



## EFEITOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO SECO DE FLORES DE *Tagetes erecta* Linn NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INATA

Carlos Rafael Vaz, Larissa Benvenuto, Fernanda Capitâncio Goldoni, Roberta Nunes, Gustavo Santin Schneiker, Gabriel Antunes Rosa, Nara Lins Meira Quintao, Jose Roberto Santin

Farmacologia - Etnofarmacologia

### Resumo

Cultivada em jardins e praças públicas a *Tagetes erecta* Linn é uma erva robusta nativa do México e conhecida popularmente como cravo-de-defunto. Fonte de corantes naturais e produtos bioativos tem sido utilizada popularmente para o tratamento de uma grande variedade de doenças, como distúrbios gastrointestinais, hipertensão, problemas renais, cicatrização de feridas, e problemas inflamatórios de pele e reumatismo. Estudos preliminares avaliaram a presença de carotenoides e flavonoides que indicam um potencial efeito anti-inflamatório e antioxidante a partir de extrato das flores de *T. erecta* L. Neste contexto, no presente trabalho foram investigados os efeitos anti-inflamatórios do extrato de flores de *T. erecta*, bem como os mecanismos envolvidos na inibição da migração e secreção de neutrófilos e macrófagos. A atividade anti-inflamatória foi primeiramente investigada utilizando modelos in vitro para avaliar a expressão de mediadores químicos em neutrófilos recrutados de camundongos swiss e em cultura celular de macrófagos RAW 264.7 previamente tratados com extrato (1, 10 ou 100 µg/mL) estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). A quimiotaxia de neutrófilos frente ao N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e as propriedades de resolução pelo ensaio de fagocitose in vitro também foram avaliadas. A atividade anti-inflamatória in vivo foi investigada por meio do modelo de bolsa de ar, utilizando como agente flogístico carragenina administrada no tecido subcutâneo de camundongos Swiss machos tratados com o extrato de *T. erecta* nas doses de 30, 100 ou 300 mg/kg, v.o.. Os dados obtidos in vitro demonstraram que o extrato de *T. erecta* promove redução na liberação de mediadores químicos por macrófagos e neutrófilos. O extrato promoveu a redução da quimiotaxia de neutrófilos frente ao fMLP. No ensaio de fagocitose in vitro, o extrato apresentou potencial de atuar na resolução da inflamação, com diminuição da produção de TNF e um aumento da produção de IL-10 e de fagocitose. O tratamento oral com o extrato de *T. erecta* promoveu redução na migração de neutrófilos, bem como diminuição nos níveis de mediadores químicos e na exsudação de proteínas. Em conjunto, os dados obtidos demonstram que o extrato hidroalcoólico seco de flores de *T. erecta* apresenta importante efeito anti-inflamatório, devido à sua atividade inibitória sobre a migração de neutrófilos e na liberação de mediadores químicos, além de promover a eferocitose, evento chave na resolução da inflamação.

### Introdução

Fármacos obtidos de extratos de plantas vêm sendo desenvolvidos para diversas doenças, incluindo aquelas onde ocorre o envolvimento do processo inflamatório. A *Tagetes erecta* L. é conhecida popularmente como cravo-de-defunto, usada como fonte de corantes naturais e produtos bioativos (PICCAGLIA; MAROTTI; GRANDI, 1998). É considerada uma erva robusta que tem sido utilizada para o tratamento de uma grande



variedade de doenças, como distúrbios gastrointestinais, hipertensão, problemas renais, cicatrização de feridas, problemas inflamatórios de pele e reumatismo (MOLLIK et al., 2010). Estudos fitoquímicos preliminares detectaram nessa espécie a presença de carotenoides, flavonoides e ácido salicílico que indicam um potencial efeito anti-inflamatório ao extrato das flores de *T. erecta* (DEVIKA; KOILPILLAI, 2015). A luteína um dos carotenoides presentes no extrato pode influenciar na diminuição da inflamação inativando a via NF- $\kappa$ B (KAULMANN; BOHN, 2014; KIM; CHA; SURH, 2010), e os polifenóis exercem efeitos protetores contra os danos induzidos por radicais livres in vitro. Ambos mecanismos envolvidos no processo inflamatório, podendo assim o extrato de flores de *T. erecta* ter potencial uso terapêutico para essas condições. Neste contexto, no presente trabalho foram investigados os efeitos do extrato de flores de *T. erecta* sobre o processo inflamatório, e os mecanismos envolvidos na inibição da migração e secreção de neutrófilos e macrófagos.

