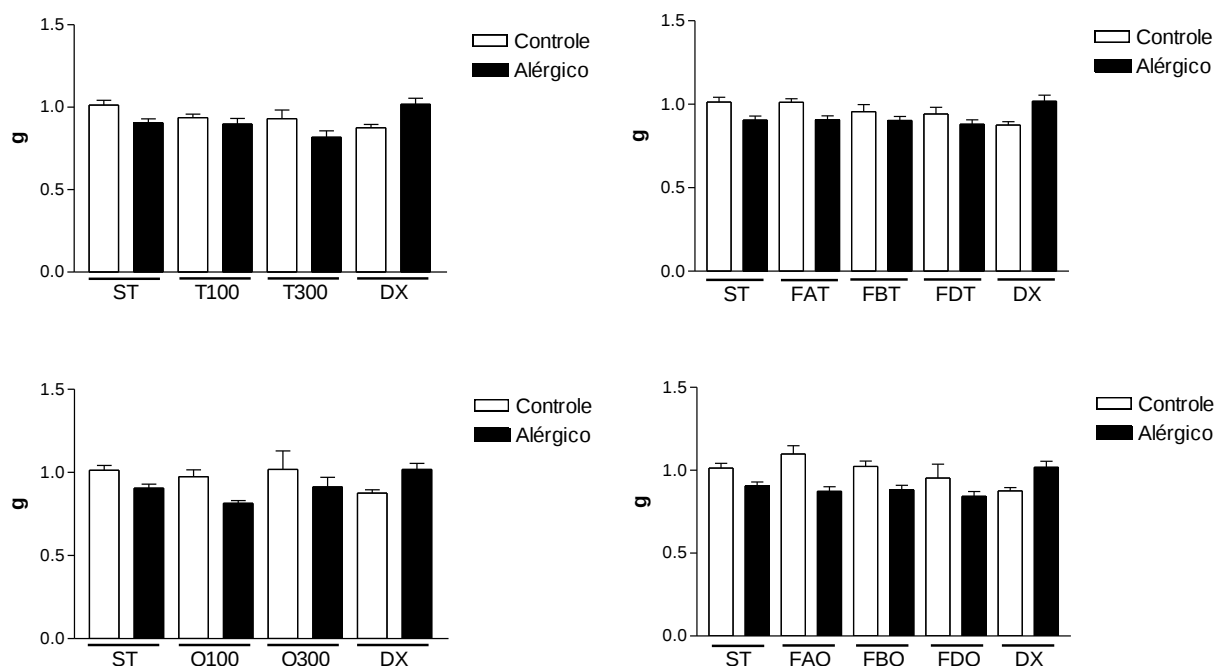


Figura 44 – Avaliação do peso do fígado. Camundongos BALB/c sensibilizados (alérgicos) ou não (controles), receberam ou não tratamento na ração (ST: sem tratamento; T100: extrato bruto *D. Trifida* dose 100mg/kg/dia; T300: extrato bruto *D. trifida* dose 300mg/kg/dia; O100: extrato bruto *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; O300: extrato bruto *D. opposita* dose 300mg/kg/dia; FAT: fração aquosa de *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FAO: fração aquosa de *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; DX: dexametasona dose 0,4mg/kg/dia). Tratamentos iniciaram no dia -1, a sensibilização ocorreu dia 0, o reforço no dia 14 e no dia 21 ao dia 28 todos receberam solução de OVA a 20% na mamadeira. As barras representam a média ($\pm$ EPM) dos valores de cada grupo do peso do fígado no dia 28 (eutanásia). N= 5 animais/grupo. *P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle (OVA-); **P<0,05 em relação ao grupo alérgico ST (OVA+); ***P<0,05 em relação ao grupo controle ST (OVA-).

A ausência de toxicidade está de acordo com estudo *in vivo* realizado por LEE et al. (2002) com o extrato bruto de *D. alata*. Eles demonstraram que, além de não ser tóxica, a planta apresenta efeito hepatoprotetor, preservando as funções do fígado frente à toxicidade induzida por paracetamol. Outro estudo *in vivo* também demonstrou o efeito hepatoprotetor de *D. alata* contra toxicidade induzida por tetracloreto de carbono. Este efeito foi relacionado à presença de substâncias fenólicas com capacidade antioxidante (CHAN et al., 2010). No estudo de LEE et al. (2010) em que animais alérgicos a OVA

receberam tratamento com alantoína, foram realizadas dosagens de marcadores de enzimas para determinar toxicidade ao fígado. Estes pesquisadores não detectaram nenhuma alteração no nível destes marcadores, indicando que a alantoína, presente em espécies de Dioscoreaceae, preserva as funções normais do fígado dos animais tratados. Extratos de *D. japonica* melhoraram os níveis de colesterol do fígado, conforme demonstrado por CHEN et al. (2003). Historicamente, os inhames são usados na China como protetor do fígado (FAROMBI et al., 2000). Exemplo disso é o medicamento chinês patenteado *Liu Wei Di Huang Wan*, composto por seis espécies vegetais, entre elas a *D. opposita*. Ele é usado tradicionalmente para o tratamento de diferentes enfermidades do fígado (ZHAO et al., 2007).

4.14. Índice esplênico

Na Figura 45 está demonstrada que não houve diminuição do peso relativo do baço dos animais tratados com os extratos brutos e frações de *D. trifida* e *D. opposita*.