### Método

O extrato seco de flores de *T. erecta* foi obtido comercialmente pela Hanzhong TRG Biotech® sob o Lote nº CH5210227. A linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foi obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os neutrófilos murinos foram obtidos a partir de camundongos swiss utilizando a metodologia de glicogênio de ostra. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Vale do Itajaí sob o parecer 031/21. A atividade anti-inflamatória foi primeiramente investigada utilizando modelos in vitro para avaliar a expressão de mediadores inflamatórios óxido nítrico, TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$  no sobrenadante das culturas celular de neutrófilos e de macrófagos previamente tratados com extrato nas concentrações de 1, 10 ou 100  $\mu$ g/mL estimulados ou não com lipopolissacarídeo (5  $\mu$ g/mL). O óxido nítrico foi quantificado de forma indireta por meio da reação de Griess (GREEN et al., 1982). Os níveis de TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$  foram mensurados pelo método de ELISA (R & D Systems - DuoSet®). A quimiotaxia de neutrófilos frente ao fMLP foi realizada empregando o teste de quimiotaxia em ágar gel pela técnica adaptada de Nelson, Quie e Simmons (1975). As propriedades de resolução do processo inflamatório foram avaliadas empregando o método de eferocitose. A atividade anti-inflamatória in vivo foi investigada por meio do modelo de bolsa de ar, utilizando como agente flogístico carragenina administrada no tecido subcutâneo de camundongos swiss machos tratados via oral com o extrato nas doses de 30, 100 ou 300 mg/kg (SEDGWICK; LEES, 1986; JAIN; PARMAR, 2011). Do lavado do infiltrado inflamatório foi realizada a quantificação de leucócitos totais, a mensuração de proteínas totais pelo kit Pierce BCA Protein Assay (Thermoscientific®). E os níveis de TNF, IL-6 e IL-1 $\beta$  pelo método de ELISA de acordo com as instruções do Fabricante (R&D Systems - DuoSet®).

### Resultados e discussões

Na avaliação do efeito citotóxico do extrato de flores de *T. erecta* sobre neutrófilos murinos os resultados obtidos demonstraram que o tratamento in vitro nas concentrações de 1, 10 ou 100  $\mu$ g/mL, não apresentam efeitos citotóxicos. A dosagem



de nitrito do sobrenadante do cultivo celular demonstrou que o tratamento com o extrato na concentração de 1 µg/mL não é capaz de reduzir os seus níveis quando comparado com o controle LPS. No entanto, as demais concentrações de 10 ou 100 µg/mL apresentaram uma redução significativa da dosagem de nitrito em ambas as células testadas. Os dados obtidos demonstram que o extrato reduziu a produção de IL-6, IL-1β e TNF no tratamento na concentração de 10 µg/mL em macrófagos e neutrófilo estimulados por LPS. Um dos mecanismos que pode estar associado a redução na secreção das citocinas pelo extrato é a inibição da translocação do NF-κB (KUMAR, ABRAHAM, 2017), que já foi atribuída à luteína (KIM et al., 2010). Considerando que a luteína, é o principal carotenoide presente no extrato das flores de *T. erecta* e é descrito na literatura de ser capaz de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio da ativação de Nrf2 e a expressão de genes antioxidantes Nrf2-alvo. Com isto ocorre a inibição da ativação das vias do NF-κB e da STAT3 mediadas por ROS e consequentemente inibindo a expressão de mediadores pró-inflamatórios como a IL-1β, IL-6, MCP-1, TNF, COX-2 e iNOS (AHN; KIM, 2021). No teste de quimiotaxia observou-se uma redução na cinética neutrofílica nas concentrações de 10 ou 100 µg/mL sugerindo que o extrato possui a capacidade de alterar o processo de migração de neutrófilos em direção ao agente quimioatraente fMLP nessas concentrações. No modelo de eferocitose in vitro o resultado obtido demonstrou que os grupos tratados com o extrato nas concentrações de 1, 10 ou 100 µg/mL foram capazes de aumentar o processo de eferocitose. No sobrenadante do ensaio de eferocitose foram determinadas as concentrações de TNF e IL-10, ambas foram dosadas no sobrenadante da cultura das células tratadas na concentração de 10 µg/mL durante a junção dos dois diferentes tipos celulares. Os dados obtidos demonstraram que quando comparado com o grupo basal houve a redução da concentração de TNF e aumento de IL-10. No processo de eferocitose ocorre a ativação dos macrófagos do fenótipo M1 para o fenótipo M2, o que pode reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias como o TNF, CXCL-8, LBT4 e IL-6, e o aumento da liberação de mediadores anti-inflamatórios como a IL-10, fator de crescimento transformador beta (TGF-β) e moléculas pró-resolução (GE; HUANG; YAO, 2022). Os resultados obtidos in vitro foram reforçados por testes in vivo no presente estudo, onde a avaliação do processo de migração de leucócitos in vivo foi realizada utilizando o modelo de inflamação denominado bolsa de ar. Onde os efeitos do extrato sobre a migração de neutrófilos in vivo demonstra que quando comparado com o controle (carragenina 1%) os tratamentos nas doses de 30, 100 ou 300 mg/kg diminuíram a migração de leucócitos totais para o foco inflamatório, reduziram a concentração de proteínas totais nos lavado do infiltrado inflamatório de todas as concentrações testadas e redução da concentração de TNF e de IL-1β nos lavado do infiltrado inflamatório dos grupos tratados na dose de 30 mg/kg. A infiltração de neutrófilos em excesso, exacerba a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como o TNF, sendo assim a diminuição da migração de PMN provocada através do tratamento com o extrato, está diretamente relacionada a diminuição da secreção dessa citocina. A IL-1β é produzida pelos macrófagos teciduais, células dendríticas e outros tipos celulares em resposta a outras citocinas como o TNF. Assim a diminuição