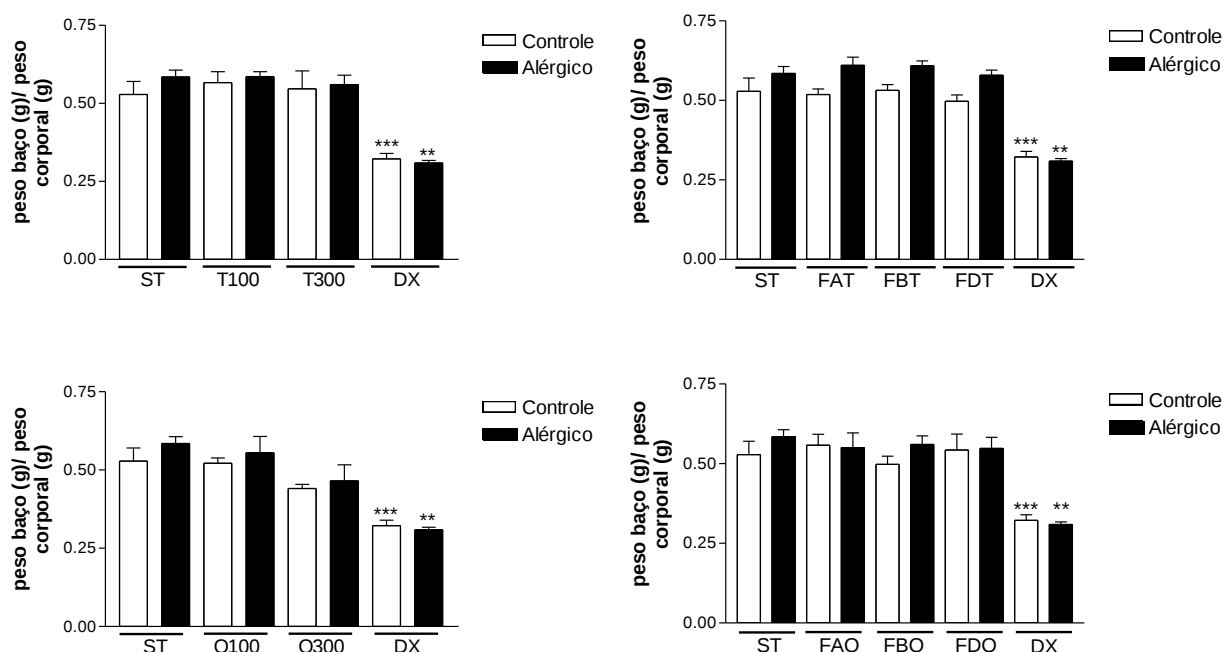


Figura 45 – Avaliação do índice esplênico. Camundongos BALB/c sensibilizados (alérgicos) ou não (controle), receberam ou não tratamento na ração (ST: sem tratamento; T100: extrato bruto *D. Trifida* dose 100mg/kg/dia; T300: extrato bruto *D. trifida* dose 300mg/kg/dia; O100: extrato bruto *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; O300: extrato bruto *D. opposita* dose 300mg/kg/dia; FAT: fração aquosa de *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FBT: fração butanol *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FDT: fração diclorometano *D. trifida* dose 100mg/kg/dia; FAO: fração aquosa de *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FBO: fração butanol *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; FDO: fração diclorometano *D. opposita* dose 100mg/kg/dia; DX: dexametasona dose 0,4mg/kg/dia). Tratamentos iniciaram no dia -1, a sensibilização ocorreu dia 0, o reforço no dia 14 e no dia 21 ao dia 28 todos receberam solução de OVA a 20% na mamadeira. As barras representam a média ($\pm$ EPM) dos valores de cada grupo do índice esplênico no dia 28 (eutanásia) calculado pela fórmula (peso baço/ peso corpóreo). N= 5 animais/grupo. *P<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle (OVA-); **P<0,05 em relação ao grupo alérgico ST (OVA+); ***P<0,05 em relação ao grupo controle ST (OVA-).

No estudo anatomopatológico não foram constatadas alterações macroscópicas significativas no baço, provenientes dos animais sacrificados ao final do experimento. Ao analisar o peso relativo do baço dos animais tratados com as duas espécies de inhame *D. trifida* e *D. opposita* e suas frações, não foram encontradas diferenças significativas quando comparado aos animais ST ($p>0,05$). Apenas os animais do grupo DX apresentaram redução significativa ($p<0,05$) do índice esplênico quando comparados aos animais do grupo ST. Este dado está de acordo com a literatura, que cita dentre os efeitos colaterais do uso de glicocorticóides, a redução no desenvolvimento do tecido linfóide, por possível redução da expansão clonal de linfócitos T e B (SCHACKE et al., 2004).

5. CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados revela que os inhames *D. trifida* e *D. opposita* contêm substâncias potencialmente ativas para o tratamento das alergias alimentares. Elas agem a partir da diminuição da inflamação dose-dependente, alterando os sinais clínicos observados em animais alérgicos. Os resultados confirmam o potencial dessas plantas como um possível agente nutracêutico para o tratamento da alergia alimentar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKORUDA, M.O. Genetic Improvement of vegetable crops: yam (*Dioscorea* spp.) In: KASLOO, M. (Ed.) *Genetic improvements of vegetable crops*. Pergamon Press, p. 717-733, 1984.
- AL-SHEHBAZ, I.A. & SHUBERT, B.G. The Dioscoreaceae in the Southeastern United States. *Jour. Arn. Arb.*, v.70, p 57-95, 1989.
- AMIRATO, P.V. Yams. In: AMIRATO, P. (Ed.) *Handbook of plant cell culture. Crop species*. Macmillan, New York, v.3, p. 327-354, 1984.
- ANDERSON, J.A. Milk, eggs and peanuts: food allergies in children. *Am Fam Physician*, v.56, n.5, p.1365-74, 1997.
- ARAI, S. Studies on functional foods in Japan - state of the art. *Biosci. Biotech. Bioch.*, v.60, n.1, p. 9-15, 1996.
- AYABE, T.; SATCHELL, D.P.; WILSON, C.L.; PARKS, W.C.; SELSTED, M.E.; OUELLETTE, A.J. Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nature Immunol.*, v.1, p.113-118, 2000.
- BAE, S.J.; TANAKA, HAKUGAWA, J.; KATAYAMA, I. Interleukin-5 involvement in ovalbumin-induced eosinophil infiltration in mouse food-allergy model. *J. Dermatol. Sci.*, v.21, n.1, p.1-7, 1999.
- BANNON, G.A. What makes a food protein an allergen? *Curr. Allergy Asthma Rep.*, v.4, p.43-46, 2004.
- BARREIROS, A.L.B.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Extresse oxidativa: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*, v.29, n.1, p.113-123, 2006.
- BERNSTEIN, J.A.; BERNSTEIN, L.I.; BUCCHINI, L.; GOLDMAN, L.R.; HAMILTON, R.G.; LEHRER, S.; RUBIN, C.; SAMPSON, H.A. Clinical and Laboratory Investigation of Allergy to Genetically Modified Foods. *Environ. Health Perspect.*, v.111, n.8, p. 1114-1121, 2003.
- BINDSLEV-JENSEN, C. & POULSEN, L.K. Hazards of unintentional/intentional introduction of allergens into foods. *Allergy*; v.52, p.1184-1186, 1997.
- BINGHAM, C.O. & AUSTEN, K.F. Mast-cell responses in the development of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.105, n.2, p.S527-34, 2000.
- BISCHOF, R.J. & MEEUSEN, E.N. Cellular kinetics of an allergic-type response in a sheep mammary gland model of inflammation. *Clin. Exp. Allergy*, v. 32, p.619-626, 2002.
- BISHOP, G.A. & HOSTAGER, B.S. Signaling by CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. *Immunol. Res.*, v.24, n.2, p.97-109, 2001.
- BLANCHARD, C.; DURUAL, S.; ESTIENE, M.; BOUZAKRI, K.; HEIM, M.H.; BLIN, N.; CUBER, J.C. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression:

- requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. *J. Immunol.*, v.172, n.6, p.3775-83, 2004.
- BOCK, S.A.; MUÑOZ-FURLONG, A.; SAMPSON, H.A. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.107, n.1, p.191-3, 2001.
- BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; GRAEL, C.F.F.; NETTO-JR, N.L.; MONTE-MÓR, R.L.M. Tradicional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.19, n.2A, p.478-487, 2009.
- BRANDÃO, M.G.L.; ZANETTI, N.N.S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C.F.F.; SANTOS, A.C.P.; MONTE-MÓR, R.L.M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. *J. Ethnopharmacol.*, v.120, p.141–148, 2008.
- BRANDT, E.B.; STRAIT, R.T.; HERSHKO, D.; WANG, Q.; MUNTEL, E.E.; SCRIBNER, T.A.; ZIMMERMANN, N.; FINKELMAN, F.D.; ROTHENBERG, M.E. Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *J. Clin. Invest.*, v.112, n.11, p.1666–1677, 2003.
- BRANDTZAEG, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutr. Rev.*, n. 56, S5-S18, 1998.
- BRANDTZAEG, P.; FARSTAD, I.N.; JOHANSEN, F.E.; MORTON, H.C.; NORDERHAUG, I.N.; YAMANAKA, T. The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. *Immunol. Rev.*, v.171, p.45-87, 1999.
- BRANDTZAEG, P. Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. *Scan J Immunol.*, v.70, p.505-515, 2009.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITARIA. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, 03 nov,1999.
- BRASILEIRO-FILHO, G. Patologia Bogliolo. 7ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2006, 1472p.
- BREDEHORST, R. & DAVID, K. What establishes a protein as an allergen?, *J Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, v.756, p.33–40, 2001.
- BREITENEDER H. Molecular aspects of food proteins that contribute to allergenicity. *60th Annual Meeting of AAAAI*, San Francisco, CA, March 19-23, 2004.
- BUFE, A. The biological function of allergens: relevant for the induction of allergic diseases? *Int. Arch. Allergy and Immunology*, v.117, p.215-219,1998.
- BURKS, A.W.; LAUBACH, S.; JONES, S.M. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.121, n.6,p.1344-1350, 2008.

- BYRNE, M. Nutraceuticals: food fad or future trend? *Food Eng. Int.*, v.19, n.1, p.42-43, 1994.
- CANDIDO, L.M.B. & CAMPOS, A.M. Alimentos funcionais. Uma revisão. *Boletim da SBCTA*. v.29, n.2, p.193- 203, 2005.
- CARA, D.C.; CONDE, A.A.; VAZ, N.M. Immunological induction of flavor aversion in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.27, n.6, p.1331-1334, 1994.
- CARA, D.C.; CONDE, A.A.; VAZ, N.M. Immunological induction of flavor aversion in mice II. Passive/ Adoptive transfer and pharmacological inhibition. *Scan. J. Immunol.*, v.45, n.1, p.16-20, 1997.
- CARA, D.C.; EBBERT, K.V.; MCCAFFERTY, D-M. Mast cell-independent mechanisms of immediate hypersensitivity: a role for platelets. *J. Immunol.*, v.172, n.8, p.4964-71, 2004.
- CARA, D.C.; NEGRAO-CORREA, D., TEIXEIRA, M.M. Mechanisms underlying eosinophil trafficking and relevance in vivo. *Histol. Histopathol.*, v.15, n.3, p.899-920, 2000.
- CARMO, F.B.T.; MÁRSICO, E.T.; SÃO-CLEMENTE, S.C.; CARMO, R.P.; FREITAS, M.Q. Histamina em conservas de sardinha. *Ci. Anim. Bras.*, v.11, n.1, p. 174-180, 2010.
- CARVALHO, P. & CARVALHO, R. Coleção de Genótipos Silvestre e Cultivados de *Dioscorea*. In: QUEIRÓZ, M.; GOEDERT O.; RAMOS, R. (Ed). *Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro*. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido / Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.
- CASCUDO, L.C. *História da alimentação no Brasil*. Belo Horizonte: Ed.Itatiaia; São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo, 1983. 954p.
- CEREDA, M.P. Justificativa para a padronização dos nomes vulgares de Colocasia e Dioscorea sp. no Brasil. In: Simpósio Nacional Sobre as Culturas de Inhame e do Taro. João Pessoa, 2002. Anais. João Pessoa: EMEPA-PB, p. 306-307, 2002.
- CHAN, Y.C.; CHANG, S.C.; LIU, S.Y.; YANG, H.L.; HSEU, Y.C.; LIAO, J.W. Beneficial effects of yam on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *J. Sci. Food Agric.*, v.1, p.161-167, 2010.
- CHEHADE, M. & MAYER, L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J. Allergy Clin. Immunol*, v.115, n.1, p.3-12, 2005.
- CHEN, H-L.; WANG, C-H.; CHANG, C-T.; WANG, T-C. Effects of taiwanese yam (*Dioscorea japonica* Thunb. Var. *pseudojaponica* Yamamoto) on upper gut function and lipic metabolism in BALB/c mice. *Nutrition*, v.19, n.7, p.646-651, 2003.
- CHOI, E.M.; KOO, S.J.; HWANG, J-K. Immune cell stimulanting activity of mucopolissacharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). *J. Ethnopharmacol.*, v.91, p.1-6, 2004.

- CONSERVATION INTERNATIONAL. *Biodiversity Hotspots*.
<http://www.biodiversityhotspots.org/xp/hotspots/Pages/default.aspx>. Acessado em 22/out/2010.
- CORREA, M.P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. v.2, 1931.707p.
- CRIVELLATO, E., VACCA, A.; RIBATTI, D. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. *Trends Immunol.*, v.25, n.4, p. 210-217, 2004.
- D'AURIOL-SOUZA, M.M.; BRANDÃO, M.G.L. ; CARA, D.C . Antioxidant effect of the Copaiba oil-resin in OVA-induced food allergy. In: II CONGRESSO DE FITOTERÁPICOS DO MERCOSUL E VI REUNIÃO DA SOCIEDADE LATINOAMERICANA DE FITOQUÍMICA, 2008, Belo Horizonte. Programação e Livro de Resumos. Belo Horizonte : O Lutador, 2008. p.84.
- D'AURIOL-SOUZA, M.M.; DOURADO, L.P.A.; BRANDÃO, M.G.L.; CARA, D.C. Efeito do Tratamento com Óleo-resina da Copaifera spp na alergia alimentar induzida experimentalmente em camundongos. In: XVI SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA/ XI SEMANA DE GRADUAÇÃO/ X ENCONTRO DE EXTENSÃO, 2007, Belo Horizonte. *Anais*. v. CD-ROM. p. 1-1. Belo Horizonte: UFMG, 2007.
- DE CASTRO, M. Efeitos anti-inflamatórios e proliferativos dos glicocorticóides: concordância ou discordância? *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.48, n.3, 2005.
- DE FELICE, S.L. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R & D. *Trends in Food Sci. Technol.*, v.6, n.2, p.59-61, 1995.
- DOURADO, L.P.; J.C. SALDANHA; GARGIULO, D.L.; NOVIELLO, M.L.; BRANT, C.C.; REIS, M.L.; SOUZA, R.M.; FARIA, A.M.; SOUZA, D.G.; CARA, D.C. Role of IL-4 in aversion induced by food allergy in mice. *Cell. Immunol.* v. 262, n. 1, p. 62-68, 2010.
- DUBOIS, B; GOUBIER, G; JOUBERT, G.; KAISERLIAN, D. Oral Tolerance and regulation of mucosal immunity. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.62, p.1322-1332, 2005.
- DUERKOP, A.B.; VAISHNAVA, S.; HOOPER, L.H. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity.*, v.31, p.368-376, 2009.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. The European Agency for the Evaluation of Medical Products. Committee for Veterinary Medicinal Products. Allantoin. October, 2001.
- FARHADI, A.; BANAN, A.; FIELDS, J.; KESHAVARZIAN, A. Intestinal barrier: An interface between health and disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, v.18, p.479–97, 2003.
- FARIA, A.M. & WEINER, H.L. Oral tolerance. *Immunol. Rev.*, v.206, p.232-59, 2005.
- FAROMBI, E.O.; BRITTON, G.; EMEROLE, G. Evaluation of the antioxidant activity and partial characterization of extracts from browned yam flour diet. *Food Res. Int.*, v.33, p.493-499, 2000.