dos níveis de IL-1 $\beta$  no exsudato pode ser devido a diminuição da produção de TNF o qual está relacionado a diminuição da infiltração de neutrófilos (MANTOVANI; et al., 2019).

### Considerações finais

Em conjunto, os dados obtidos demonstram que o extrato hidroalcoólico seco de flores de *T. erecta* apresenta importante efeito anti-inflamatório, devido à sua atividade inibitória sobre a migração de neutrófilos e na liberação de mediadores químicos, além de promover a eferocitose, evento chave na resolução da inflamação.

Palavras-chave: *Tagetes erecta* Linn; Inflamação; Neutrófilo; Macrófago

AHN, Y. J.; KIM, H.. Lutein as a Modulator of Oxidative Stress-Mediated Inflammatory Diseases. *Antioxidants*, v. 10, n. 9, p. 1448, 13 set. 2021

DEVIKA, R.; KOILPILLAI, J. COLUMN CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM TAGETES ERECTA LINN. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, v. 6, n. 2, p. 762-766, 1 fev. 2015

GE, Yun; HUANG, Man; YAO, Yong-Ming. Efferocytosis and Its Role in Inflammatory Disorders. *Frontiers In Cell And Developmental Biology*, v. 10, p. 1-15, 25 fev. 2022

GREEN, L. C. et al. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15N]Nitrate in Biological Fluids. *Analytical biochemistry*, v. 126, n. 13, p. 1-138, 1982

JAIN, M.; PARMAR, H. S. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. *Inflammation Research*, v. 60, n. 5, p. 483-491, 2011

KAULMANN, A.; BOHN, T.. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. *Nutrition Research*, v. 34, n. 11, p. 907-929, nov. 2014

KIM, J.; CHA, Y. N.; SURH, Y. J.. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, v. 690, n. 1-2, p. 12-23, ago. 2010

KUMAR, R. P.; ABRAHAM, A.. Inhibition of LPS induced pro-inflammatory responses in RAW 264.7 macrophage cells by PVP-coated naringenin nanoparticle via down regulation of NF- $\kappa$ B/P38MAPK mediated stress signaling. *Pharmacological Reports*, v. 69, n. 5, p. 908-915, out. 2017

MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M. A.; COSTANTINI, C.; JAILLON, S.. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 8, p. 519-531, 1 ago. 2011

MOLLIK, A. H.; HOSSAN, S.; PAUL, A. K.; TAUFIQ-UR-RAHMAN; JAHAN, R.; RAHMATULLAH, M.. A Comparative Analysis of Medicinal Plants Used by Folk Medicinal Healers in Three Districts of Bangladesh and Inquiry as to Mode of Selection of Medicinal Plants. *Ethnobotany Journal. Bangladesh*, p. 195-218. jul. 2010

NELSON, R. D.; QUIE, P. G.; SIMMONS, R. L. Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.:* 1950), v. 115, n. 6, p. 1650-6, dez. 1975.



PICCAGLIA, R.; MAROTTI, M.; GRANDI, S. Lutein and lutein ester contente in diferent types of *Tagetes patula* and *T. erecta*. *Industrial Crops And Products*, v. 8, n. 1, p. 45-51, 1998

SEDGWICK, A. D.; LEES, P.. Studies of eicosanoid production in the air pouch model of synovial inflammation. *Agents And Actions*, v. 18, n. 3-4, p. 429-438, jun. 1986

Apoio: UNIVALI, CAPES, FAPESC