- FERRARIS, R.P.; VILLENAS, S. A.; DIAMOND, J. Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. *Am. J. Physiol.*, v.262, n.6, p.G1047-1059, 1992.
- FERREIRA, C.T.; SEIDMAN, E. Alergia alimentar: atualização prática do ponto de vista gastroenterológico. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro, v.83, n.1, p.7-20, 2007.
- FINKELMAN, F.D.; ROTHENBERG, M.E.; BRANDT, E.B.; MORRIS, S.C.; STRAIT, R.T. Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.115, n.3, p.449-57, 2005.
- FOSTER, P.S.; YANG, M.; KUMAR, R.K. CD4(+) T-lymphocytes regulate airway remodeling and hyper-reactivity in a mouse model of chronic asthma. *Lab. Invest.*, v.82, n.4, p.455-62, 2002.
- FULEIHAN, R.L. Allergy, immunology, and related disorders. *Curr. Opin. Pediatr.*, v.10, p.581- 583, 1998.
- GABY, A.R. The role of hidden food allergy/intolerance in chronic disease. *Alt. Med. Rev.*, v.3, n.2, p.90-100, 1998.
- GAUT, J.P.; BYUN, J.; TRAN, H.D.; LAUBER, W.M.; CARROLL, J.A.; HOTCHKISS, R.S.; BELAAOUAJ, A.; HEINECKEJ.W. Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *J. Clin. Invest.*, v.109, n.10, p.1311-9, 2002.
- GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. *Biodiversidade. Enfoque químico-biológico*. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 1996. 267 p.
- GRAMSBERGER, A.; MULDER, E.J.H. The influence of betamethasone and dexamethasone on motor development in young rats. *Pediatric Res.*, v.44, n.1, p.105-110, 1998.
- GUO, Y.; LI, Z.; LIN, H.; SAMEE, H.; KHALID, J. Studies on specific degranulation of mast cell sensitized by several allergens in vitro. *Cell. Mol. Immunol.*, v.6, n.2, p.149-153, 2009.
- HASLER, C. A new look at an ancient concept. *Chem. & Ind.*, v.2, p.84-89, 1998.
- HATA, Y.; REGUERO, M.T.; GARCÍA, L.A.; BUITRAGO, G.; ALVAREZ, A. Evaluación del contenido de sapogeninas em variedades nativas de ñame (*Dioscorea* spp.) provenientes de la colección de La Universidad del Córdoba. *Rev. Col. Ciênc. Quím. Farm.*, v.32, n.2, p.149-157, 2003.
- HELM, R.M. & BURKS, A.W. Mechanisms of food allergy. *Curr. Opin. Immunol.*, v.12, n.6, p.647-53, 2000.
- HELM, R.M., ERMEL, R.W.; FRICK, O.L. Nonmurine animal models of food allergy. *Environ. Health Perspect.*, v.111, n.2, p.239-44, 2003.
- HERZ, U. Immunological basis and management of food allergy. *J. Pediatric Gastroenterol. Nutr.*, v. 47, s.2, p.S54-S57, 2008.

- HOGAN, S.P., ROSENBERG, H. F.; MOQBEL, R.; PHIPPS, S.; FOSTER, P.S.; LACY, P.; KAY, A.B.; ROTHENBERG, M.E. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin. Exp. Allergy*, v.38, n.5, p.709-50, 2008.
- HOLGATE, S.T. The epidemic of allergy and asthma. *Nature*, v.402, p. 2-4, 1999.
- HOLGATE, S.T. & POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.*, v.8, n.3, p.218-30. 2008.
- HOLMES, J.L. Management of acute anaphylaxis. *Aust. Fam. Physician.*, v.20, p.1272-1273, 1991.
- HOU, W-C.; LEE, M-H.; CHEN, H-J.; LIANG, W-L.; HAN, C-H.; LIU, Y-W.; LIN, Y-W. Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. *J. Agric. Food Chem.* v.49, p.4956-4960, 2001.
- HUANG, C-H.; KU, C-Y.; JAN, T-R. Diosgenin attenuates allergen-induced intestinal inflammation and IgE production in a murine model of food allergy. *Planta Med.*, v.75, p.1300-1305, 2009.
- HUANG, C-H.; LIU, D-Z.; JAN, T-R. Diogenin, a plant-derived sapogenin, enhances regulatory T-cell immunity in the intestine of mice with food allergy. *J. Nat. Prod.*, v.73, p.1033-1037, 2010.
- HUNGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Curr. Opin. Biotech.*, v.13, p.497-507, 2002.
- HUNT, J.R. Nutritional products for specific health benefits-foods, pharmaceuticals, or something in between? *J. Am. Diet. Assoc.*, v.94, n.2, p.151-153, 1994.
- HUSBY, S.; FOGEL, N.; SVEHAG S.E. Passage of dietary antigens into the blood of children with celiac disease. Quantification and size distribution of absorbed antigens. *Gut.*, v.28, p.1062-72, 1987.
- HYUN, J.G. & BARRETT, T.A. Oral tolerance therapy in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.*, v.101, p.569-571, 2006.
- INSTITUTE OF MEDICINE. *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids*. Food and Nutrition Board. National Academy Press, Washington, DC, 2002.
- JAN, T-R.; WEY, S-P.; KUAN, C-C.; LIAU, M-H.; WU, H-Y. Diosgenin, a steroidal sapogenin, enhances antigen-specific IgG2a and interferon-gamma expression in ovalbumin-sensitized BALB/c mice. *Planta Med.*, v.73, p.421-426, 2007.
- JEON, J.R.; LEE, J.S.; KIM, J.Y.; KIM, S.D.; NAM, D.H. Effect of ethanol extract of dried Chinese yam (*Dioscorea batatas*) flour containing dioscin on gastrointestinal function in rat model. *Arch. Pharm. Res.*, v.29, n.5, p.348-353, 2006.
- JIN, M.; SUH, S-J.; YANG, J-H.; LU, Y.; KIM, S.J.; KWON, S.; JO, T.H.; KIM, J.W.; PARK, Y.I.; AHN, G.W.; LEE, C-H.; KIM, C-H.; SON, J-K.; CHANG, H.W. Anti-inflammatory activity of bark of *Dioscorea batatas* Decne through the inhibition of

- iNOS and COX-2 expressions in RAW264.7 cells via NF- κ B and ERK1/2 inactivation. *Food Chem. Toxicol.*, v.48, p.3073-3079, 2010.
- JOHANSSON, M.E.V.; PHILLIPSON, M.; PETERSSON, J.; VELCICH, A.; HOLM, L.; HANSSON, G.C. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.105, n.39, p.15064-69, 2008.
- KIELLMAN N-IM. Prediction and prevention of atopic allergy. *Allergy*, v.53, p.67-71, 1998.
- KIYONO, H. & FUKUYAMA S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, v.4, n.9, p.699-710, 2004.
- KONDĚLKOVÁ, K.; VOKURKOVÁ, D.; KREJSEK, J.; BORSKÁ, L.; FIALA, Z.; CTIRAD, A. Regulatory T cells (Treg) and their role in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Med.*, v.53, n.2, p.73-77, 2010.
- KRAEHENBUHL, J. P. & NEUTRA, M.R. Epithelial M cells: differentiation and function. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.*, v.16, p.301-332, 2000.
- KUNISAWA, J. & KIYONO H. A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation of first lines of defense. *Cell. Mol. Life Sci.* v.62, n.12, p.1308-1321, 2005.
- KWAK, N.; JUKES, D.J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control.* v.12, p. 99-107, 2001a.
- KWAK, N.; JUKES, D.J. Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology. *Food Control.* v.12, p. 109-117, 2001b.
- LACAILLE-DUBOIS, M.A. A propôs des *Dioscorea* (le yam). *La phytothérapie Européenne*, v.7, p.9-16, 2005.
- LACK, G. Epidemiologic risks for food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.121, n.6, p. 1331- 1336, 2008.
- LEE, M-Y.; LEE, N-H.; JUNG, D.; LEE, J-A.; SEO, C-S.; LEE, H.; KIM, J-H.; SHIN, H-K. Protective effects of allantoin against ovalbumin (OVA)-induced lung inflammation in a murine model of asthma. *Int. Immunopharmacol.*, v.10, p.474-480, 2010.
- LEE, S-C; TSAI, C-C-; CHEN, J-C.; LIN, J-G.; LIN, C-C.; HU, M-L.; LU, S. Effects of "Chinese yam" on hepato-nephrotoxicity of acetaminophen in rats. *Acta Pharmacol Sin.*, v.6, p.503-508, 2002.
- LEUNG, D.Y. Molecular basis of allergic diseases. *Mol. Genet. Metab.*, v.63, n.3, p.157-67, 1998.
- LIN, J-T. Effects of domestic processing on steroidal saponins in taiwanese yam cultivar (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). *J. Agric. Food Chem.*, v.54, p. 9948-9954, 2006.
- LIN, J-T. & YANG, D-J. Determination of steroidal saponins in different organs of yam (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). *Food Chem.*, v.108, p.1068-1074, 2008.
- LIU, R. H. Supplement quick fix fails to deliver. *Food Technol. Int.*, v.1, p.71-72, 2002.

- LIU, S.Y.; WANG, J.Y.; SHYU, Y.T.; SONG, L.M. Studies on yams (*Dioscorea* spp.) in Taiwan. *J. Chin. Med.*, v.6, p.111-126, 1995.
- LIU, Y.W.; SHANG, H.F.; WANG, C.K.; HSU, F.L.; HOU, W-C. Immunomodulatory activity of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea alata* cv. Tainong No.1) tuber. *Food Chem. Toxicol.*, v.45, p.2312-2318, 2007.
- LIU, Y.W.; LIU, J.C., HUANG, C.Y., WANG, C.K.; SHANG, H.F.; HOU, W-C. Effects of oral administration of yam tuber storage protein, dioscorin, to BALB/c mice for 21-days on immune responses. *J. Agric. Food Chem.*, v.57, p.9274-9279, 2009.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The systematic identification of flavonoids. Springer - Verlag. New York, Heidelberg, Berlin, 1970. 354p.
- MACDONALD, T.T., & MONTELEONE, G. Immunity, inflammation and allergy in the gut. *Science*, v.307, p.1920-1925, 2005.
- MACPHERSON, A.J. & HOOPER, L.V. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Rev.*, v.10, p.159-169, 2010.
- MACPHERSON, A.J. & UHR, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, v.303, n.5664, p.1664-1665, 2004.
- MAYER, L. Mucosal immunity. *Pediatrics*, v.111, n.6, p.1595-600, 2003.
- MCKAY, D.M. Good bug, bad bug: in the case of enteric inflammatory disease does the epithelium decide? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.100, suppl.1, p.205-210, 2005.
- MENEZES, J.S.; MUCIDA, D.S.; CARA, D.C.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; RUSSO, M.; VAZ, N.M.; FARIA, A.M. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int Immunol*, v.15, n.3, p.447-55, 2003.
- MESTECKY, J.; OGRA, P.L.; MCGREE, J.R.; LAMBRECHT, B.N.; WARREN, S. *Mucosal Immunity*. 3rd.ed. v.1. London: Academic Press, 2005. 2064p.
- MILLS, E.N.C.; VALOVIRTA, E.; MADSEN, C.; TAYLOR, S.L.; VIETHS, S.; ANKLAM, S.; BAUMGARTNER, S.; KOCH, P.; CREVEL, R.W.R.; FREWER, J. Information provision for allergic consumers – where we are going with food allergen labeling? *Allergy*, v.59, p.1262-1268, 2004.
- MINTON, K. Allergy and Asthma: What drives IL-4 versus IL-13 signalling? *Nature Rev. Immunol.*, v.8, p.166-167, 2008.
- MONTALDO, A. *Cultivo de raices y tubérculos tropicales*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José. Costa Rica. 1991, 407p.
- MOORE-OLUFEMI, S.D.; XUE, H.; ALLEN, S.J.; MOORE, F.A.; STEWART, R.H.; LAINE, G.A.; COX, C.S. Inhibition of intestinal transit by resuscitation-induced gut edema is reversed by L-NIL. *J. Surg. Res.*, v.129, n.1, p.1-5, 2005.
- MOREIRA, L.F. *Estudo dos componentes nutricionais e imunológicos na perda de peso em camundongos com alergia alimentar*. (Mestrado). Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. 99 p.

- MOWAT, A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.*, v.3, n.4, p.331-341, 2003.
- NEUTRA, M.R.; MANTIS, N.J., KRAEHENBUHL, J-P. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat. Immunol.*, v.2, n.11, p.1004-1009, 2001.
- NEWBERRY, R.D. & LORENZ, R.G. Organizing a mucosal defense. *Immunol. Rev.*, v.206, p.6-21, 2005.
- NIKOLIC, M.; NIKIC, D.; MITROVIC, V. Medical Nutrition Therapy in Management of Food Allergy. *Acta Fac. Med. Naiss.*, v.24, n.1, p.45-50, 2007.
- NIU, C.S.; CHEN, W.; WU, H.T.; CHENG, K.C.; WEN, Y.J.; LIN, K.C.; CHENG, J.T. Decrease of plasma glucose by allantoin, an active principle of yam (*Dioscorea spp.*), in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Agric. Food Chem.*, v.22, p.12301-12035, 2010.
- NOGUEIRA, R.C., CERQUEIRA, H.F., SOARES, M.B.P. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. *Expert Opinion in Therapeutic Patents*, v.20, n.2, p.1-13, 2010.
- NOWAK-WEGRZYN, A. New Perspectives for Use of Native and Engineered Recombinant Food Proteins in Treatment of Food Allergy. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, v.27, n.1, p.105–127, 2007.
- OH, P-S.; LIM, K-T. Glycoprotein isolated from *Dioscorea batatas* Decne modulates expressions of IL-4 and IL-10 in primary-cultured mouse lymphocytes. *Cell Biochem.*, v.27, p.316-322, 2009.
- OLAYEMI, J.O. & AJAIYEGBA, E.O. Anti-inflammatory studies of yam (*Dioscorea esculenta*) extract on winstar rats. *African J. Biotechnol.*, v.6, n.16, p. 1913-1915, 2007.
- OMORUYI, F.O. Jamaican bitter yam sapogenin: potencial mechanisms of action in diabetes. *Plant Food Hum. Nutr.*, v.63, p.135-140, 2008.
- ONWUEME, I. *The Tropical Tuber Crops (Yams, Cassava, Sweet potato and cocoyam)*. Toronto: John Wiley & Sons, 1978. 234p.
- OSTERBALLE, M.; HANSEN, T.K.; MORTZ, C.G.; HØST, A.; BINDSLEV-JENSEN, C. The prevalence of food hypersensitivity in an unselected population of children and adults. *Pediatr. Allergy Immunol.*, v.16, n.7, p.567-73, 2005.
- PATRIARCA, G.; SCHIAVINO, D.; PECORA, V.; LOMBARDO, C.; POLLASTRINI, E.; ARUANNO, A.; SABATO, A.; COLAGIOVANNI, A.; RIZZI, A.; PASQUALE, T.; RONCALLO, C.; DECINTI, M.; MUSUMECI, S.; GASBARRINI, S.; BUONOMO, A.; NUCERA, E. Food allergy and food intolerance: diagnosis and treatment. *Inter. Emerg. Med.*, v.4, n.1, p.11-24, 2009.
- PEAVY, R.D; METCALFE, D.D. Understanding the mechanisms of anaphylaxis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, v.8. n.4. p.310-315, 2008.

- PEDRALLI, G. *Revisão taxonômica das espécies de Dioscoreaceae (R. Br.) Lindley da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais e Bahia, Brasil*. São Paulo: Depto. Botânica / Universidade de São Paulo. 1998. 400p. (Tese, Doutorado em Ciência – Botânica).
- PEDRALLI, G. Dioscoreaceae e Araceae: Aspectos Taxonômicos, Etnobotânicos e Espécies Nativas com Potencial para Melhoramento Genético. In: II SIMPOSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, João Pessoa 2002. *Anais...* v.2., João Pessoa: EMEPA – PB, 2002a.
- PEDRALLI, G. Use of common names of Araceae and Dioscoreaceae species in Brazil. *Hortic. Bras.*, v.20, n.4, 2002b.
- PICCINNI, M.P.; GIUDIZI, M.G.; BIAGIOTTI, R.; BELONI, L.; GIANNARINI, L.; SAMPOGNARO, S.; PARRONCHI, P.; MANETTI, R.; ANNUNZIATO, F.; LIVI, C. Progesterone favors the development of human T helper (Th) cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD-30 expression in established Th1 clones. *J. Immunol.*, v.155, p.128-133, 1995.
- PICCINNI, M.P.; BELONI, L.; GIANNARINI, L.; LIVI, C.; SCARSELLI, G.; ROMAGNANI, S.; MAGGI, E. Abnormal production of Th2-type cytokines (IL-4 and IL-5) by T cells from newborns with atopic parentes. *Eur. J. Immunol.*, v.26, p.2293-2298, 1996.
- PICCINNI, M.P.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S. Environmental factors favoring the allergen-specific Th2 response in allergic subjects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.917, p.844-52, 2000.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quím. Nova*, v.25, n.1, p.45-61, 2002.
- RASHIDA, A.; ATHAR, M.; ABDULLAH, U.; ABIDI, S.A. Nutraceuticals as natural healers: emerging evidences. *African J. Biotech.*, v.8, n.6, p.861-898, 2009.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of american institute of nutrition. ad hoc writing committee on the reformulation of AIN-76A rodent diet. *J.Nutr.*, v.193, p.1939-1951, 1993.
- REILLY, C. Functional foods - a challenge for consumers. *Trends in Food Sci. Technol.*, v.5, n.4, p.121-123, 1994.
- RESCIGNO, M.; URBANO, M.; VALZASINA, B.; FRANCOLINI, M.; ROTTA, G.; BONASIO, R.; GRANUCCI, F.; KRAEHENBUHL, J-P.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.*, v.2, n.4, p.361-367, 2001.
- ROBERFROID, M.B. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. *J. Nutr.*, v.129, suppl.7, p.1398S-1401S, 1999.
- ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. *Dig. Liver Dis.*, v.34, suppl.2, p.S105-S110, 2002.
- ROTHENBERG, M.E.; MISHRA, A.; BRANDT, E.B.; HOGAN, S.P. Gastrointestinal Eosinophils. *Immunol. Rev.*, v.179, p.139-155, 2001.

- ROTHENBERG, M.E. & HOGAN, S.P. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* v.24, p.147-174, 2006.
- SAGARA, K.; OJIMA, M.; SUTO, K.; YOSHIDA, T. Quantitative determination of allantoin in *Dioscorea* rhizome and an oriental pharmaceutical preparation, hachimi-gan, by high-performance liquid chromatography. *Planta Med.*, v.55, s.1, p.93, 1989.
- SAINT-HILAIRE, A. *Viagem pelas Províncias de Minas Gerais e Rio de Janeiro*. Belo Horizonte: Ed. Itatiaia. 1975. 380p.
- SAITO, M.L & OLIVEIRA, F. Confrei: virtudes e problemas. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.1, p.74-85. 1986.
- SALDANHA, J.C., GARGIULO, D.L.; SILVA, S.S; CARMO-PINHO, F.H.; ANDRADE, M.C., ALVAREZ-LEITE, J.I.; TEIXEIRA, M.M., CARA, D.C. A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.37, n.6, p.809-16, 2004.
- SAMPSON, H.A. Food Allergy. In *Allergy and Allergic Diseases*. Kay, ed. Blackwell Science, Oxford, 1997, 1517p.
- SAMPSON, H.A. Food Allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.103, p.717-728, 1999.
- SAMPSON, H.A. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.107, p.891-896, 2001.
- SAMPSON, H.A. Food Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.11, n.2, p.540-547, 2003.
- SAMPSON, H.A. Update on food allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.113, p.805–819, 2004.
- SAMPSON, H.A. & WANG, J. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, v.1, p.19-29, 2009
- SANTIAGO, A.F.; FERNANDES, R.M.; SANTOS, B.P.; ASSIS, F.A.; OLIVEIRA, R.P.; CARVALHO, C.R.; FARIA, A.M.C. Role of mesenteric lymph nodes and aging in secretory IgA production in mice. *Cell Immunol*, v.253, p.5-10, 2008.
- SANTOS, E.S. *Inhame (Dioscorea spp.): aspectos básicos da cultura*. João Pessoa: EMEPA-PB, SEBRAE, 1996. 158 p.
- SAUTOUR, M.; MITAINE-OFER, A.C.; LACAILLE-DUBOIS, M.A. The *Dioscorea* genus: a review of bioactive steroids saponins. *J. Nat. Med.*, v.61, p.91-101, 2007.
- SCHACKE, H.; SCHOTTELIUS, A.; DOCKE, W., STREHLKE, P.; JAROCH, S.; SCHMEES, N.; REHWINCKEL, H.; HENNEKES, H.; ASADULLAH, K. Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 101, n.1, p.227-232, 2004.

- SCHÄPPI, G.F.; KONRAD, V.; IMHOF, D.; ETTER, R.; WÜTHRICH, B. Hidden peanut allergens detected in various foods: findings and legal measures. *Allergy*, v.56, p.1216–1220, 2001.
- SCHENK C & MULLER, M. The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, v.22, n.3, p.391-409, 2008.
- SCHONBECK, U. & LIBBY, P. The CD40-CD145 receptor/ligand dyad. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.58, n.1, p. 4-43, 2001.
- SEAGRI. Secretaria de agricultura, irrigação e reforma agrária do Governo da Bahia. Cultura do Cará. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/Cara.htm>. 2001. Acesso em: 29 de dezembro de 2010.
- SEERAM, N.P.; ADAMS, L.S.; HARDY, M.L.; HEBER, D. Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *J. Agric. Food Chem.*, v.52, p.2512-2517, 2004.
- SHANAHAN F. The host-microbe interface within the gut. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterology*, v.16, p.915-931, 2002.
- SHESTOPALOV, A.V.; SHKURAT, T.P.; MIKASHINOVICH, Z.I.; KRYZHANOVSKAYA, I.O.; BOGACHEVA, M.A.; LOMTEVA, S.V.; PROKOFEV, V.N.; GUSKOV, E.P. Biological functions of allantoin. *Biol Bull.*, v.33, p.437-40, 2006.
- SICHERER, S.H. & SAMPSON, H.A. Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annu. Rev. Med.*, v.60, p.261-277, 2009.
- SICHERER, S.H. Food allergy. *Lancet*, v.360, n.9334, p.701-710, 2002.
- SMITHIES, L.E.; SELLERS, M.; CLEMENTS, R.H.; MOSTELLER-BARNUM, M.; MENG, G.; BENJAMIN, W.H.; ORENSTEIN, J.M.; SMITH, P.D. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J. Clin. Invest.*, v.115, n.1, p.66–75, 2005.
- SONNENBURG, J.L.; ANGENT, L.T., GORDON, J.I. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat. Immunol.*, v. 5, n.6, p. 569-573, 2004.
- SOUZA, P.H.M.; SOUZA NETO, M.H.; MAIA, G.A. Componentes funcionais nos alimentos. *Boletim da SBCTA*. v.37, n.2, p.127-135, 2003.
- STRATH, M., WARREN, D.J.; SANDERSON, C.J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J. Immunol. Methods*, v.83, n.2, p.209-215, 1985.
- TAKAYAMA, N.; IGARASHI O.; KWEON, M-N.; KIYONO, H. Regulatory role of Peyer's patches for the inhibition of OVA-induced allergic diarrhea. *Clin. Immunol.*, v.123, n.2, p.199-208, 2007.
- TATSUO, M.A.K.F.; CARVALHO, W.M; SILVA, C.V.; MIRANDA, E.G.; FERREIRA, S.H.; FRANCISHI, J.N. Analgesic and anti-inflammatory effects of dipyrone in rat adjuvant arthritis model. *Inflammation*. v.18, n.4, p.399-405. 1994.

- TEIXEIRA, G.A.P.B.; ANTUNES, D.M.F.; CASTRO-JUNIOR, A.B.; COSTA, J.P.; PASCHOAL, P.O.; CAMPOS, S.M.N.; PETRUZZI, M.M.B.; ARAÚJO, V.S.; ANDRADE, L.A.B.; MORENO, S.R.F.; NOBREGA, L.A.B.; CARDOSO, G.P. Induction of an antigen specific gut inflammatory reaction in mice and rats: a model for human inflammatory bowel disease. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v.52, n.3, p.601-609, 2009.
- TEWTRAKUL, S.; ITHARAT, A. Anti-allergic substances from rhizomes of *Dioscorea membranacea*. *Bioorganic Med. Chemistry*, v.14, p.8707-8711, 2006.
- TEWTRAKUL, S.; ITHARAT, A. Nitric oxid inhibitory substances from the rhizomes of *Dioscorea membranacea*. *J. Ethnopharm.*, v.109, p.412-416, 2007.
- TSUKITA, S.; FURUSE, M.; ITOH M. Multifunctional strands in tight junctions. *Molecular cell biology. Nature.* v.2, p. 285-293, 2001.
- UNTERSMAYR, E. & JENSEN-JAROLIM, E. Mechanisms of type I food allergy. *Pharmacol. Ther.*, v.112, n. 3, p.787-798, 2006.
- VAN HALTEREN, A.G.; VAN DER CARMEN, M.J.; BIEWENGA, J.; SALVELKOUL, H.F.; KRAAL, G. IgE and mast cell response on intestinal allergen exposure: a murine model to study the onset of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*; v.99, p.94-99, 1997.
- VAN KOOTEN, C & BANCHEREAU, J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol.* v.67, n.1, p.2-17, 2000.
- VAN WIJK, F. & KNIPPELS, L. Initiating mechanisms of food allergy: Oral tolerance versus allergic sensitization. *Biomed. Pharmacother.*, v.61, n.1, p.8-20, 2007.
- VANNUCCHI, H; MOREIRA, E.A.M.; CUNHA, D.F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M.V.M.; BERNARDES, M.M.; JORDÃO-JR., A.A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Nutr. Clin.* v.31, p. 31-44, 1998.
- VERALDI, S.; MENTER, A.; INNOCENTI, M. Treatment of mild to moderate seborrheic dermatitis with MAS064D (Sebclair), a novel topical medical device: results of a pilot, randomized, double-blind, controlled trial. *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, v.22, n.3, p.290-6, 2008.
- WRICK, K.L. Functional foods: cereal products at the food-drug interface. *Cereal Foods World*, v.38, n.4. p.205-214, 1993.
- XU, J & GORDON, J.I. Honor thy symbionts. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.* v.100, p.10452-59, 2003.
- XU, Y. & SONG, G. The role of CD40-CD145 interaction in cell immunoregulation. *J. Biomed. Sci.*, v.11, n.4, p.426-38, 2004.
- YANG, D-J.; LU, T-J.; HWANG, L-S. Isolation and identification of steroidal saponins in Taiwanese yam cultivar (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). *J. Agric. Food Chem.*, v.51, n.21, p.6438-6444, 2003.

- YANG, M-H.; YOON, K-D.; CHIN, Y-W.; PARK, J.H.; KIM, J. Phenolic compounds with radical scavenging and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitory activities from *Dioscorea opposita*. *Bioorganic & Med. Chem.*, v.17, p. 2689-2694, 2009.
- YORK, I.; GOLDBERG A.L; MO, X.Y.; ROCK, K.L. Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol Rev.*, v. 172, p.49-66, 1999.
- YU, L.C.H. & PERDUE, M.H. Immunologically mediated transport of ions and macromolecules. *Ann. New York Acad. Sci.*, v. 915, p. 247-59, 2001.
- YU, L.C.H.; YANG, P-P.; BERIN, C.M.; DI LEO, V.; CONRAD, D.H.; MCKAY, D.M.; SATOSKAR, A.R.; PERDUE, M.H. Enhanced transepithelial antigen transport in intestine of allergic Mice is mediated by IgE/CD23 and regulated by interleukin-4. *Gastroenterology*, v.121, n. 2, p. 370-381, 2001.
- YU, L.H.Y. Gatekeeper against food allergy. *Pediatr. Neonatol.*, v.50, n.6, p. 247-254, 2009.
- ZHAO, X.; WANG, Y.; SUN, Y. Simultaneous determination of four bioactive constituents in Liuwei Dihuang Pills by micellar electrokinetic chromatography. *J. Pharmac. Biomed. Analysis*, v.44, n.5, p.1183-1186, 2007.
- ZUIDMEER, L.; GOLDHAHN, K.; RONA, R.J.; GISLASON, D.; MADSEN, C.; SUMMERS, C.; SODERGREN, E.; DAHLSTROM, J.; LIDNER, T.; SIGURDARDOTTIR, S.T.; MCBRIDE, D.; KELI, T. The prevalence of plant food allergies: A systematic review. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.121, n.5, p.1210-1218, 2008.

197 referências

ANEXO I

Técnicas de colorações histológicas

HE (HEMATOXILINA-EOSINA)

Desparafinar em Xilol I e II	10 minutos (cada)
Hidratar em concentrações decrescentes de álcool etílico (absoluto I, absoluto II, 90%, 80%, 70%)	3 minutos (cada)
Lavar em água corrente	5 minutos
Corar pela Hematoxilina (VETEC)	50 segundos
Lavar em água corrente branda	20 minutos
Corar pela Eosina (VETEC)	1 minuto e 30 segundos
Lavar rapidamente em água corrente	1 mergulho
Desidratar em série crescente de concentração de álcool etílico (70%, 80% e 90%)	2 mergulhos
Desidratar em série crescente de concentração de álcool etílico absoluto I e II	3 minutos (cada)
Montar a lâmina com lamínula e Entellan (MERCK)	

P.A.S. (ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF)

Desparafinar em Xilol I e II	10 minutos (cada)
Hidratar em concentrações decrescentes de álcool etílico (absoluto I, absoluto II, 90%, 80%, 70%)	3 minutos (cada)
Lavar em água corrente	5 minutos
Lavar em água destilada	1 mergulho
Ácido periódico 0,5%	5 minutos
Lavar em água destilada	2 mergulhos
Reativo de Schiff	10 minutos ou mais (até os cortes ficarem rosa pálido)
Lavar em água corrente	Até água ficar límpida
Desidratar em série crescente de concentração de álcool etílico (70%, 80% e 90%)	2 mergulhos (cada)
Desidratar em série crescente de concentração de álcool etílico absoluto I e II	3 minutos

Diafanizar em Xilol I e II	5 minutos (cada)
Montar a lâmina com lamínula e Entellan (MERCK)	

AZUL DE TOLUIDINA

Desparafinar em Xilol I e II	10 a 20 minutos (cada)
Hidratar em concentrações decrescentes de álcool etílico (absoluto I, absoluto II, 90%, 80%, 70%)	3 minutos (cada)
Lavar em água destilada	3 minutos
Azul de Toluidina 0,5%	5 segundos
Água destilada	1 mergulho
Diferenciar em álcool 95%	Até os cortes ficarem azuis claros
Desidratar em álcool etílico absoluto I e II	2 mergulhos (cada)
Diafanizar em Xilol I e II	5 minutos (cada)
Montar a lâmina com lamínula e Entellan (MERCK)	

Soluções utilizadas para HE

1-Solução de Eosina

Eosina Y	4 g
Bicromato de potássio	2 g
Ácido Pícrico solução aquosa saturada	40 mL
Álcool absoluto	40 mL
Água destilada	320 mL
Ácido Acético	1 gota (opcional)

Dissolver a Eosina no álcool e o bicromato na água. Juntar a solução de ácido pícrico à solução de bicromato. Por último a solução de eosina.

2-Ácido pícrico solução aquosa saturada

Ácido pícrico	1,5g
Água destilada	100 mL

Dissolver em água destilada quente. Deixe esfriar e filtrar no dia seguinte.

3-Solução de Hematoxilina de Harris

Hematoxilina cristalizada	10 g
Álcool 95%	100 mL
Sulfato de Alumínio e Potássio	200 g
Água destilada	2000 mL
Ácido acético glacial	80 mL
Óxido vermelho de mercúrio	5 g

Como preparar:

- 1) Dissolver a hematoxilina em álcool (reserva).
- 2) Dissolver o Alúmen na água previamente aquecida(não precisa levar à ebulição).

- 3) Misturar estas 2 soluções e aquecer até a fervura.
- 4) Adicionar o óxido de mercúrio e resfriar, mergulhando o frasco na água fria.
- 5) Adicionar à solução fria o ácido acético e filtrar.

Soluções utilizadas para P.A.S.

1-Ácido periódico a 0,5%

Ácido periódico cristalizado	0,5 g
Água destilada q.s.p	100 mL

2-Reativo Reagente de Schiff

Fucsina básica	1g
Água destilada	200 mL
Bissulfito de sódio	2g
Ácido clorídrico 1N	10 mL
Carvão vegetal.	2g

Dissolver a fucsina em água fervendo. Depois, esfriar esta solução até 70⁰C e adicionar o bissulfito de sódio. Agitar bem até esfriar. Adicionar o ácido clorídrico 1N, agitar bem, filtrar e guardar em local escuro por 24 horas. No dia seguinte, adicionar o carvão vegetal, agitar por 1 hora e filtrar. Conservar em geladeira (4⁰C).

Solução para Azul de Toluidina

Azul de toluidina 0,5%

Azul de toluidina	0,5 g
Borato de sódio (bórax)	1 g
Água destilada	100 mL (qsp)

Dissolver o azul de toluidina e o bórax em água destilada e completar o volume para completar para 100 ml. Filtrar antes do uso.

ANEXO II

Cópia do certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG