

JULIO CESAR MACHADO JUNIOR

**ESTUDO *IN VITRO* DO POTENCIAL
IMUNOMODULATÓRIO DE PLANTAS MEDICINAIS
POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Dissertação apresentada como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná

Orientadora Prof^a Dr^a Almeriane Mana Weffort-Santos

CURITIBA

2005

BC / MUFPR
DOAÇÃO: Autor
R\$ 10,00
14/10/05

PRO0115717-3

BC/MUFPR MEMORIA DA UNIVERSIDADE F UO PARANA
AUTOR
R\$ 10 00 - Doacao
Termo No 558/05 Registro 379,840
21/10/2005

TERMO DE APROVAÇÃO

JULIO CESAR MACHADO JUNIOR

Título: "Estudo *in vitro* do potencial imunomodulatório de plantas medicinais por citometria de fluxo"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, área de concentração Análises clínicas.


Prof^a Dra. Almeriane Maria Weffort Santos
Orientadora


Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara
Universidade de São Paulo


Prof^a Dra Anita Nishiyama
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 30 de maio de 2005

DEDICATÓRIA

A minha esposa, Jerusa, meus pais e irmã

AGRADECIMENTOS

Foi de forma importantíssima, e em alguns casos fundamental a participação de algumas pessoas para a realização deste projeto, que, graças a Deus transcorreu de forma harmoniosa, tal como um concerto, que não teria acontecido sem a contribuição fundamental da Professora Almeriane Maria Weffort-Santos, que atuou como uma regente sinfônica, permitindo abertura investigativa e acrescentando notas e acordes tonais em momentos cruciais da evolução. Professora, aprendi muito com a senhora. Muito obrigado!

Agradeço, de forma muito especial, aos Professores Cid Aimbire Moraes Santos e Jose Domingos Fontana, pela direção técnica, e também a assistente/diretora pessoal Jerusa da Silva Machado, aos meus pais Julio Cesar Machado e Cila Alves dos Santos Machado, diretores financeiros e artísticos, a quem dedico esta obra.

Também agradeço aos arranjos de base, cordas e metais dos Professores Anita Nishiyama, Carlos Augusto Albini, Cynthia M T Fadel-Picheth, Luiz Claudio Fernandes, Maria Suely S Leonart Nilce Nazareno da Fonte, Paulo R Wunder Roberto Pontarolo, Rogerio Luiz Kopp, Sandra M W Barreira e Shirley R R Utiyama. Ao apoio da família, em especial Arlindo, Benta, Jenifer, Milena, Carlinhos, Ster, Bruna, Marquinhos, Leda, Marise, Oscar, Roberto, tia Marizete, dinda Bete, vo Oracelia, Nilson e Adelaide.

A equipe de estudo Angela, Fabiana e Jeanine da Hematologia, a Carina, Juliano, Patricia, Wesley, Vanessa e toda a meninada gentilmente cedida pelo Laboratório de Farmacognosia a Juliana e ao Mauricio, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Biotecnologia, e a Dalva, Everson e Vanessa, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Fisiologia, minha gratidão.

Agradeço aos incansáveis e sempre dispostos *roadies* Irene, Regina, Sandra, Geni e Ironi, aos pre-produtores Maique, Mauricio e Rogerio, e a percussão, cordas, sopros, baquetas e palhetas deixadas pelos afinadores Carla, Kettelyn, Mayra e Waldemar.

E de fundamental importância foi o pessoal da mesa, Paula, Patricia, Tulio, Suzane e Infante” e, em especial, a Aline (*pro tools*), Mauro (mixagem) e Cassiano (sonorização) – Uma mulher, Um homem e o Cara do Violão.

Agradeço, também, a compreensão recebida pelos meus novos companheiros de trabalho, Alisson Edna Maria Emilia, Maria do Pilar Marilde, Sandrely e Ulisses.

De forma geral, neste trabalho estão presentes inspirações nas artes de Johns, Pauls *and* Jimmys, Tons e Chicos, IRA! e o Nucleo Base. E conta com a segurança de Bill Gates, Colchões Castor e Verinha Walflor, porque “*a vida e aquilo que acontece enquanto fazemos planos para o futuro*” (John Lennon).

EPÍGRAFE

“Music is an emotional form of communication, emotions are the subjective correspondent to hormonal and neurophysiological processes, therefore, hormonal and neurophysiological changes are adequate means for interpreting the effectiveness of different forms of music on the immune response under stress conditions. Music significantly enhanced the number and the proliferative response of T cells and promoted the anti-tumor response of unstressed rodents” (Nunez et al , 2002)

SUMÁRIO

| | |
|---|-------------|
| DEDICATÓRIA | II |
| AGRADECIMENTOS..... | III |
| EPÍGRAFE | IV |
| ABREVIATURAS E SIGLAS..... | VII |
| LISTA DE FIGURAS E TABELAS | X |
| RESUMO..... | XII |
| ABSTRACT | XIII |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| O SISTEMA IMUNITARIO | 2 |
| <i>Celulas do sistema imunitario adaptativo</i> | 2 |
| <i>Linfocitos</i> | 2 |
| <i>Macrofagos</i> | 4 |
| <i>Funções dos elementos celulares envolvidos na resposta imunologica</i> | 5 |
| <i>Interação entre linfocitos e antígenos</i> | 7 |
| ATIVAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE LINFOCITOS | 7 |
| RESPOSTA DE LINFOCITOS A MITOGENOS | 9 |
| LECTINAS | 12 |
| TRANSFORMAÇÃO BLASTICA INDUZIDA POR FITOHEMAGLUTININA (MORFOLOGIA) | 15 |
| MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE IMUNOMODULATORIA <i>IN VITRO</i> | 15 |
| PLANTAS MEDICINAIS COMO AGENTES IMUNOMODULADORES | 18 |
| OBJETIVOS | 27 |
| OBJETIVO GERAL | 27 |
| OBJETIVOS ESPECIFICOS | 27 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 28 |
| SOLUÇÕES | 28 |
| ALCALOIDES | 29 |
| EXTRATOS | 29 |
| OBTENÇÃO DE LEUCOCITOS HUMANOS | 30 |
| ISOLAMENTO DE MONONUCLEARES HUMANOS | 31 |
| CONTAGEM CELULAR | 31 |
| TESTE DE VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE CELULARES | 31 |

| | |
|--|-----------|
| PREPARO DE CITOCENTRIFUGADOS | 32 |
| ENSAIOS DE IMUNOMODULAÇÃO | 32 |
| <i>Ativação de linfocitos avaliada morfológicamente (transformação blástica)</i> | 32 |
| <i>Ativação/proliferação de linfocitos avaliada por citometria de fluxo</i> | 33 |
| ANALISE ESTATÍSTICA | 33 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 34 |
| OBTENÇÃO DE LINFOCITOS | 35 |
| CITOTOXICIDADE DA FITOHEMAGLUTININA | 35 |
| EFEITOS DA FITOHEMAGLUTININA SOBRE A ATIVAÇÃO DE LINFOCITOS | 37 |
| EFEITOS DA FITOHEMAGLUTININA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE LINFOCITOS | 39 |
| EFEITO DE ALCALOIDES SOBRE A IMUNOMODULAÇÃO DE MONONUCLEARES | 44 |
| EFEITO DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS SOBRE A IMUNOMODULAÇÃO DE CELULAS MONONUCLEARES | 49 |
| CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS | 69 |
| REFERÊNCIAS | 71 |
| ANEXOS | 94 |

ABREVIATURAS & SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| AP-1 | Fator de ativação Proteína 1 (<i>Activation Protein-1</i>) |
| APC | Celulas apresentadoras de antígenos (<i>Antigen Presenting Cells</i>) |
| BrDU | Bromodeoxiuridina |
| C | Cadeia constante das imunoglobulinas |
| CD | <i>Cluster of Differentiation</i> |
| CF | Citometria de fluxo |
| CFSE | Succinimidil ester do diacetato de carboxifluoresceína (<i>Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester</i>) |
| ConA | Concanavalina A |
| D | Daltons |
| DNA | Acido desoxirribonucleico (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>) |
| DNA | Acido desoxirribonucleico |
| E | Eritrocitos de carneiro |
| EDTA | Acido etilenodiaminotetracético |
| ELISA | Enzima imuno-ensaio (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>) |
| FDA | Diacetato de fluoresceína (<i>Fluorescein Diacetate</i>) |
| FSC | <i>Forward Side Scatter</i> |
| G ₀ | Fase do ciclo celular em que as células não estão em processo de divisão |
| G ₁ | Fase do ciclo celular em que as células estão se preparando para entrar em atividade de intensa síntese |
| GALT | Tecido linfóide associado ao intestino |
| GM-CSF | fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos |
| H | Cadeia pesada das imunoglobulinas |
| HLA | Antígeno leucocitário humano (<i>Human Leukocyte Antigens</i>) |
| IgG ₂ | Imunoglobulina G ₂ |
| IgM | Imunoglobulina M |
| IgM-anti-E | Anticorpos IgM anti eritrocitos de carneiro |

| | |
|---------------|--|
| gs | Imunoglobulinas |
| IL | Interleucina |
| IL1 | Interleucina 1 |
| IL2-R | receptor para Interleucina 2 |
| IP | Índice de proliferação |
| L | Cadeia leve das imunoglobulinas |
| Laser | <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MALT | Tecido linfóide associado a mucosas |
| MAPK | Proteína quinase mitogênica-ativada (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>) |
| MBL | Lectina ligante de manose (<i>Mannose Binding Lectin</i>) |
| MHC | Complexo de histocompatibilidade principal (<i>Major Histocompatibility Complex</i>) |
| MLR | Reação aloantigênica de linfócitos (<i>Mixed lymphocyte Reaction</i>) |
| MNC | Células mononucleares |
| MTT | brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio |
| NFATc | Fator nuclear de células T ativadas (<i>Nuclear Factor of Activated T-Cells</i>) |
| NFkB | Fator nuclear kB (<i>Nuclear Factor kB</i>) |
| NK | <i>Natural Killer</i> |
| PBS | Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) |
| PHA | Fitohemaglutinina (<i>Phytohemagglutinin</i>) |
| PKC | Proteína C Quinase (<i>Protein Kinase C</i>) |
| PMN | Polimorfonucleares |
| PRP | Plasma rico em plaquetas |
| PWM | <i>Pokeweed Mitogen</i> |
| RNA | Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>) |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SSC | <i>Side Light Scatter</i> |
| TA | Temperatura ambiente |
| TcR | receptor de células T |
| Th | Células T auxiliares (<i>T helper</i>) |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor - alpha</i>) |

| | |
|-------------|--|
| UFPR | Universidade Federal do Parana |
| UV | Ultravioleta |
| V | Cadeia variavel das imunoglobulinas |

LISTA DE FIGURAS & TABELAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 Mecanismos de interação entre lectinas e o complexo TcR-CD3-CD28 para ativação e proliferação de linfócitos T via IL2 | 11 |
| Figura 2 Estrutura química de alguns alcalóides indólicos purificados da <i>Vinca rosea</i> (L) | 21 |
| Figura 3 Influência da fitohemaglutinina na viabilidade de mononucleares humanos <i>in vitro</i> | 36 |
| Figura 4 Efeito <i>in vitro</i> da fitohemaglutinina sobre a morfologia de linfócitos humanos | 38 |
| Figura 5 Estratégia para análise da ativação de linfócitos por citometria de fluxo | 41 |
| Figura 6 Efeito <i>in vitro</i> da fitohemaglutinina sobre a proliferação de linfócitos humanos | 43 |
| Figura 7 Efeito <i>in vitro</i> da vimblastina sobre a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina | 45 |
| Figura 8 Efeito <i>in vitro</i> da vindolina sobre a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina | 45 |
| Figura 9 Linfócitos e seu posicionamento no citômetro de fluxo | 46 |
| Figura 10 Efeito <i>in vitro</i> da perivina sobre a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina | 47 |
| Figura 11 Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Echinacea purpurea</i> sobre a proliferação <i>in vitro</i> de mononucleares humanos | 54 |
| Figura 12 Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Pfaffia glomerata</i> sobre a proliferação <i>in vitro</i> de mononucleares humanos | 56 |
| Figura 13 Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Bauhinia microstachya</i> sobre a proliferação <i>in vitro</i> de mononucleares humanos | 58 |
| Figura 14 Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Caryocar brasiliense</i> sobre a proliferação <i>in vitro</i> de mononucleares humanos | 60 |
| Figura 15. Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Hybanthus bigibbosus</i> sobre a proliferação <i>in vitro</i> de mononucleares humanos | 61 |
| Figura 16 Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Chamomilla recutita</i> sobre a proliferação <i>in vitro</i> de mononucleares humanos | 61 |
| Figura 17 Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Himatanthus lancifolius</i> sobre a proliferação <i>in vitro</i> de mononucleares humanos | 63 |

| | |
|---|----|
| Figura 18 Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Anchieta pyrifolia</i> sobre a proliferação <i>in vitro</i> de mononucleares humanos | 64 |
| Figura 19 Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Rauwolfia sellowii</i> sobre a proliferação <i>in vitro</i> de mononucleares humanos | 65 |
| Figura 20 Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Rauwolfia sellowii</i> sobre a proliferação <i>in vitro</i> de mononucleares humanos induzida por fitohemaglutinina | 66 |
| | |
| Tabela 1. Mitógenos suas características e células alvo | 9 |
| Tabela 2 Grupos químicos identificados nos extratos hidroetanólicos preparados de várias plantas medicinais usados na medicina caseira | 25 |
| Tabela 3. Avaliação de toxicidade de extratos preparados de diferentes plantas medicinais sobre células mononucleares humanas | 50 |
| Tabela 4 Presença de blastos estimulada por extratos preparados de diferentes plantas medicinais em cultura de linfócitos humanos | 51 |
| Tabela 5 Efeito de extratos de plantas medicinais sobre a proliferação de células mononucleares humanas | 53 |

RESUMO

Vários métodos *in vitro* têm sido empregados para a investigação de atividades biológicas de plantas usadas na medicina popular para o tratamento de doenças humanas. Os eventos associados a resposta imunológica são complexos e envolvem a ativação de vários elementos celulares, particularmente os linfócitos, e sua subsequente proliferação.

O desenvolvimento de técnicas de cultivo de linfócitos tem aplicação prática que se verifica em laboratórios de imunologia clínica, com o objetivo de diagnosticar indivíduos portadores de distúrbios relacionados a defesa imunológica mediada por células.

Este trabalho investigou os efeitos imunomodulatórios de extratos preparados das plantas popularmente conhecidas com equinacea, ginseng brasileiro, escada-de-macaco, pequi e pequizeiro, canela-de-veado, camomila, agoniada, cipo-suma e pau-pra-tudo, além dos alcalóides vimblastina, vindolina e perivina, sobre a transformação blastica e a proliferação de linfócitos humanos *in vitro*, induzida ou não pelo mitógeno fitohemaglutinina. Para tanto, utilizou-se a citometria de fluxo como metodologia principal.

Os resultados apresentados demonstraram ser a citometria de fluxo um método experimental capaz para se investigar a ação de substâncias puras ou complexas como extratos, por exemplo, sobre a transformação blastica de linfócitos humanos obtidos de sangue periférico, assim como para estudos de proliferação dessa população.

Como esperado, a vimblastina inibiu a proliferação de linfócitos induzida por fitohemaglutinina, assim como a perivina. Entretanto, para a vindolina não se observou nenhum efeito.

Extratos preparados de plantas medicinais agem de forma variada sobre a transformação e proliferação de linfócitos humanos. Os extratos de equinacea, camomila, de ginseng brasileiro e de escada-de-macaco demonstraram ser estimulantes da proliferação de linfócitos, atividade esta já relatada para a camomila, mas pela primeira vez descrita para a espécie de ginseng estudada e a escada-de-macaco. Em contraste, os extratos de canela-de-veado, de pequi e pequizeiro não demonstraram efeito, enquanto os extratos de agoniada e cipo-suma inibiram a proliferação de linfócitos humanos, provavelmente pela sua toxicidade. Já o extrato de pau-pra-tudo inibiu significativamente a proliferação de linfócitos humanos por atuar, provavelmente, sobre os mecanismos de ativação celular.

Palavras-chaves citometria de fluxo, extratos vegetais, imunomodulação, linfócitos humanos, fitohemaglutinina, transformação blastica

ABSTRACT

Several in vitro methods have been used for the investigation of the biological activities of herbal plants used in the folk medicine for the treatment of human diseases. The events associated with the immune responses are complex, and involve the activation of various cellular elements particularly the lymphocytes, followed by their proliferation.

The development of lymphocyte culture techniques has useful applications specially in the clinical immunology laboratory with the aim of diagnosing individuals suffering from disturbances related to the cellular-mediated immune defenses.

In this study, we have investigated the effects of extracts prepared from the plants popularly known as equinacea, Brazilian ginseng, escada-de-macaco, pequi, canela-de-veado, camomila, agoniada, cipo-suma, and pau-pra-tudo, apart from the indole alkaloids vinblastine, vindoline, and perivine upon the blastogenic transformation and the proliferation of human normal lymphocytes in vitro, in the presence or not of phytohemagglutinin, an efficient mitogen for human T cells. To accomplish this the flow cytometry was the main methodology.

The data herein presented showed that the flow cytometry is reliable as an experimental procedure for the evaluation of the effects of pure compounds or complex mixtures as plant extracts, for instances, upon the blastogenic transformation of human lymphocytes from peripheral blood as well as for proliferation studies of such population.

As expected, vinblastine inhibited the phytohemagglutinin-induced proliferation of lymphocytes as did perivine, while vindoline was inert.

Extracts prepared from the above plants have different effects upon the activation and proliferation of human lymphocytes. The echinacea, the chamomile, Brazilian ginseng, and escada-de-macaco extracts were stimulants for the proliferation of lymphocytes, activity already reported for chamomile, but for the first time described for the others. In contrast, canela-de-veado, pequi and pequi extracts were not active, while the agoniada and cipo-suma extracts were inhibitors of this activity, probably because of their cytotoxicity. Pau-pra-tudo extract showed a significant proliferation inhibitory effect, probably by acting upon the activation mechanisms.

Key words *flow cytometry, plant extracts, immunomodulation, human lymphocytes, phytohemagglutinin blastogenic transformation*

INTRODUÇÃO

Todos os seres vivos estão sujeitos a ações nocivas de substâncias de natureza diversificada que podem comprometer seu estado de saúde. Quando o agente agressor supera as linhas de defesa ou barreiras naturais exemplificadas pela pele, mucosa dos tratos gastrintestinal, respiratório e geniturinário, conjuntiva ocular, dentre outras, invadindo o hospedeiro, nele instala-se e, quando possível, multiplica-se causando quadros infecciosos e/ou inflamatórios. O agente agressor pode ser de natureza física, química ou biológica, destacando-se, nesta última categoria, microorganismos como bactérias, fungos, protozoários, vírus e outros parasitas multicelulares.

Numa infecção localizada, na maioria dos casos, a invasão é limitada por fatores inerentes ao microorganismo e a agressão ocorre nas células não só do tecido lesado, como também naquelas pertencentes aos tecidos adjacentes ao foco de invasão. Quando generalizada, os microorganismos alcançam diversos tecidos, distantes do foco primário de instalação. Há, também, microorganismos que liberam toxinas que exercem efeitos nocivos quando carregadas, pelo sangue ou linfa, para outros tecidos ou órgãos além do infectado (Margni, 1990).

Diante de uma lesão celular, independentemente do agente agressor, uma série de modificações no tecido conjuntivo vascularizado ocorre, com acúmulo de líquidos e recrutamento de elementos celulares com funções específicas, particularmente granulócitos neutrofilos ou polimorfonucleares (PMN), e macrófagos, ambos fagócitos por excelência, que objetivam a eliminação rápida do agente agressor e a reparação do tecido lesado, caracterizando a resposta inflamatória aguda. Simultaneamente, várias substâncias químicas são produzidas e liberadas pelo tecido lesado e por esses elementos celulares, amplificando a resposta inflamatória. Os fagócitos são, portanto, os elementos-chaves desta resposta celular inata e inespecífica, pois promovem o ataque direto ao agente causador (Cotran *et al* , 1994).

Sob certas circunstâncias, quando o processo reacional agudo não é suficiente para eliminar o agente causal e/ou reparar os danos locais, a reação inflamatória pode prolongar-se por dias ou mesmo por semanas ou meses, instalando-se então, um processo

reacional crônico com a infiltração de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos, além dos macrófagos e PMN já presentes (Cotran *et al* 1994)

O sistema imunitário

Após a instalação de um agente patogênico, o organismo reage para a eliminação do mesmo numa ação integrada entre os fagócitos, protagonistas da reação inflamatória, e as células do sistema imunitário ou imunológico

O local da infecção e o tipo de patógeno são fatores determinantes do tipo de resposta imunológica que será desencadeada. A resposta imunológica adaptativa desenvolve-se após o contato entre as células do sistema e um patógeno como, por exemplo, vírus, bactérias ou protozoários, o que lhe confere caráter de especificidade (Roitt *et al*, 2003). Estas células são capazes de identificar e reagir somente com as moléculas que são estranhas ao organismo

Um outro fator que colabora para a ativação do sistema imunitário adaptativo é o fato da agressão pelo agente ser recorrente, pois uma característica específica deste sistema é a produção de uma memória imunológica a partir da primeira infecção (Parham, 2001)

Células do sistema imunitário adaptativo

Devido às suas importantes características de memória, especificidade e reconhecimento do não próprio, o sistema imunitário adaptativo é mais rápido e eficaz na defesa do organismo. Os tipos celulares que medeiam esta reação são os linfócitos, em particular os B e T, e as células apresentadoras de antígenos (APC), representadas por uma coleção de monócitos, macrófagos e células dendríticas (Roitt *et al*, 2003)

Linfócitos

Os linfócitos são as principais células responsáveis pela resposta imunológica adaptativa. No ser humano, as células da linhagem linfóide originam-se a partir das mesmas células-tronco hematopoiéticas residentes na medula óssea que dão origem aos monócitos, granulócitos, eritrócitos e plaquetas presentes, subsequentemente durante a ontogenia, no saco vitelino, fígado e medula óssea (Lee *et al*, 1999). Nos indivíduos adultos, são continuamente produzidos às custas da proliferação controlada das células

linfóides primitivas presentes na medula óssea e no timo as quais dão origem a populações distintas de linfócitos

Antes de se tornarem células maduras e capazes de exercer funções específicas, os linfócitos passam por processos sucessivos para aquisição de imunocompetência no timo ou na própria medula óssea, denominados órgãos linfóides primários. Os que requerem um período de diferenciação no timo são denominados linfócitos T. Outros que continuam a diferenciar no próprio sítio produtor emergem como linfócitos B.

Mais de 70% dos linfócitos circulantes são representados pela linhagem T, os quais participam ativamente na defesa do organismo contra infecções causadas por agentes intracelulares. Enquanto estão no timo, os linfócitos T em desenvolvimento (ou timócitos) apresentam o marcador CD3 e diferenciam-se em duas linhagens, expressando receptores de membrana distintos, relacionadas com as suas funções efetoras, destacando-se as glicoproteínas CD4 e CD8 (Parham, 2001).

A fase de desenvolvimento dos timócitos envolve um exame crítico de receptores produzidos. A seleção positiva envolve células T que podem reconhecer peptídeos apresentados por moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) próprias, enquanto que a negativa elimina as células potencialmente auto-reativas, que poderiam ser ativadas por peptídeos normalmente apresentados por moléculas MHC na superfície das células saudáveis. É durante a seleção positiva que as células T CD3, primeiramente duplo-positivas para CD4 e CD8, irão se tornar células T CD3 de positividade única para CD4 ou CD8, sendo que as CD4 interagem somente com moléculas de MHC de classe II, enquanto as CD8 interagem somente com as moléculas de MHC de classe I (Parham, 2001).

Como é no tecido linfóide periférico que ocorrem as maiores chances dos linfócitos T encontrarem antígenos, após a fase de amadurecimento no timo, essas células, agora imunocompetentes, ficam circulando entre a corrente sanguínea e o tecido linfóide periférico até encontrarem o seu antígeno específico, quando, então, são induzidas a proliferar e se diferenciar em células T efetoras (Janeway, 2002). Fazem parte do tecido linfóide periférico, também chamado secundário, os linfonodos, a polpa branca do baço, o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e o tecido linfóide associado a mucosas (MALT), representado pelas amígdalas, placas de Peyer, apêndice, tecidos brônquico e mamário.

O encontro com um antígeno específico provoca a fase final do desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos T, onde as células CD8 tornam-se células T citotóxicas para as

celulas que expressam esses antígenos proteicos, enquanto as células CD4, sob influência de citocinas tornam-se células T auxiliares subtipos 1 ou 2 (Th1 e Th2, respectivamente), sendo que o tipo celular que predominara depende do patógeno e do tipo de resposta imunológica requerida (Parham, 2001)

Em contraste com o processo de amadurecimento dos linfócitos T os precursores dos linfócitos B são induzidos a diferenciar dentro da própria medula óssea, influenciados por várias citocinas produzidas pelas células estromais. Os eventos principais envolvem as populações celulares denominadas pro-B e pre-B, as quais centralizam elementos genéticos que codificam receptores específicos para células B, os quais são imunoglobulinas (Igs) especializadas expressas na superfície celular. Igs são moléculas heterodiméricas consistindo de cadeias pesadas (H) e leves (L), ambas contendo regiões variáveis (V) que contribuem na interação com o antígeno e que diferem na sequência de aminoácidos. Em adição, as cadeias L e H contêm regiões que são constantes (C). Todas essas cadeias contribuem para a diversidade de Igs produzidas quando linfócitos B encontram-se com um antígeno (Paul, 2003)

No sangue periférico, os linfócitos B representam de 5 a 15% da população de linfócitos circulantes. Enquanto sua ativação por antígenos proteicos requer a presença de linfócitos T, a qual é facilitada pela expressão de moléculas classe II do sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*), antígenos de natureza lipídica, glicolipídica ou constituídos de proteínas polimerizadas ou carboidratos estimulam células B diretamente

Macrófagos

Macrófagos fazem parte do sistema fagocitário mononuclear que se constitui de células de origem medular, incluindo os monocitos que trafegam no sangue periférico e os macrófagos tissulares. Dependendo do tecido ou órgão onde se encontram, recebem diferentes nomes, como células de Kupffer do fígado, histiocitos nos linfonodos, os macrófagos alveolares e os esplênicos, quando nos pulmões e no baço, respectivamente

De forma semelhante aos linfócitos, todos têm sua origem em um precursor comum residente na medula óssea, que dá origem aos monocitos do sangue periférico. Da circulação, os monocitos migram para os tecidos, onde se transformam em macrófagos, células com elevada capacidade fagocitária, responsáveis pela remoção de restos celulares e materiais estranhos particulados (Reeves e Todd, 2000)

Os macrófagos podem ser ativados, processo este que culmina com aumento do seu tamanho, elevação dos níveis de enzimas lisossômicas, metabolismo ativo e grande

habilidade de fagocitar e eliminar microorganismos. Sua ativação pode ser efetivada por meio de toxinas bacterianas, moléculas de adesão, citocinas secretadas por linfócitos T ativados e outros mediadores químicos presentes nas reações inflamatórias (Lee *et al*, 2003, Scott *et al*, 2003)

Após ativação, como elementos celulares centrais da inflamação crônica, os macrófagos passam a sintetizar e secretar várias moléculas biologicamente ativas, coletivamente chamadas citocinas, que são importantes mediadores das respostas inflamatória e imunológica (Homolka *et al*, 2003). Particularmente importantes são as citocinas produzidas que têm a habilidade de ativar linfócitos, os quais passam também a secretar mediadores, fechando e amplificando um círculo de respostas biológicas responsáveis não só pela eliminação de agentes invasores, mas também envolvidas nos processos para garantir o restabelecimento do organismo e desenvolver resistência.

Como células apresentadoras de antígenos (APC), os macrófagos têm a capacidade de reconhecer e, subsequentemente, internalizar antígenos, processá-los e, posteriormente, expor fragmentos destes para os linfócitos T por meio de moléculas de superfície específicas do MHC (Roitt *et al*, 2003)

Dessa forma, os macrófagos desempenham funções centrais na resposta imunológica, assim como o fazem na resposta inflamatória. Primeiro, eles são necessários para processar e apresentar antígenos aos linfócitos T imunocompetentes, pois, ao contrário das células B, as células T não são ativadas por antígenos solúveis. Segundo, eles produzem numerosas citocinas, dentre elas a interleucina 1 (IL1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), capazes de amplificar as respostas inflamatórias e imunitária. Também, são elementos capazes de lisar células tumorais pela produção de metabólitos tóxicos e enzimas proteolíticas, sendo importantes na vigilância imunológica (Cotran *et al*, 1994)

Funções dos elementos celulares envolvidos na resposta imunológica

O modo pelo qual um antígeno é reconhecido pelos receptores presentes na superfície dos linfócitos T e B é específico e isso reflete as diferentes funções dessas células após sua ativação pelo antígeno.

Um linfócito B ativado pode transformar-se num plasmócito produtor de imunoglobulinas específicas ao antígeno, inicialmente apresentado. A função desses anticorpos é ligar-se diretamente ao antígeno que lhe deu origem, com a finalidade de neutralizar sua atividade ou desencadear mecanismos de defesa que culminem na sua

eliminação Na prática, isso significa que células B podem interagir com o antígeno na sua forma nativa, sem modificações (Brostoff e Male 1994, Reeves e Todd, 2000)

Já os linfócitos T regulam a atividade das outras células do sistema imunitário ou eliminam as células infectadas Portanto, interações com outros tipos celulares são necessárias para que as células T possam desempenhar sua função Esta é uma das razões que explica porque, em contraste com os linfócitos B os T podem reconhecer e ser ativados por antígenos ligados a glicoproteínas específicas do MHC presentes na superfície das APC, codificadas pelos genes do HLA, processo que é denominado *duplo reconhecimento*, pois receptores de células T não se ligam ao antígeno ou as moléculas do MHC independentemente, mas a combinação de ambos

A função básica das APC é ativar linfócitos T e eliminar por endocitose, células alvo que foram mortas por estes, ou eliminar antígenos que foram neutralizados por anticorpos

Muitos antígenos em seu estado natural não conseguem se associar eficientemente as moléculas do MHC e o fazem somente após terem sido processados pelas APC Este processamento envolve sua parcial degradação enzimática, liberando unidades peptídicas de tamanho e sequência apropriada para se ligarem as moléculas do MHC e, então, servirem como epítopos para ligação de linfócitos T Relevante é o fato de que esses determinantes antigênicos podem ser originados de qualquer parte do antígeno original e um corolário disto é que linfócitos T e B podem interagir com epítopos totalmente diferentes e, ainda assim, demonstrar especificidade para o mesmo antígeno (Brostoff e Male, 1994, Reeves e Todd, 2000)

É importante ressaltar que todos os tipos celulares acima citados também têm, como função a liberação de citocinas, as quais estimulam e amplificam a resposta ou a suprimem quando o agente for totalmente erradicado

Dessa forma, a ativação e o desempenho de funções pelos linfócitos T e B requerem sua interação, assim como com outros tipos celulares Como já visto, as oportunidades para que esses contatos ocorram são maximizadas pela recirculação dos linfócitos através de todo o organismo e pela sua manutenção nos órgãos linfoides secundários, levando ao desenvolvimento do vasto repertório imunológico observado em indivíduos normais (Reeves e Todd, 2000)

Interação entre linfócitos e antígenos

Os eventos celulares que decorrem da ativação de um linfócito são denominados coletivamente de transformação blastica e as células resultantes deste processo são referidas como células efetoras da resposta imunológica. Morfologicamente são caracterizados como linfoblastos e possuem elevada capacidade proliferativa. Como resultado, observa-se um aumento do número de células, da produção e secreção de citocinas, assim como de expressão de receptores específicos.

As células efetoras, originadas da ativação de linfócitos T CD4, proliferam dando origem a células auxiliares, responsáveis pela propagação da resposta imunológica por meio da produção e secreção de mediadores químicos, as interleucinas (IL). Os linfócitos T CD8, após contato com o antígeno, ativam-se e proliferam, originando células capazes de produzir grandes quantidades de citocinas, que são secretadas objetivando a eliminação do agente agressor.

No caso de linfócitos B, após transformação, muitos proliferam dando origem aos plasmócitos, células efetoras especializadas na síntese de imunoglobulinas que são, então, secretadas como anticorpos livres, como já citado anteriormente.

Outros linfoblastos formam uma população de memória específica para o antígeno que induziu a resposta primária, readquirindo o aspecto morfológico do linfócito inicial. São essas células que, quando re-expostas ao mesmo antígeno ou a outro cuja estrutura antigênica seja muito semelhante, produzem uma rápida e vigorosa resposta imunológica, chamada secundária (Reeves e Todd, 2000).

Ativação e proliferação de linfócitos

Ativação de linfócitos decorre da interação entre um antígeno e o receptor presente na superfície celular com o qual ele pode interagir. Em células CD4, por exemplo, este evento culmina com a proliferação, diferenciação e produção de citocinas que medeiam as funções específicas de células T efetoras, como já citado. Eventos subsequentes, que ocorrem em segundos ou minutos após a interação ligante-receptor, incluem mudanças no fluxo de cátions monovalentes (Na^+ e K^+) e a ativação de Ca^{++} -transferases. Ao mesmo tempo, síntese e utilização de fosfolípidos aumentam, envolvendo fosfatidilinositol, um constituinte dos fosfolípidos de membrana. Influxo de Ca^{++} é central na ativação de linfócitos e ocorre em menos de 5 minutos após interação do mitógeno fitohemaglutinina,

Resposta de linfócitos a mitógenos

Certas substâncias possuem a habilidade de ativar e, subsequentemente, induzir a proliferação de linfócitos T B ou de ambos *in vitro* sendo genericamente denominados mitógenos (Gery *et al* 1972, Gery e Waksman, 1972, Janossy e Greaves 1972, Oppenheim e Rosenstreich 1976) A Tabela 1 mostra uma seleção dessas substâncias e sua especificidade com referência a população estimulada

Tabela 1. Mitógenos: suas características e células alvo.

| MITÓGENO | FONTE | TAMANHO MOLECULAR (D) | CÉLULAS ALVO | ESPÉCIE(S) |
|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------|------------------|----------------------|
| Concanavalina A (ConA) | <i>Canavalia ensiformis</i> | 55 000 | linfócitos T | humana camundongo |
| Fitohemaglutinina (PHA) | <i>Phaseolus vulgaris</i> | 140 000 | linfócitos T | humana camundongo |
| Pokeweed mitogen (PWM) | <i>Phytolacca americana</i> | 32 000 | Linfócitos T e B | humana camundongo |
| Lipopolissacarídeo (LPS) | Bactérias gram negativas | 1-24x10 ⁶ | linfócitos B | roedores |
| Dextran sulfato | - | 500 000 | linfócitos B | - |

Adaptado de Myers, 1995

Enquanto a resposta a antígenos dos linfócitos *in vivo* é específica, gerando amplificação clonal, sua resposta a mitógenos *in vitro* é inespecífica e influencia, simultaneamente, um grande número de células, levando-as a sofrer transformação blastica e, posteriormente prolifera

Diferente do que acontece *in vivo*, esse estímulo a proliferação não depende de células apresentadoras de antígenos, embora os mesmos mecanismos bioquímicos estejam aparentemente envolvidos (Burgermeister *et al*, 2003) Esta propriedade favorece estudos

por exemplo, com receptores presentes na superfície de linfócitos humanos. Após algumas horas dessa interação ligante-receptor, a síntese de proteínas aumenta, alcançando um pico entre 48 e 72 horas. Neste período, ocorre aumento da síntese de RNA, assim como há síntese de várias proteínas (Cooper 1972). O conteúdo de RNA em linfócitos dobra em 48 horas e reflete-se em alterações morfológicas distintas da célula. Finalmente, aumento da síntese de DNA, a marca registrada da proliferação celular, inicia-se após cerca de 36 horas, atingindo níveis máximos entre 48 e 72 horas (Greaves e Janossy, 1972).

Para que a proliferação celular ocorra, fatores de transcrição que são ativados simultaneamente a interação ligante-receptor, representam intermediários essenciais, os quais traduzem e direcionam sinais extracelulares em respostas transcricionais específicas. A regulação combinada da transcrição envolve complexos multiproteicos que se ligam de forma cooperativa a regiões específicas do DNA alvo. Esta interação permite a convergência de diferentes sinais para uma região definida do DNA, a qual, por sua vez, exerce controle regulatório rigoroso sobre a expressão dos genes alvos em resposta aos sinais recebidos.

Neste contexto, complexos formados por fatores de transcrição da família NFATc, por exemplo, junto com proteínas AP-1 e ras, integram vias de sinalização dependentes de Ca^{++} , as quais regulam a expressão de genes que codificam proteínas imunomoduladoras como IL2, IL4, IL3/GM-CSF, TNF- α , CD40 e Fas (Rao *et al*, 1997, Feske *et al*, 2000, Trama *et al* 2000).

A replicação de linfócitos T é muito particular e é determinada pela interação de IL2 com seus receptores (IL2-R) em níveis significativos para desencadear esta ação. Entretanto, células T não expressam IL2-R ao menos que sejam estimuladas por antígenos, anticorpos monoclonais específicos para células T, lectinas mitogênicas ou forbol ester, por exemplo. Além disso, uma vez exposta a esses agentes, cada célula T expressa IL2-R de forma individual, entrando em fases proliferativas do ciclo celular de forma assíncrona. Se níveis de IL2 não se mantiverem contínuos, a expressão de IL2-R se mantém, mas a síntese de DNA não ocorre, uma vez que a interação com IL2-R é o fenômeno crucial para que ocorra a replicação do DNA (Cantrell e Smith, 1984).

Um outro ponto de relevância é que a expressão de IL2-R é dependente da presença de antígeno e a retirada do estímulo do meio leva a queda progressiva de seus níveis. Em paralelo, há o declínio, também progressivo, da proliferação celular e todas as células, eventualmente, passam a se apresentar na fase G₀ do ciclo celular, mesmo na presença de concentrações saturantes de IL2 (Smith e Cantrell, 1985).

experimentais e Fitohemaglutimna (PHA) e Concanavalina A (ConA), lectinas extraídas e purificadas de plantas (Tabela 1) que estimulam sub-populações de células T têm sido usadas como mitógenos para estudos de proliferação dessas populações *in vitro* e a resposta resultante pode ser utilizada para qualificar e quantificar a imunocompetência dessas células (Myers, 1995)

Como já visto, o primeiro passo para a ativação de um linfócito reside na interação de receptores de superfície com um agente estimulante. A interação de um mitógeno com o receptor das células T (TcR), por exemplo, também inicia, na célula, eventos que envolvem o recrutamento de íons cálcio e a ativação simultânea das enzimas tirosina quinases citossólicas fosfolipase C γ e A $_2$, proteína C quinase (PKC), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e calcineurina. Estas, por via de cascatas metabólicas específicas, produzem sinais direcionados ao núcleo, promovendo a transcrição de fatores pro-mitóticos, tais como NF κ B, AP-1 e NFAT. Estes, por sua vez, conduzem os eventos da proliferação e a síntese de IL2, a qual é o principal mediador químico da amplificação da resposta imunológica (Figura 1)

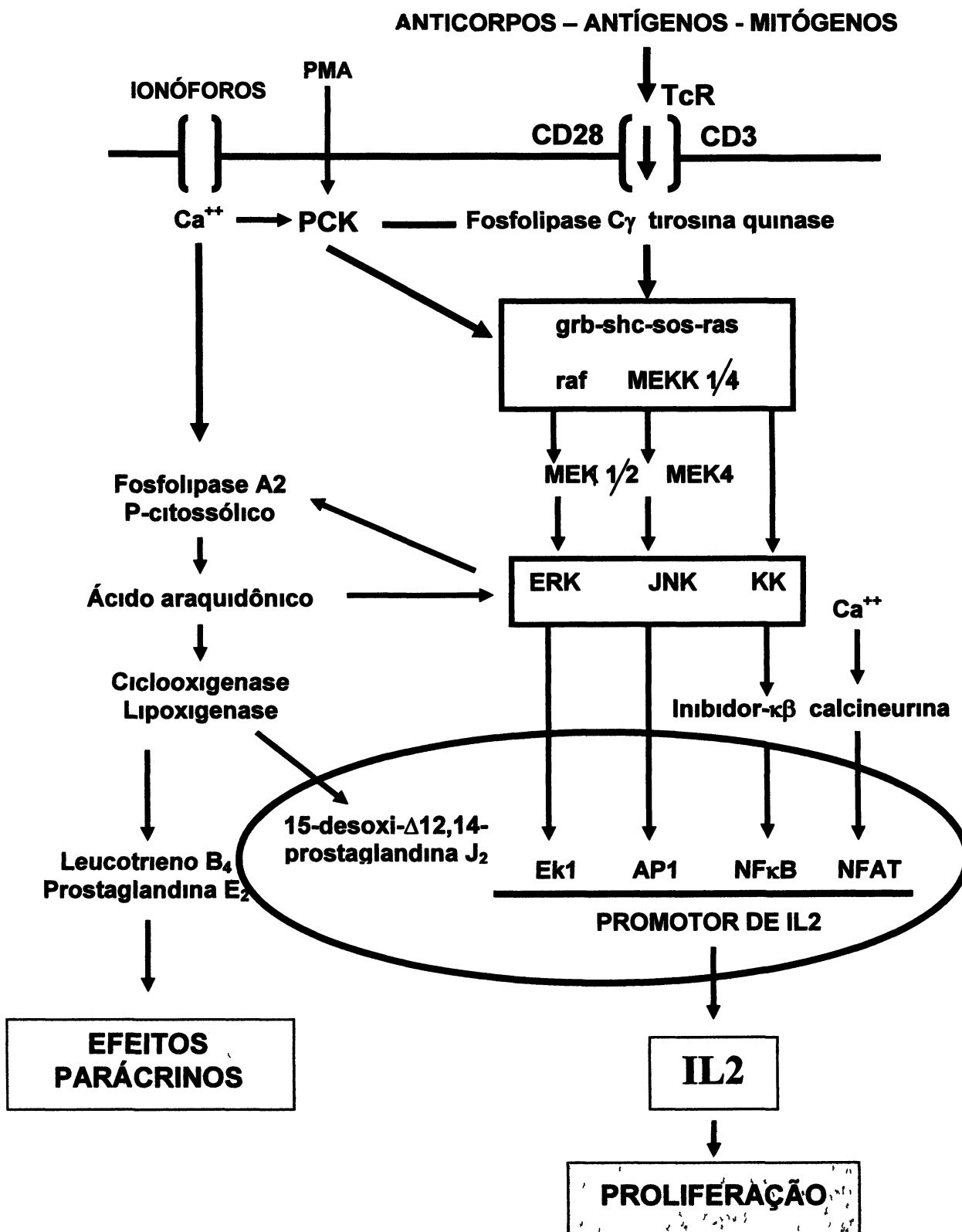


Figura 1 Mecanismos de interação entre lectinas e o complexo TcR-CD3-CD28 para ativação e proliferação de linfócitos T via IL2.

Lectinas

Citadas pela primeira vez por Stillmark em 1888 as proteínas capazes de aglutinar eritrócitos foram denominadas fitohemaglutininas, baseadas no fato de terem sua origem em plantas e, ao mesmo tempo, aglutinarem eritrócitos de diferentes animais (Goldstein e Hayes, 1978) Verificou-se que proteínas com atividade hemaglutinante são, também, encontradas em uma infinidade de seres vivos, como bactérias, vírus, fungos, líquens, peixes, moluscos e mamíferos (Gabiús e Gabiús, 1993)

O termo lectina, do latim *legere*, ou selecionar, foi proposto após a observação de que algumas proteínas provocavam aglutinação de forma seletiva para os diferentes grupos sanguíneos humanos (Boyd e Shapleigh, 1954a) Hoje, sabe-se que são apenas algumas destas que têm capacidade seletiva de hemaglutinação, mas a denominação *lectina* continua

Em função dos inúmeros estudos realizados sobre estrutura química, propriedades e atividades, o conceito atual para lectinas e o de serem proteínas, ou glicoproteínas, de origem não imune, que se ligam de forma não covalente a carboidratos com configuração apropriada Esta interação lectina-açúcar é específica e de alta afinidade, podendo ocorrer com carboidratos localizados na superfície das células, como açúcares livres e, ainda, com a parte glicídica de glicoconjugados extracelulares (Lis e Sharon, 1973, Freed, 1985)

As propriedades químicas e biológicas relatadas até o momento tomam, como referência, a ligação lectina-açúcar e um fato interessante neste aspecto é a capacidade que determinados açúcares livres têm de inibir alguns efeitos das lectinas Esta propriedade é tão fundamental que as lectinas podem ser classificadas em grupos de acordo com o carboidrato inibidor Esta ligação envolve forças de Van der Waals, causada por combinações de hidrogênios da proteína com grupos hidroxilas do açúcar, geralmente incluindo acoplamento de uma face hidrofóbica do açúcar com o lado de aminoácido aromático das cadeias peptídicas (Weis e Drickamer, 1996) Enzimas, como a tripsina ou carbohidrases, por exemplo, aumentam a atividade das lectinas, provavelmente por facilitarem a aproximação com seu sítio glicídico ativo

Além da afinidade com açúcares, a ação de uma lectina depende da conformação estrutural (monômero, dímero, tetrâmero, etc) e de seu tamanho Além disso a maioria das lectinas necessita estar ligada a metais iônicos divalentes e/ou covalentemente a açúcares, no caso das lectinas glicoproteicas, que servem como cofatores, mantendo sua conformação ativa Outras propriedades, como percentuais e sequências de aminoácidos,

ponto isoeletrico, peso e forma moleculares são também, de fundamental importância para se compreender os efeitos descritos para as lectinas

A função das lectinas na natureza ainda não foi totalmente elucidada. Especula-se que, em um mesmo organismo, as lectinas possam exercer funções específicas e distintas ou mesmo ter múltiplas ações. Em plantas, supõe-se um papel imunológico inespecífico quando, durante a germinação e crescimento das sementes, interagem com açúcares expostos na superfície de microorganismos. Esta função protetora também é atribuída contra ataques de insetos predadores (Janzen *et al* , 1976, Zhu-Salzman e Salzman, 2001). Função simbiótica entre bactérias e plantas também já foi proposta (Bohloul e Schmidt, 1976). Em bactérias, algumas lectinas são encontradas na superfície e parecem estar envolvidas com a aderência às células epiteliais, o que parece ser fundamental, por exemplo, no início da infecção da *Escherichia coli* nos tratos urinário e gastrointestinal (Sharon, 1987). O mesmo parece ocorrer em protozoários, como a *Entamoeba histolytica* (McCoy *et al* , 1994, Mann 2002).

Já em animais superiores, as lectinas são encontradas na forma solúvel e ligadas a membranas. Assim, funções como mediação da pinocitose de glicoproteínas modificadas (Ashwell e Harford, 1982), interações intercelulares durante a resposta imunológica (Liu, 1993) e a fertilização (interação da lectina presente no acrossoma da célula sexual masculina com uma glicoproteína de superfície do ovulo) (Wassarman, 1987) já foram também propostas.

Em humanos, uma lectina ligante de manose (MBL) foi identificada e tem sido caracterizada como responsável pela ativação do sistema complemento por uma via específica (Turner e Hamvas, 2000). Por se ligar e aglutinar patógenos (Jack e Turner, 2003), parece estar envolvida na proteção contra agentes infectantes diretamente, ou indiretamente, ao ativar e amplificar a resposta imunológica inata, atuando na opsonização, fagocitose, adesão, migração, ativação, diferenciação e apoptose celular (Ni e Tizard, 1996). Neste contexto, lectinas atuam como ativadoras do sistema complemento, limitando uma infecção, por exemplo, e a orquestração da resposta imunológica subsequente (Gadjeva *et al* , 2004).

Entretanto, a propriedade mais intensa e determinante para que houvesse interesse no isolamento desta classe de proteínas refere-se a sua intensa capacidade aglutinante, a qual, quando altamente seletiva e específica, tem permitido que algumas lectinas sejam usadas para a fenotipagem de grupos e subgrupos sanguíneos (Boyd e Shapleigh, 1954b, a, Judd *et al* , 1978, Judd, 1980, Hamada *et al* , 2002, Khan *et al* , 2002), na identificação de

celulas infectadas e celulas cancerosas as quais têm alteração da superfície da membrana (Vu Van *et al* , 1971, Sharon e Lis 1972 Boldt e Zimmer 1983, Haar *et al* , 1985, Bychkov e Toto, 1986, Tamaki *et al* 1986, Soderstrom, 1988, Bogdanov *et al* , 1989, Caldero *et al* 1989, Imamura *et al* 1989, Seigel e Notter, 1992), e na tipagem de microorganismos (Muhlpfordt *et al* , 1984, Svennerholm *et al* 1984 Korting *et al* , 1988, Chatterjee *et al* , 1989, O'Sullivan *et al* , 1990, Jarlov *et al* , 1992, Korting e Abeck, 1992, Jarlov *et al* , 1993, Moyes e Young, 1993, Munoz *et al* , 1994a Hynes *et al* , 1999, Munoz *et al* , 1999, Aabenhus *et al* , 2002, Munoz *et al* , 2003)

A industria farmacêutica explora a propriedade das lectinas em promover muco-adesão, cito-adesão e cito-invasão, para formarem complexos lectina-droga que possam auxiliar na biodisponibilidade de um farmaco (Bies *et al* 2004, Gabor *et al* , 2004)

O interesse pelas lectinas na area da Imunologia aumentou na decada de 60, com os estudos com a PHA isolada de sementes de *Phaseolus vulgaris*, onde o autor foi o pioneiro na descoberta da capacidade que alguma lectinas têm de estimular *in vitro* a transformação morfológica dos linfócitos e sua proliferação (Nowell, 1960)

Esta ação mitogênica passou, então, a ser amplamente usada em estudos morfológicos e funcionais, particularmente dos linfócitos, assim como para o diagnostico de imunodeficiências e monitoração dos efeitos de imunossupressores e imunoterapicos (Sharon, 1983) Presume-se que, em linfócitos T, estas lectinas ligam-se ao complexo receptor de celula T (TcR) e promovem um sinal co-estimulante positivo, levando a síntese de IL2 e seus receptores (Kilpatrick, 1999)

Embora, em sua maioria, as lectinas sejam ativadores policlonais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, outras podem apresentar um espectro diversificado de atividades sobre linfócitos humanos, sendo que a mesma lectina pode ser mitogênica, co-mitogênica ou ate mesmo anti-mitogênica, dependendo das condições experimentais vigentes

Estudos de interação entre algumas lectinas e anticorpos monoclonais têm demonstrado que uma grande variedade de moleculas da superfície celular pode exercer influência na iniciação e regulação da ativação e proliferação dos linfócitos (Kilpatrick, 1999), sugerindo sua aplicação no tratamento de doenças auto-imunes e na prevenção de rejeição apos transplantes (Ashraf e Khan, 2007)

E interessante relatar que as lectinas e a Imunologia estiveram relacionadas desde 1890, onde a especificidade da reação antígeno-anticorpo, principio fundamental desta ciência, foi estabelecida por Paul Ehrlich, em estudos com camundongos que produziam anticorpos contra as lectinas abrina e ricina (Sharon, 1983)

A busca pelo melhor entendimento das ações imunomoduladoras das lectinas continua intensa e sua maior fonte continua sendo os extratos preparados de plantas e de preferência, aquelas oriundas de vegetais comumente utilizados pela população para fins terapêuticos

Transformação blástica induzida por fitohemaglutinina (morfologia)

Linfócitos obtidos de sangue periférico humano apresentam-se como células pequenas, com cerca de 10 µm de diâmetro, arredondadas, contendo citoplasma geralmente escasso, desprovido de granulação específica e núcleo também arredondado, irregularmente denso, com eventual presença de nucleolos (Lee *et al*, 1999) Quando transformados por ação da fitohemaglutinina, apresentam-se com morfologia de células imaturas, com aumento proporcional do volume do núcleo e do citoplasma. Formam vesículas lisossômicas características, as quais se correlacionam com o aumento de atividade endocítica dessas células. Esse sistema vacuolar altamente diferenciado consiste de vesículas endocíticas, estruturas multivesiculares e corpos densos (Biberfeld, 1971a) e estão envolvidos na captura, transporte, armazenamento e digestão de material endocitado. Linfócitos transformados pela PHA possuem de 10 a 20 µm de diâmetro e citoplasma azul intenso, quando observados sob coloração panóptica, resultante de intensa síntese de RNA (Douglas, 1972). Além disso, há aumento da quantidade de agrupamentos ribossômicos e o complexo de Golgi mostra-se bem desenvolvido (Biberfeld, 1971b). Em culturas contendo PHA, figuras de mitose podem ser observadas após 40 horas, com pico máximo em 72 horas. O núcleo dessas células aumenta e torna-se leptocromático, ou seja, com cromatina constituída por filamentos muito finos, e os nucleolos aumentam de tamanho (Biberfeld, 1971b).

Métodos de avaliação de atividade imunomodulatória *in vitro*

São várias as metodologias *in vitro* utilizadas para quantificar a ativação e a proliferação celulares. Entre estas estão os ensaios que incluem a incorporação de nucleotídeos radioativos, a redução de sais tetrazólio, a incorporação de agentes fluorescentes, a incorporação de análogos de pirimidina e a análise por citometria de fluxo.

Na metodologia mais utilizada atualmente a proliferação de linfócitos e mensurada através da incorporação de nucleotídeos radioativos, como [³H]-timidina, ⁵¹Cr, [¹²⁵I]-iodo-deoxiuridina ou a [³H]-uridina, no DNA celular durante a replicação e a resposta proliferativa e determinada comparando-se o número de radiomarcador incorporado nas distintas populações celulares (Brunner *et al* 1968, Gillis *et al* , 1978)

As vantagens deste método são suas altas sensibilidade e reprodutibilidade, porém muitas são as desvantagens (I) a manipulação de componentes radioativos requer precauções especiais de segurança, tais como salas e equipamentos exclusivos, além de (II) proteção e treinamento pessoal especializado, (III) e uma metodologia que envolve trabalho detalhado e minucioso em várias etapas, as quais podem aumentar as chances de erro e contaminação, (IV) o tempo consumido para cada série de experimentos é longo, (V) promove a lise das células, não permitindo (VI) análises morfológicas, (VII) ensaios funcionais ou (VIII) imunofenotipagem subsequentes, restringindo sua utilidade para estudos que visem a elucidação dos mecanismos de ação quando presentes

A redução de sais tetrazólio como o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazolil]-2,5-difeniltetrazólio), o MTS (3-[4,5-dimetiltiazolil]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfonil]-2H tetrazólio) e o XTT (ácido hidrato de benzeno sulfônico de sódio 3'-[1-fenilamino-carbomil]-bis[4-metoxi-6-nitro]-3,4-tetrazólio), por enzimas succinato tetrazólio redutases situadas em mitocôndrias de células viáveis, resulta na formação proporcional de produtos de formazan, os quais, por serem coloridos, podem ser doseados em ensaios espectrofotométricos para análises de toxicidade, ativação e proliferação celulares (Mosmann, 1983) É um método de relativo baixo custo, sensível e de rápida aplicação necessitando como equipamento, na maioria das vezes, uma leitora de ELISA, permitindo o processamento simultâneo de um grande número de amostras

A citometria de fluxo vem sendo uma ferramenta importante no estudo dos eventos celulares envolvidos na resposta imunológica e inclui métodos para a avaliação de efeitos sobre a população analisada, como, por exemplo, ativação e proliferação celulares, para a identificação de eventuais modificações que ocorrem dentro e fora das células e na análise das substâncias produzidas e secretadas pelas células em estudo (Shapiro, 1985)

Esta versatilidade deriva da múltipla e independente quantidade de análises das características físicas e químicas das células, as quais são individualmente conduzidas por um canal de corrente fluida que intercepta um ou mais feixes de luz provenientes de um raio *laser*. Ao passarem pelos raios, as células causam dispersão da luz em várias direções, a qual depende do tamanho e da estrutura interna de cada célula (Macey, 1994) Também,

moléculas fluorescentes quando ligadas as células, podem ser excitadas e subsequentemente emitir luz de acordo com a natureza da molécula fluorescente (Assenmacher *et al* , 1995)

A luz dispersa e/ou a fluorescência emitida são, então, coletadas por diferentes sensores os quais, por sua vez convertem-na em sinais elétricos que são amplificados e transferidos a processadores matemáticos. Estes produzem um conjunto de números que ao serem analisados caracterizam diferentes populações celulares. O feixe de luz que passa pela partícula com um mínimo de desvio está relacionado com o tamanho celular (*forward light scatter - FSC*), enquanto aquele que capta o desvio ortogonal aos eixos do fluido celular e do raio laser (*side light scatter - SSC*) está relacionado com a complexidade interna da célula em particular sua granularidade e a forma nuclear (Shapiro, 1985, Robinson, 1993, Macey, 1994)

Os resultados emitidos por um citômetro de fluxo são, de fato, originados de uma combinação de sinais que refletem não só o tamanho e a complexidade interna de cada tipo celular analisado mas também incluem suas características topográficas e de densidade óptica (Shapiro, 1985). Todos os citômetros de fluxo têm a capacidade de analisar vários parâmetros celulares simultaneamente e converter esta análise em gráficos de coordenadas x e y , podendo se apresentar como histogramas, gráficos de pontos, de densidade ou mesmo de contorno (Macey, 1994). A escolha do tipo de gráfico repousa naquele que melhor representara ou traduzira os resultados obtidos.

Em um gráfico que relaciona tamanho (FSC) por complexidade interna (SSC), linfócitos humanos com as características morfológicas já descritas anteriormente compõem a população que ocupa a área inferior esquerda do gráfico (Civin e Loken, 1987). Já linfócitos transformados pela ação de um mitógeno como a fitohemaglutinina, por exemplo, aparecerão, no gráfico, deslocados um pouco acima e à direita dos linfócitos não ativados, por possuírem maior tamanho e complexidade interna, apresentando-se com morfologia característica de células primitivas ou blasticas (linfoblastos), com diâmetro de 10 a 20 μm , citoplasma geralmente vacuolizado, complexo de Golgi bastante desenvolvido, núcleo com cromatina delicada, apresentando dois ou mais nucleolos proeminentes e bem delineados (Civin e Loken, 1987, Lee *et al* , 1999)

A disponibilidade de corantes fluorescentes que interagem especificamente com estruturas celulares permite o uso da citometria de fluxo para analisar eventos moleculares como, por exemplo, estudar as fases do ciclo generativo de uma população celular. Neste contexto o uso de fluorocromos, como o brometo de etídio e iodeto de propídio, que se

intercalam com as moléculas de DNA permite a identificação da fase do ciclo celular em que a célula se encontra pela determinação do seu conteúdo em DNA. Entretanto, estas análises avaliam a atividade celular, mas não determinam a proporção ou o número de células em divisão.

Uma alternativa para análise da proliferação celular por citometria de fluxo emprega a marcação das células com bromodeoxiuridina (BrdU), um análogo da pirimidina, onde a porcentagem e o tipo celular em síntese ativa de DNA podem ser identificados com anticorpos anti-BrdU ligados a moléculas fluorescentes (Kubbies *et al* 1985).

Mais recentemente, reagentes fluorescentes, como o diacetato de fluoresceína (FDA) e succinimidil ester do diacetato de carboxifluoresceína (CFSE), inicialmente utilizados como corantes marcadores de células viáveis, têm se tornado ferramentas importantes para ensaios que envolvem estudos de proliferação celular por citometria de fluxo. Estas substâncias originalmente não emitem fluorescência e atravessam passivamente a membrana plasmática. Após difusão no meio intracelular, sofrem ação de esterases endógenas, as quais removem, por hidrólise, o grupo acetato. Esta ação confere, a molécula, alta fluorescência e, por ficar retida no interior das células, confere-lhes, sob luz azul, fluorescência verde. Em adição, o grupo succinimidil, liberado pela ação enzimática, reage com o grupamento amina de proteínas intracelulares, proporcionando, também, coloração às células viáveis. Durante todo o processo que antecede a divisão mitótica, o agente fluorescente permanece distribuído homogeneamente no citoplasma celular. Após a divisão, reduz-se em 50% a quantidade de corante nas células recém formadas, diminuindo, portanto, a intensidade do brilho de cada célula. Dessa forma, pode-se avaliar a quantidade de ciclos mitóticos de uma população celular pela análise da queda da fluorescência emitida, a qual é diretamente proporcional ao número de vezes que a célula se divide (Lyons, 2000).

Plantas medicinais como agentes imunomoduladores

O uso de plantas medicinais no tratamento de diversos tipos de doenças é tradicional na cultura humana e os serviços de saúde e as instituições a eles ligados devem estar voltados para o aproveitamento deste conhecimento popular (Eldin e Dunford, 2001). Esta preocupação parece estar presente em nosso país, pois como fruto de deliberações

ocorridas durante a 10ª Conferência Nacional de Saúde realizada em Brasília em 1996 ressaltou-se *a incorporação no SUS, em todo o país de práticas de saúde como a fitoterapia, a homeopatia e a acupuntura (parágrafo 286 12) (Saúde, 1996)* , deliberando-se também sobre *“terapias alternativas e práticas populares (parágrafo 351 10), além do incentivo a fitoterapia e a homeopatia na assistência farmacêutica pública” (Saúde, 1996)*

A fitoterapia ressurgiu, então, como uma opção medicamentosa bem aceita e, quando doméstica, acessível a todos. Atualmente, cerca de 80% da população dos países de terceiro mundo faz uso de produtos naturais para o tratamento de problemas primários de saúde (Mans *et al* , 2000). Mesmo em países industrializados, uma grande porcentagem dos produtos farmacêuticos comercializados provém de produtos naturais (Eldin e Dunford, 2001), representando, no mundo, cerca de 30% das vendas de drogas (Grabley e Thiericke, 1999).

Assim, os produtos extraídos de plantas medicinais continuam a representar uma diversidade química única a qual continuará a ser uma fonte importante de compostos-modelo para programas de investigação clínica iniciados a partir da observação das espécies de plantas regionais popularmente utilizadas.

De acordo com estudos de Willianson e colaboradores, estima-se que o planeta Terra possua entre 370 000 e 500 000 vegetais superiores que elaboram metabólitos secundários com potencial interesse medicinal (Willianson *et al* , 1996). No Brasil, diante de uma flora tão rica e diversificada, a utilização de plantas como medicamentos caseiros é ampla, tornando imperativo, para o país, a criação de uma política de incentivo a investigação científica das potencialidades terapêuticas desta fonte alternativa de medicamento.

Por outro lado, os produtos naturais estão passando por uma fase crítica devido ao intenso esforço necessário para o descobrimento de novas drogas com potencial terapêutico, os quais envolvem a busca, o isolamento e a elucidação de sua estrutura química. Para cumprir a exigência dos vários testes a que o composto natural purificado deve ser submetido para aprovação e uso comercial, faz-se necessário uma nova estratégia que lhes permita competir com o sucesso obtido com produtos sintéticos.

Hoje, as companhias farmacêuticas empregam cerca de US\$350 milhões para desenvolver uma nova droga e procedimentos para melhorar e acelerar o descobrimento destas. São requeridos (Grabley e Thiericke, 1999). Ao mesmo tempo, estas investigações têm ajudado no entendimento das doenças em níveis molecular e genético.

Subsequentemente a automação e a miniaturização vêm tomando espaço na área mudando drasticamente o processo industrial no descobrimento de drogas (Schmid *et al* 1999) Além disso a elucidação do genoma humano vem facilitando o acesso a um aumento expressivo do número de potenciais alvos de drogas (Norman 1998, Grabley e Thiericke, 1999)

A diversidade de atividades biológicas apresentadas por plantas usadas na medicina caseira vem sendo investigada e o espectro dessas ações amplifica na mesma proporção que metodologias mais específicas vão se consolidando cientificamente Vários modelos experimentais, *in vivo* e *in vitro*, estão hoje disponíveis para tal investigação De particular interesse são aqueles direcionados ao estudo das atividades imunomoduladoras, devido ao crescente número de espécies vegetais utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças que comprometem o sistema imunitário (Yamaguchi, 1992), em particular aquelas associadas ao câncer (Hirazumi *et al*, 1996) e doenças infecciosas crônicas (Zarkovic *et al*, 2001) assim como uma busca incansável a drogas que possam auxiliar na adaptação de transplantes, no tratamento de distúrbios auto-imunes e de imunodeficiência, incluindo a aids

Expressivas atividades imunomoduladoras têm sido relatadas a distintos grupos de substâncias extraídas de plantas, tais como os alcalóides (Novogrodsky *et al*, 1984, Morikawa *et al*, 1992, Ckless *et al*, 1995, Fiserova *et al*, 1995, Ivanovska *et al*, 1997, Lai *et al*, 1999, Solís-Maldonado *et al*, 2003, Ho *et al*, 2004), flavonóides (Schwartz e Middleton, 1984, Mookerjee *et al*, 1986a, Mookerjee *et al*, 1986b, Hirano *et al*, 1989, Namgoong *et al*, 1994, Pandey *et al*, 2005), saponinas (Chong *et al*, 1982, Chavali *et al*, 1987, Plohmman *et al*, 1997, Verotta *et al*, 2001, Gaidi *et al*, 2002), taninos (Vuk-Pavlovic *et al*, 1988, Vuk-Pavlovic e Rohrbach, 1990, Wang *et al*, 2002), e, principalmente, as lectinas, descritas anteriormente

Neste contexto estão incluídos os alcalóides indólicos isolados da *Vinca rosea*, Linn (Apocynaceae) (Figura 2) Dentre os diversos já identificados, a vinblastina (III) e a vincristina (IV) são os alcalóides mais investigados, com reconhecida ação antineoplásica, relatada para diversas formas de câncer (Noble *et al*, 1958, Svoboda, 1958, Carlson *et al*, 1990, Koch e Coussens, 1993, Anderson *et al*, 1996, Hamel, 1996, Miller *et al* 1997, Lens e Eisen, 2003, Martinelli *et al* 2003, Malik, 2004)

Um efeito inibitório sobre a ativação e proliferação de linfócitos induzidas por PHA (Thyberg *et al*, 1977), faz da vinblastina uma ferramenta frequentemente utilizada em estudos *in vitro* de imunomodulação (Broyn, 1975, Hawrylko, 1975, Ruscetti e

Chervenick 1975, Belmont *et al* 1979, Shand *et al* 1980 Colombo *et al*, 1985, Alcantara *et al* 1986, Powderly *et al*, 1986, Gorse e Kopp, 1987, Itoh *et al*, 1991, Gorczyca *et al* 1992, Utz *et al* 1994, Qiao *et al* 1995, Yang *et al*, 1996, Balakrishnan *et al*, 2002, Qin *et al* 2002, Sciola *et al*, 2003, Verheyen *et al* 2003)

Ao contrario da vimblastina, seus monômeros catarantina (I) e vindolina (II) (Gorman *et al*, 1959) são desprovidos de ação anti-tumoral (Inaba e Nagashima, 1986), porem são importante ferramentas como compostos iniciais para a síntese de moléculas bioativas (Ruszkowska *et al*, 2004) A perivina (V) outro monômero indólico extraído da *vinca* (Svoboda 1958), e pouco referendada na literatura, observando-se apenas modestas atividades antimicrobiana (Rojas Hernandez, 1979) hipotensora e miorelaxante (Perera *et al* 1985)

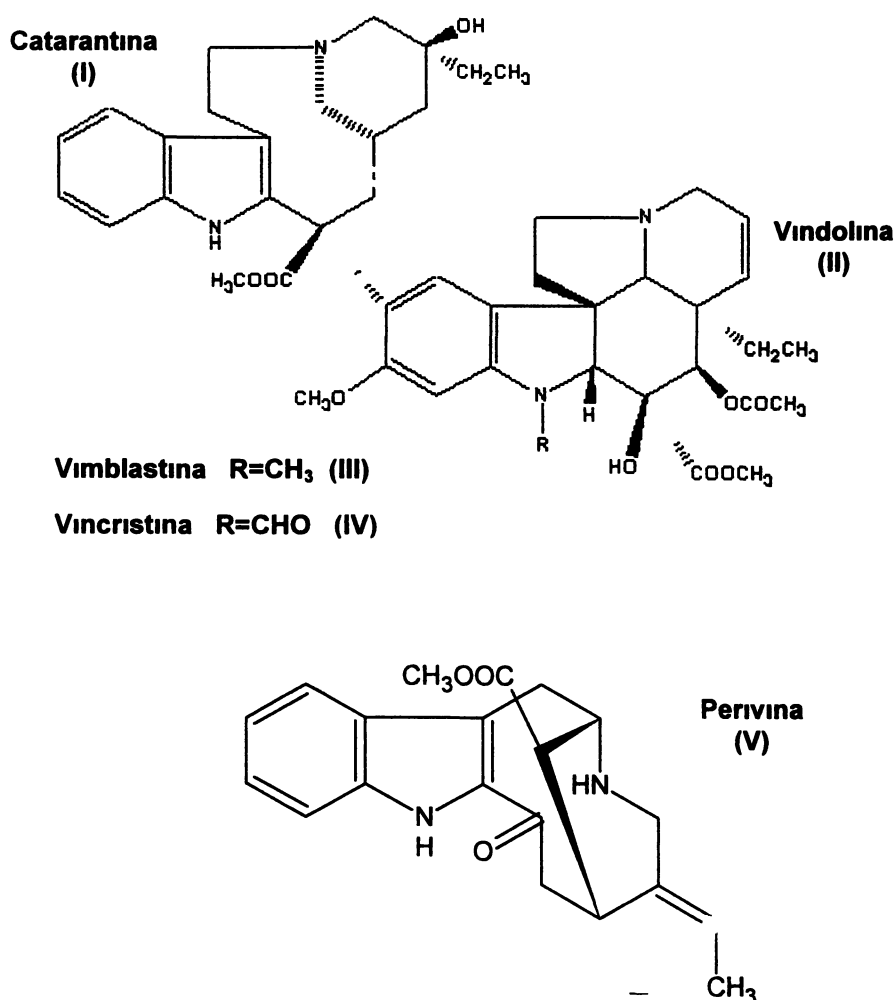


Figura 2 Estrutura química de alcaloides indólicos purificados da *Vinca rosea* (L)

Por outro lado, a atividade imunoestimulante de varias plantas medicinais, em particular a *Echinacea purpurea* (L.) Moench, Compositae (Asteraceae), popularmente conhecida como *equinacea* nativa da America do Norte e utilizada primeiramente pelos indios na cura de feridas no tratamento de enfermidades infecciosas, furunculos abscessos e queimaduras, vem sendo amplamente divulgada. Suas raizes são utilizadas em preparações fitoterapicas como estimulantes da imunidade, em decorrência de relatos, particularmente *in vivo* como, por exemplo, o aumento da resistência de roedores contra algumas formas fungicas (Steinmuller *et al* , 1993), bacterianas (Hwang *et al* , 2004) e tumorais (See *et al* , 1997)

Os mecanismos de ação descritos para a equinacea parecem influenciar o sistema imunitario de forma indireta uma vez que atividades sobre macrofagos (Stimpel *et al* , 1984, Luettig *et al* , 1989, Roesler *et al* 1991, Goel *et al* , 2002a, Goel *et al* , 2002b) e celulas NK (*Natural Killer*) (See *et al* , 1997, Currier e Miller, 2000, 2001, Gan *et al* , 2003) compõem o maior elenco das citações. Por exemplo, enquanto Roesler (1991) verificou a ativação sobre a fagocitose em macrofagos humanos, Goel e colaboradores, assim como o grupo de Elsasser, verificaram o aumento da produção das citocinas pro-inflamatorias IL1, IL6 e TNF- α por macrofagos tratados com equinacea (Elsasser-Beile *et al* , 1996, Goel *et al* , 2002a). Gan e colegas demonstraram potente ativação da citotoxicidade de celulas NK (Gan *et al* , 2003). Em estudo recente, realizado com celulas retiradas do baço de camundongos, observou-se a habilidade do extrato aquoso das raizes da planta em estimular a produção de mediadores pro-inflamatorios (Hwang *et al* , 2004)

Outra planta, a *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert (Asteraceae), popularmente conhecida como camomila, e comumente utilizada para o tratamento de inflamações cutâneas em bebês e crianças de tenra idade, tais como assaduras e crostas da cabeça que se desenvolvem em função da alimentação com leite (Volhardt, 2000, Eldin e Dunford, 2001). Varios estudos têm demonstrado não só suas propriedades anti-inflamatórias (Isaac, 1979, Jakovlev *et al* , 1979, Jakovlev *et al* , 1983, Glowania *et al* , 1987, Safayhi *et al* , 1994, Gerritsen *et al* , 1995, Ammon *et al* , 1996), como também ações anti-pepticas (Szelenyi *et al* , 1979), anti-alergicas (Miller *et al* , 1996), antiespasmodicas (Forster *et al* , 1980, Mann e Staba, 1986), anti-flogistica (Bradley, 1992), anti-bacteriana (Aggag e Yousefi, 1972, Mann e Staba, 1986, Molochko e Lastochkina, 1990, Kedzia, 1991, Lu *et al* , 1998), anti-fungica (Szalontai *et al* , 1976, 1977, Ahmed *et al* , 1994), anti-viral (Sugunda *et al* , 1983), anti-tumoral (Wei *et al* , 1990, Birt *et al* , 1997, Chaumontet *et al* ,

1997), anti-oxidante (Rekka *et al* 1996), ansiolíticas e sedativas (Viola *et al* , 1995, Avallone *et al* , 1996 Newall *et al* , 1996, Yamada *et al* 1996)

Extratos de camomila demonstraram estimular a proliferação de linfócitos em ensaio de reação alogênica de linfócitos (MLR – *Mixed lymphocyte reaction*) (Amirghofran *et al* , 2000) e um acentuado efeito inibidor da quimiotaxia em leucócitos humanos foi recentemente relatado (Presibella, 2003)

Muitos dos efeitos atribuídos a camomila parecem estar relacionados aos constituintes presentes em seu óleo essencial, sendo que diferentes atividades biológicas já foram descritas para o camazuleno (anti-inflamatório e antioxidante) (Safayhi *et al* , 1994) (Rekka *et al* , 1996), o bisabolol e seus derivados (anti-inflamatório, antibacteriano, antipirético e antifúngico) (Jakovlev *et al* , 1979, Jakovlev *et al* 1983, Kedzia, 1991, Salamon, 1992, Berry, 1995, Viola *et al* , 1995, Ammon *et al* , 1996), e os flavonoides, principalmente a apigenina, e glicosídeos (carminativos e antiespasmódicos) (Avallone *et al* , 2000)

Um aspecto interessante a ser considerado sobre a camomila é que, embora a literatura seja farta com referência às suas diversas atividades biológicas, onde a maioria dos estudos relatam propriedades *in vivo*, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação desta planta

As cascas de *Rauwolfia sellowii* Mull Arg (Apocynaceae), popularmente conhecida como pau-pra-tudo, são utilizadas como hipoglicemiantes hipocolesterolêmicas (Blatt *et al* , 2003) e anti-hipertensivas (Batista *et al* , 1996) na medicina caseira. Porém, somente foram descritas ações hipotensora e anti-hipertensiva (Pereira, 1956) e, mais recentemente, intensa atividade antioxidante de seu extrato hidroalcoólico (Menezes *et al* , 2004)

Esta planta tem sido objeto de interesse por ser uma fonte rica em alcalóides indólicos, sendo que muitos deles já foram isolados, como ajmalina, ajmalinina, serpentina, ajmalidina, tetrafilicina (Pakrashi *et al* , 1955), aricina, ajmalicina, reserpina e pytetrahydroalstonina (Hochstein, 1955), raucaffrinolína, perakina e sellowina. Estes três últimos foram isolados de uma amostra coletada em Curitiba, Paraná. Vomilenina, 12-demethoxytabernulosma, picrinina e 19 α ,20 α -epoxy-akuammicina também foram isolados de uma amostra coletada no Rio Grande do Sul (Batista *et al* , 1996)

O *Himatanthus lancifolius* (Mull Arg) Woodson (Apocynaceae) é uma árvore descrita nas regiões de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Sul, Goiás e Amazônia. Popularmente conhecido como agoniada, possui um grande potencial medicinal

também pelo alto conteúdo alcaloídico que vem sendo isolado. Suas cascas têm sido indicadas na medicina tradicional, para o tratamento de doenças de pele, asma, sífilis e principalmente, como estimulante das contrações uterinas e regulador das menstruações (Corrêa, 1984). Atividades antibacterianas também já foram descritas (Souza *et al*, 2004).

Conhecido no Brasil como pequizeiro, o *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae) encontra-se, principalmente na região-central do Brasil e seu uso na medicina caseira é amplo. Suas flores, folhas e o óleo das sementes (Granja e Barros, 1982), assim como o óleo de sua polpa (Vilela, 1998), são utilizados contra resfriados, bronquites, edemas e como regulador menstrual. As folhas também são usadas para o tratamento de doenças hepáticas (Bezerra *et al*, 2002).

Em estudo realizado com extratos brutos das folhas, cascas e mesocarpo do fruto (pequi), Cardoso relatou efeito contra a proliferação de *Leishmania amazonensis*, em modelos animais (Cardoso, 2001). Em outro estudo utilizando extrato do endocarpo de pequi, atividade tóxica para o *Toxoplasma gondii* foi descrita (Santiago, 1998). Atividade antifúngica foi relatada em estudos com o extrato das folhas (Passos *et al*, 2002). O ácido oleanólico isolado do pequizeiro demonstrou efeito inibidor sobre o desenvolvimento de sarcoma 180 em camundongos portadores do tumor (Oliveira *et al*, 1970).

As raízes de *Hybanthus bigibbosus* (St-Hil) Hassler (Violaceae) e as folhas de *Anchieta pyrifolia* (Mart) G Don (Violaceae), conhecidas popularmente como canela-de-veado e cipo suma, respectivamente, são plantas usadas na medicina caseira como depurativas e, também, por pacientes portadores de quadros alérgicos (Silva *et al*, 2004). Apesar de seu amplo uso, são escassos os estudos que possam delinear ou esclarecer aspectos importantes referentes às suas propriedades farmacológicas.

A *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride (Caesalpiniaceae), conhecida popularmente como escada-de-macaco, é uma planta típica das áreas tropicais do planeta e faz parte de uma coleção de quinze espécies, juntamente com o pau-pra-tudo e o cipo-suma, que foram selecionadas pelo seu amplo uso na medicina caseira, como hipoglicemiante, analgésico e diurético, durante um trabalho etnofarmacobotânico realizado recentemente com a população residente na área da Usina Hidroelétrica de Salto Caxias, sudoeste paranaense (Silva *et al*, 2004). Recentemente ensaio com o extrato hidroalcolico de suas folhas demonstraram uma elevada capacidade antioxidante (Menezes *et al*, 2004).

A *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae), comumente chamada de ginseng brasileiro por ser amplamente comercializada como substituta do *Panax ginseng*

(ginseng – Araliaceae), e utilizada na medicina popular como antidiabética, tônica e cicatrizante de lesões gástricas e reumatismos (Oliveira 1986) Estudos com o extrato hidroalcoólico das raízes e rizomas demonstraram atividade depressora do sistema nervoso central (de-Paris *et al* 2000) Estudos com outras espécies do gênero demonstraram efeitos antitumorais analgésicos e antiinflamatórios (Nishimoto *et al* , 1984), sendo que, recentemente, estes dois últimos efeitos foram relatados também para o extrato hidroalcoólico das raízes do ginseng brasileiro (Neto *et al* , 2005)

Em contraste com a vasta literatura existente para a equinácea, camomila, pau-pra-tudo e pequizeiro, as plantas agoniada, canela-de-veado, cipó-suma, escada-de-macaco e o ginseng brasileiro possuem escassos estudos (ou mesmo inexistentes) que possam delinear ou esclarecer aspectos importantes referentes as suas possíveis propriedades biológicas, visto que em suas composições fitoquímicas, resumidas na Tabela 2 (Presibella, 2003, de Paula, 2004), estão vários tipos de moléculas biologicamente ativas que, em alguns casos, já foram relatadas como responsáveis por eventos envolvidos na defesa imunológica

Tabela 2 Grupos químicos identificados nos extratos hidroetanólicos preparados de várias plantas medicinais usados na medicina caseira.

| GRUPO QUÍMICO | EXTRATOS | | | | | | | | | |
|----------------------------------|------------------|-----------------|---------------------|-----------------|------------------------|------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|
| | <i>equinácea</i> | <i>camomila</i> | <i>pau-pra-tudo</i> | <i>agoniada</i> | <i>canela-de-veado</i> | <i>cipó-suma</i> | <i>escada-de-macaco</i> | <i>pequizeiro</i> | | <i>ginseng brasileiro</i> |
| | | | | | | | | <i>folhas</i> | <i>mesocarpo Interno</i> | |
| Flavonóides | + | + | - | - | - | - | + | + | + | - |
| Alcaloides | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Saponinas | - | - | - | - | + | + | - | + | + | + |
| Taninos | - | + | + | - | - | - | + | + | - | - |
| Glicosídeos cardiotônicos | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Antraquinonas | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

(-) ausência, (+) presença

Dessa forma, estas plantas tornaram-se alvo de nosso interesse amparadas não só no fato de serem muito usadas na medicina caseira, mas e principalmente, porque suas indicações de uso, assim como sua composição química, podem estar de uma forma ou de outra, relacionadas a aspectos envolvidos com os mecanismos das respostas inflamatória e imunológica

OBJETIVOS

Objetivo geral

Este trabalho tem por finalidade o estudo *in vitro* dos efeitos de extratos e compostos extraídos de plantas medicinais sobre linfócitos humanos por citometria de fluxo

Objetivos específicos

Investigar os efeitos dos alcalóides vimblastina, vindolina e perivina e dos extratos preparados das raízes de *Echinacea purpurea* (L) Moench e de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Machr, das folhas e do mesocarpo interno do *Caryocar brasiliense* (Cambess), das raízes de *Hybanthus bigibbosus* (St-Hil) Hassler, dos capítulos florais de *Chamomilla recutita* (L) Rauschert, das cascas de *Himatanthus lancifolius* (Mull) Argov, das folhas de *Anchieta pyrifolia* (Mart) G Don e das cascas de *Rauwolfia sellowii* (Mull) Argov sobre a transformação blastica e a proliferação de linfócitos humanos

Investigar os efeitos dessas mesmas substâncias e extratos sobre a transformação blastica e proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina

MATERIAL E METODOS

Os sais e reagentes utilizados neste trabalho são de procedência Merck ou Sigma. Para o preparo das soluções, utilizou-se água pura obtida pelo sistema Puritech/Permuton.

As soluções foram preparadas e, em seguida, esterilizadas por calor úmido (autoclavação a 121°C, 30min, 1atm) ou por filtração (0,22µm - Acrodisc) e, posteriormente, armazenadas em temperaturas apropriadas para sua conservação (temperatura ambiente, 4 - 8°C ou a -20°C), ao abrigo da luz, conforme indicado.

Toda a manipulação do material biológico foi realizada em condições de esterilidade usando fluxo contínuo vertical, modelo FLVQ TAM 12 TROX.

Soluções

Solução salina tamponada com fosfatos (PBS) NaH₂PO₄·2H₂O (150mmol/l), Na₂HPO₄ (150mmol/l) e NaCl (154mmol/l) em água. Após ajuste do pH para 7,2 - 7,4 com solução de NaOH 1N, procedeu-se à esterilização por autoclavação e armazenamento a 4 - 8°C (Dacie e Lewis, 1995).

Solução H₂SO₄ 1% (v/v) ácido sulfúrico P.A., na proporção de 1:100 em água.

Solução de Turk ácido acético glacial em água a 3% (v/v).

Solução de azul de tripano a 0,4% (p/v) azul de tripano em solução salina tamponada com fosfato.

Meio com fitohemaglutinina (M-PHA) meio para cariótipo comercial (Cultilab, Campinas/SP), contendo PHA em RPMI 1640, HEPES e soro fetal bovino, conservado a temperatura de -20°C e ao abrigo de luz, conforme instruções do fabricante.

Meio RPMI 1640 meio RPMI 1640 (Gibco) em pó foi dissolvido em água conforme instruções do fabricante, esterilizado por filtração (0,22 µm - Acrodisc) e conservado a temperatura de -20°C

Meio RPMI suplementado com 10% (v/v) de soro humano heterólogo na hora do uso soro humano obtido de uma mistura de soros provenientes de sangue de, pelo menos, vinte doadores, foi acrescentado ao meio RPMI 1640 na proporção de 1:10 em condições de esterilidade

Alcalóides

Para o estudo do efeito de alcalóides indólicos utilizou-se as seguintes substâncias sulfato de vimblastina, em ampolas, Laboratório Foulding Farmacêutica do Brasil Ltda, registro 131390015 no Ministério da Saúde, vindolina e perivina, na forma de pó, produzidos pelo Laboratório Eli Lilly & Co Indianapolis, U.S.A. com os registros 801-891B-128A e 232-579-51-3, respectivamente

Extratos

Extrato das raízes de *Echinacea purpurea* (L.) Moench, Compositae, Asteraceae (equinacea) foi adquirido no comércio local na forma encapsulada, produzido pelo laboratório botânico Herbarium LTDA com registro 18600008 no Ministério da Saúde. Raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amarathanceae (ginseng brasileiro) foram coletadas nas ilhas e margens do Rio Parana, município de Querência do Norte, Paraná, cujo exemplar está depositado no Herbario do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, sob registro UPCB nº 38609. Folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Machr., Caesalpiniaceae (escada-de-macaco) foram coletadas na região de Morretes, Paraná, e um exemplar encontra-se depositado no Herbario do Museu Botânico de Curitiba, sob registro 264361. Folhas e mesocarpo interno de *Caryocar brasiliense* Cambess, Caricaceae (pequi/pequizeiro) foram coletados na região de Montes Claros, Minas Gerais, e um exemplar encontra-se depositado no herbario do Departamento de Botânica da UFPR, sob registro 46279. Capitulos florais de *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, Asteraceae (camomila), adquiridos no comércio de Curitiba, foram submetidos

a análise farmacognóstica recomendada pela Farmacopeia Brasileira IV (1996) e uma amostra encontra-se depositada no Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia UFPR. Cascas de *Himatanthus lancifolius* (Mull.) Argov, Apocynaceae (agoniada) foram adquiridas comercialmente na região metropolitana de São Paulo, SP, e identificadas conforme descrição da Farmacopeia Brasileira I e por comparações macro e microscópicas com amostras autênticas contidas na Herboteca do Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia da UFPR, cuja amostra encontra-se depositada na herboteca deste laboratório. Algumas das plantas medicinais utilizadas neste trabalho foram coletadas na área onde se situa a atual represa da usina hidroeletrica de Salto Caxias, Paraná. Após serem identificadas e classificadas de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (McNeill *et al*, 2000), exemplares foram depositados no herbario do Departamento de Botânica da UFPR, como a seguir: raízes de *Hybanthus bigibbosus* (St.-Hil.) Hassler, Violaceae (canela-de-veado), registro 42 366, folhas de *Ancheta pyrifolia* (Mart.) G. Don, Violaceae (cipo-suma), registro 42 427, cascas de *Rauwolfia sellowii* (Mull.) Argov, Apocynaceae (pau-pra-tudo), sob registro 42 384.

Extratos armazenados a -20°C foram preparados por maceração do material botânico seco e moído em etanol a 20% (v/v) por 48 horas, seguida de filtração e evaporação a 45-55°C até completo esgotamento do material, monitorado por meio de abordagem fitoquímica rápida. Após liofilização em aparelho Labconco, foram res-suspensos em RPMI 1640, esterilizados por filtração (0,22µm - Acrodisc) e ali-quotados.

Obtenção de leucócitos humanos

Foram usados, como fonte de leucócitos, dez a vinte mililitros de sangue periférico venoso heparinizado, colhido de voluntários. Nenhum dos doadores fazia uso de medicamento por ocasião da coleta. As amostras foram colhidas de indivíduos sem manifestação de sinais ou sintomas de doença, após consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR, sob Protocolo CEP/HC 10, EXT 059/2003-10 (Anexo A).

Isolamento de mononucleares humanos

Sangue anticoagulado foi centrifugado a 200g por 15 minutos a temperatura ambiente (T A) para eliminação do plasma rico em plaquetas. A seguir obteve-se o creme leucocitário após centrifugação a 800g por 25 minutos em T A , o qual foi re-suspenso em 12ml de PBS. Após homogeneização, a suspensão celular foi transferida para tubo de centrifuga contendo 3ml de Ficoll-Paque^{1M} PLUS (Amersham, Biosciences) e centrifugada a 200g por 30 minutos a T A. As células mononucleares (MNC), retidas na interface das soluções, foram removidas, lavadas duas vezes em PBS (400g por 10 minutos em T A) e re-suspenso em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro humano. Depois de enumerada com auxílio de câmara de Neubauer Improved, a concentração celular foi ajustada para se obter a concentração final de 10⁶ células/ml.

Contagem celular

Para a avaliação do número de células, as amostras foram diluídas em solução de Turk e enumeradas com o auxílio de câmara de Neubauer Improved. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada sob microscopia de imersão (x1000) em extensões sanguíneas preparadas na hora da coleta, secas ao ar e, posteriormente coradas com May-Grunwald-Giemsa (Dacie e Lewis, 1995). Um mínimo de 100 células foi analisado por experimento.

Teste de viabilidade e citotoxicidade celulares

Mononucleares isolados foram diluídos em solução de azul de tripano a 0,4% (p/v) em PBS e sua viabilidade observada ao microscópio óptico (Olympus CH30) e as células discriminadas como viáveis apresentavam-se íntegras, brilhantes, incolores e redondas, enquanto que as não viáveis mostraram-se coradas em azul, muitas com perda da definição de contorno. Somente amostras contendo um número maior que 95% de células viáveis foram utilizadas nos experimentos.

Preparo de citocentrifugados

Para observação da composição das frações celulares, preparações citológicas foram obtidas após submeter-se 2×10^4 células a 1500rpm por 5 minutos em T A , sob baixa aceleração em citocentrífuga Cytopro^{IM} (Wescor) Em seguida, as lâminas secas ao ar foram coradas com May-Grunwald-Giemsa (Dacie e Lewis 1995) e as células diferenciadas e enumeradas com auxílio de um microscópio óptico Fotografias foram obtidas usando-se o *software* IMAGE PRO PLUS acoplado ao microscópio

Ensaio de Imunomodulação

MNC (10^6 células/ml) tratados com proporções crescentes (5, 10, 25, 50, 75 e 90%) do meio de cultura Meio para Cariotipo (RPMI) enriquecido com fitohemaglutinina (Cultilab-Campinas/SP) em relação ao volume final da cultura foram incubados em placas estereis de 96 cavidades (TPP), a 37°C, por 3 a 5 dias, em atmosfera de 5-10% de CO₂ (Bier, 1977) Cada ensaio foi realizado em triplicata e, como resultado de cada experimento usou-se a média da triplicata

Para avaliar a atividade imunomodulatória espontânea e induzida por PHA de alcaloides e extratos de plantas medicinais sobre MNC humanos concentrações crescentes dos mesmos foram adicionadas aos ensaios e incubados, como descrito acima Em alguns experimentos com o extrato de pau-pra-tudo, concentrações específicas foram adicionadas após 72 horas de incubação das suspensões de MNC com M-PHA Em outros, 10% de meio M-PHA foi adicionado a culturas de MNC previamente incubados por 24 horas com concentrações específicas do extrato

Ativação de linfócitos avaliada morfológicamente (transformação blástica)

Citocentrifugados dos diferentes grupos foram preparados, corados com May-Grunwald-Giemsa e a morfologia das células observada sob imersão em microscópio de luz Linfócitos foram reconhecidos por seu aspecto morfológico característico, apresentando-se como células arredondadas, pequenas (10µm ou menos de diâmetro), mantendo cada relação núcleo-citoplasmática, citoplasma geralmente escasso, de coloração azul, ausência de granulação específica, núcleo arredondado e denso, com cromatina apresentando-se com agregados irregulares e eventual presença de estruturas semelhantes a nucleolos, porém mal definidos Linfócitos transformados pela ação de

fitohemaglutinina foram considerados como blastos ou linfoblastos e identificados como células maiores do que linfócitos não-ativados (10 a 20µm de diâmetro), citoplasma azul intenso, geralmente vacuolizado, com Complexo de Golgi desenvolvido, definido como área não corada ao redor do núcleo, presença de dois ou mais nucleolos visíveis, proeminentes e delineados, com volume aumentado cromatina delicada (Lee *et al.* 1999)

Ativação/proliferação de linfócitos avaliada por citometria de fluxo

Após incubação, as células MNC foram transferidas para tubos de ensaio apropriados e analisados com um citômetro de fluxo modelo FACSCalibur, equipado com laser de Argônio (488nm) e detectores de dispersão para tamanho e complexidade interna, Becton & Dickinson. Para cada análise, eventos foram adquiridos por 30 segundos na velocidade alta em escala linear. Gráficos baseados no tamanho (FSC - *forward light scatter*) e na complexidade interna (SSC - *side light scatter*) das células foram construídos usando-se janelas discriminatórias para as populações de linfócitos (R1) e blastos (R2). Em alguns experimentos, as análises se basearam na aquisição de 10^4 eventos. Os dados foram analisados usando-se o *software* WinMDI 2.8.

O efeito proliferativo foi avaliado através do índice de proliferação (IP), onde a média aritmética das triplicatas (X) dos valores obtidos por ensaio foram aplicadas como a seguir

$$IP = \frac{X \text{ (células detectadas em R2)}_{\text{teste}}}{X \text{ (células detectadas em R2)}_{\text{controle}}}$$

Análise estatística

Os resultados estão apresentados como a média \pm 1 erro padrão da média (EPM). Para análise estatística dos resultados, usou-se o teste *t*, de Student. Os cálculos foram realizados utilizando-se o *software* OriginPro 6.1 e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Quando necessário, análises foram realizadas para a obtenção do índice de correlação (*r*) entre dois grupos usando-se o teste de correlação de Pearson.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A capacidade que linfócitos têm de serem ativados e proliferar quando expostos a mitógenos tem sido usada como um instrumento para avaliar o *status* funcional dessas células. O desenvolvimento de técnicas *in vitro* de cultivo de linfócitos tem aplicação prática que se verifica em laboratórios de imunologia clínica, com o objetivo de diagnosticar indivíduos portadores de distúrbios relacionados a defesa imunológica mediada por células. Tem, também, proporcionado ferramentas para elucidar os mecanismos que envolvem as respostas imunológicas assim como para o estudo do efeito imunomodulador de várias substâncias.

Muitas plantas têm sido utilizadas na medicina tradicional, não só pela sua eficiência em curar ou atenuar os efeitos da resposta imunológica, mas também pela facilidade de acesso e relativo baixo custo, uma vez que crescem naturalmente com relativa abundância em nosso solo. Neste contexto a proposta de avaliar o potencial imunomodulador de extratos preparados das plantas medicinais popularmente conhecidas como camomila, pau-pra-tudo, canela-de-veado, cipo-suma, pequi, escada-de-macaco, agoniada, equinacea e ginseng brasileiro, teve como finalidade fornecer embasamento científico ao seu uso popular e, dessa forma, eventualmente colaborar com programas de prática médica que possam orientar seu uso para distúrbios que comprometem o sistema imunológico.

Como anteriormente citado, as metodologias mais frequentemente utilizadas para avaliação da atividade imunomodulatória empregam a estimulação inespecífica de linfócitos com mitógenos naturais tais como as lectinas PHA e ConA. Os eventos celulares evidenciados após a sensibilização ou ativação celular, conhecida como transformação blastica, requerem a interação do mitógeno com receptores apropriados presentes nas células efectoras e, em particular, nos linfócitos. A marca registrada da ativação linfocitária é representada pelo aumento da síntese de DNA, culminando na expansão policlonal desta população. As células resultantes desses processos podem influenciar as reações imunológicas e são coletivamente denominadas células efectoras.

Neste trabalho, investigou-se o efeito imunomodulador dos alcalóides perivina, vindolina e vimblastina, além de extratos obtidos de várias plantas sobre células mononucleares, especialmente linfócitos, obtidos de sangue periférico de voluntários que,

por ocasião da coleta relataram não apresentar sinais e/ou sintomas de doença e não fazer uso de medicamentos há, pelo menos uma semana

Para tanto, alguns ensaios foram realizados. Primeiro investigou-se a capacidade dessas substâncias em promover a ativação celular de MNC (transformação linfoblástica), a qual foi avaliada pela análise morfológica das células em preparações coradas, após sua incubação com as substâncias em estudo e pelo seu comportamento em um citômetro de fluxo. Em paralelo, avaliou-se, também, seus efeitos sobre a proliferação espontânea de linfócitos após cultivo por 5 dias, assim como seus efeitos sob a influência de PHA.

Obtenção de linfócitos

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospital de Clínicas UFPR, amostras sanguíneas de voluntários saudáveis foram colhidas e, em seguida, processadas para obtenção dos MNC, usando-se gradiente de densidade. O rendimento médio de MNC recuperados após este processamento foi de $53,8 \pm 2,01\%$ ($n=26$), sendo $98,9 \pm 0,7\%$ dessa fração composta por linfócitos, avaliada em preparações coradas com May-Grunwald-Giemsa, antes e após o procedimento.

A viabilidade dos MNC recuperados após enriquecimento usando-se o teste com azul de tripano, o qual baseia-se na habilidade que a membrana plasmática de células viáveis (vivas) possui de excluir o corante (Merchant *et al*, 1964), foi de $96,7 \pm 3,1\%$ ($n=52$), os quais apresentaram-se brilhantes e com morfologia esférica quando observados sob microscopia de luz, indicando que esta etapa do processo de isolamento não causou, por um lado, dano celular ou, por outro lado, ativação celular.

Citotoxicidade da fitohemaglutinina

Por ser uma substância com reconhecida capacidade de estimular linfócitos T humanos *in vitro*, PHA foi a lectina de escolha para estudo e comparação dos efeitos causados por extratos de plantas medicinais e alguns alcalóides sobre MNC propostos neste trabalho. Entretanto, por ser uma substância de relativa toxicidade para MNC e não se tê-la como reagente puro, uma série de experimentos preliminares foram necessários para se obter cinéticas ideais de transformação e de proliferação. Neste sentido, concentrações proporcionais crescentes do preparado comercial Meio de Cultivo para

Cariótipo (M-PHA), o qual constitui-se do meio Meio RPMI 1640 contendo PHA e é rotineiramente utilizado para proliferação *in vitro* de células de sangue periférico e de medula óssea com finalidades diagnósticas, foram adicionadas a suspensões de MNC e seus efeitos monitorados a 37°C, entre 72 (3 dias) e 120 horas (5 dias) de cultivo, sob atmosfera de 5% de CO₂

Como ilustrado na Figura 3, quando os MNC foram incubados somente em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de uma mistura de soros humanos, o número de células viáveis decresceu com o aumento do período de incubação. A viabilidade média observada foi de 87,6±1,3% (n=8) em culturas de 3 dias, enquanto que, após 4 e 5 dias de cultivo, declínio significativo foi observado, registrando valores de 73,6±3,5% (n=8, $p<0,01$) e 65,0±4,0% (n=8, $p<0,0001$), respectivamente

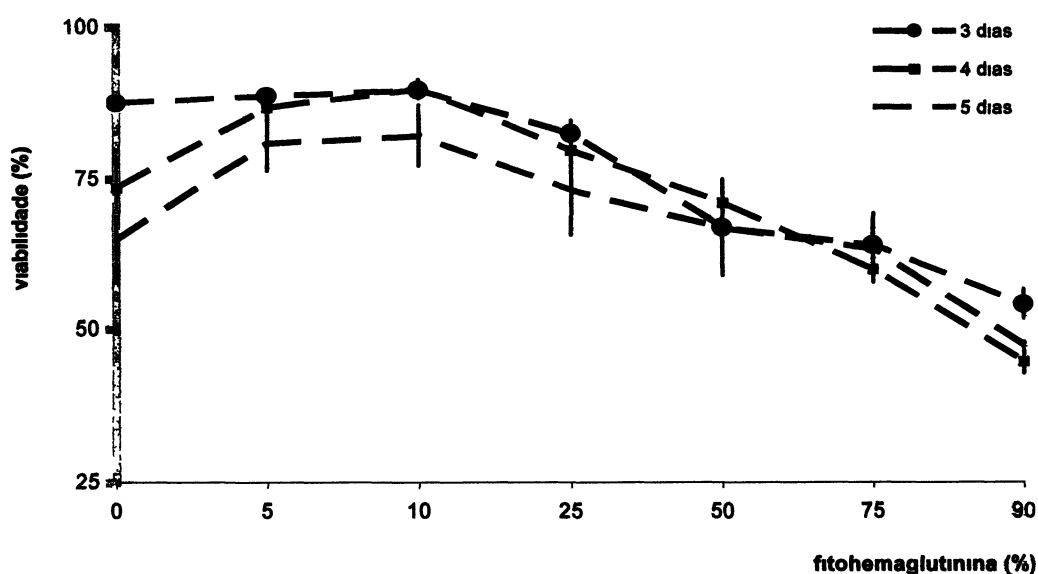


Figura 3 Influência da fitohemaglutinina na viabilidade de mononucleares humanos *in vitro*. Mononucleares (MNC) obtidos de sangue periférico de voluntários saudáveis, após isolamento em gradiente de densidade, foram tratados com proporções crescentes, como indicado, do meio de cultura comercial Meio para Cariótipo enriquecido com fitohemaglutinina e incubados a 37°C por 3 a 5 dias, em atmosfera de 5-10% de CO₂. Cada linha representa a viabilidade média ± EPM em percentagem dos MNC, verificada pelo teste com azul de tripano.

Entretanto, quando incubados na presença de concentrações crescentes de M-PHA, após 3 dias de incubação, a viabilidade média dos MNC manteve-se superior a 80% até a concentração de 25% (v/v) de meio, quando então, observou-se um declínio dose-dependente significativo em relação ao controle sem PHA, com somente 67,1±3,1,

64,3±2,5% e 54,3±3,5% das células mantendo-se viáveis para as proporções de 50, 75 e 90%, respectivamente (n=8, p<0,0001 para todos). O potencial tóxico apresentado pela PHA em altas concentrações foi também, bastante evidente após 4 e 5 dias de incubação, onde uma viabilidade celular média de 60,1±2,1% (n=8, p<0,01) foi registrada na presença de 75% de M-PHA, após 4 dias de cultivo. Quando se incubou os MNC com 90% de M-PHA, passados 5 dias, somente 47,5±0,5% (n=8, p<0,05) dos MNC mantiveram-se vivos.

Em contraste, na presença de somente 5 ou 10% de M-PHA a viabilidade média observada foi de 86,8±2,7% (n=8, p<0,01) e 89,9±1,7% (n=8, p<0,001) respectivamente, após 4 dias de incubação, e de 80,9±4,5% e 82,1±5,0% (ambos n=8, p=0,02) após 5 dias, sendo significativamente superiores às concentrações elevadas avaliadas, assim como aos valores observados para as sem PHA.

Os resultados experimentais obtidos demonstram que a PHA é de fato, tóxica para MNC humanos. Além disso, eles estão de acordo com relatos de outros que demonstraram semelhante ação tóxica, porém sobre linfócitos de sangue periférico de mamíferos, como camundongos (Kristensen *et al*, 1982c) e cachorros (Kristensen *et al* 1982a), onde o número de células viáveis, após 42 horas de incubação com PHA, reduziu-se em cerca de 50%, comparando com mais de 70% de células que desapareceram das culturas não tratadas.

Entretanto, deve-se também considerar a hipótese de que, pelas condições de ensaio utilizadas, essa queda de viabilidade possa estar relacionada ao consumo/exaustão de nutrientes do meio pelas células, interferindo com sua sobrevivência.

Efeitos da fitohemaglutinina sobre a ativação de linfócitos

Um dos meios de se estudar a ativação de linfócitos é pela alteração de sua morfologia, observada sob microscopia de imersão, em preparações fixadas e coradas por corantes hematológicos comuns. Linfócitos se caracterizam como células pequenas e arredondadas, com cerca de 10µm de diâmetro, elevada relação núcleo-citoplasmática, seu citoplasma é geralmente escasso, de coloração azul em, sem a presença de granulação específica, seu núcleo também arredondado, denso, com cromatina apresentando-se com agregados irregulares e a presença de estruturas semelhantes a nucleolos e eventual, porém mal definidos quando presentes. Em um citômetro de fluxo, esta população ocupa uma posição característica, de baixos FSC (x) e SSC (y), ou seja, ocupam o canto esquerdo

inferior de um eixo de coordenadas (ver próximo item). Linfócitos transformados pela ação de fitohemaglutinina apresentam-se com morfologia característica de células primitivas ou blásticas (linfoblastos), sendo células maiores do que linfócitos não-ativados, com cerca de 10 a 20 μ m de diâmetro, citoplasma azul escuro intenso, geralmente vacuolizado, com Complexo de Golgi desenvolvido, definido como área não corada ao redor do núcleo; este se apresenta com cromatina delicada, presença de dois ou mais nucléolos proeminentes e bem delineados (Lee *et al.*, 1999). No citômetro de fluxo, esta população ocupa uma área de baixos FSC e SSC, porém mais elevados quando comparados à população não ativada.

Ao avaliar-se a morfologia dos MNC em citocentrifugados corados com May-Grünwald-Giemsa preparados após os diferentes intervalos de incubação, observou-se que, em média, somente 5,8 \pm 1,2% (n=6) das células tinham morfologia característica de linfoblastos nas culturas onde PHA não foi adicionada, sendo o restante constituído por linfócitos. Em contraste, linfoblastos constituíram 89,6 \pm 1,2% (n=30; $p < 1 \times 10^{-25}$) das populações estimuladas com PHA. Essa distribuição distinta de linfócitos e linfoblastos nas culturas, cujas morfologias estão ilustradas na Figura 4, foi independente da concentração de M-PHA e do tempo de incubação.

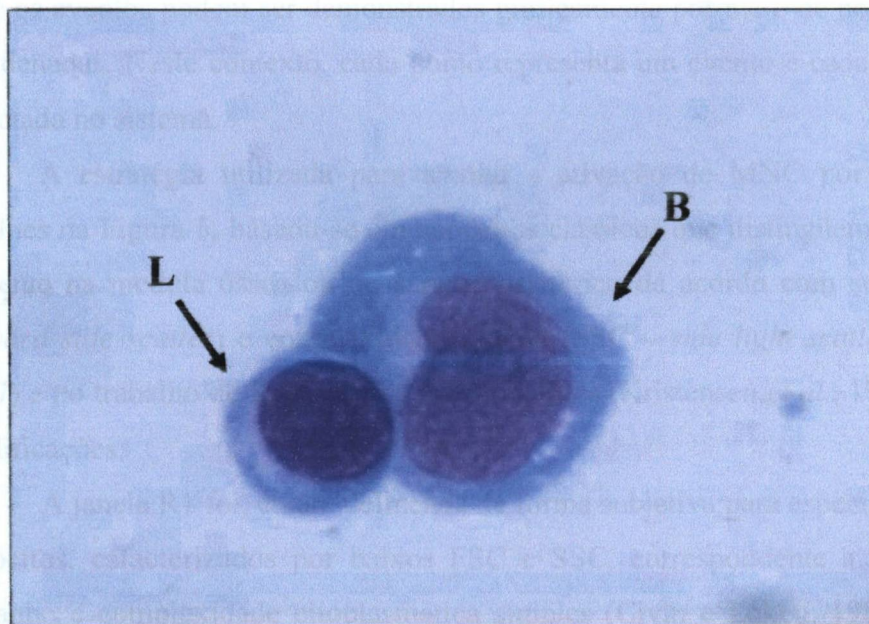


Figura 4. Efeito *in vitro* da fitohemaglutinina sobre a morfologia de linfócitos humanos. Linfócitos obtidos após isolamento com gradiente de densidade foram incubados a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em meio de cultura contendo fitohemaglutinina. Após 72 horas, citocentrifugados foram preparados e corados com May-Grünwald-Giemsa e observados sob imersão em microscópio comum. Linfócitos (L) e linfoblastos (B) foram distintos entre si pela sua morfologia característica (x1000).

Estes resultados indicaram e confirmaram que de fato a PHA é um potente ativador de linfócitos humanos, promovendo a transformação da maioria dos linfócitos T a ela expostos, e que o sistema experimental utilizado permitiu recapitular os efeitos *in vitro* descritos para a PHA

Efeitos da fitohemaglutinina sobre a proliferação de linfócitos

Embora um linfócito, para proliferar necessite de ativação previa, os mecanismos que regem a ativação celular são diferentes daqueles que atuam sobre a proliferação celular (Weiss e Samelson, 2003) Ou seja, uma substância pode agir sobre linfócitos ativando-os, mas esta ativação pode não estar relacionada aos mecanismos que levam a sua proliferação Sendo um dos objetivos deste trabalho investigar a ação de extratos e de substâncias purificadas de plantas medicinais sobre a proliferação de linfócitos *in vitro*, avaliou-se primeiramente a capacidade da PHA em promover sua ativação comparando-se o comportamento de MNC expostos a sua ação com aquele exercido pela mesma população na ausência do mitogeno

Como medida desta atividade, utilizou-se a tecnologia de citometria de fluxo (CF), onde os eventos podem ser demonstrados graficamente por meio de pontos em um eixo de coordenadas Neste contexto, cada ponto representa um evento e cada evento, uma célula detectada no sistema

A estratégia utilizada para avaliar a ativação de MNC por CF, ilustrada com detalhes na Figura 5, baseou-se em conceitos clássicos que distinguem cada tipo de célula presente na medula óssea ou no sangue periférico de acordo com seu tamanho (FSC – *forward side scatter*) e complexidade interna (SSC – *side light scatter*) (Civin e Loken, 1987) e no trabalho de Kristensen e colaboradores (Kristensen *et al* , 1982b), com algumas modificações

A janela R1 foi então, delineada de forma subjetiva para especificar a população de linfócitos, caracterizados por baixos FSC e SSC, correspondente a células de pequeno tamanho e complexidade citoplasmática simples (Civin e Loken, 1987), a janela R2 foi traçada, também de forma subjetiva, para caracterizar células ativadas (linfoblastos), baseada em (1) estudos correlacionando a citometria de fluxo com a incorporação de timidina radioativa (Kristensen *et al* , 1982b, Wang e Zheng, 2002) e (2) após análise das populações de MNC cultivadas durante 3 dias na presença de PHA, as quais demonstraram

deslocamento no gráfico quando comparadas as mesmas populações não estimuladas submetidas a condições similares de cultivo

Linfócitos de sangue periférico humano estimulados com PHA ou ConA possuem elevado conteúdo em RNA após 32 horas de exposição quando comparado aos conteúdos de RNA e DNA de linfócitos não estimulados (Kristensen *et al* 1982b) Sabe-se que ao serem estimuladas, essas células geralmente encontram-se na fase G₁ do ciclo celular, o qual corresponde ao intervalo entre a finalização da divisão celular (mitose) e o início da síntese de DNA (Alberts *et al*, 1994) Observou-se, também, que o baixo número de células em G₁ coincide com baixos níveis de IL2 no sobrenadante dessas culturas (Bettens *et al*, 1982)

Neste contexto, 92,6±4,3% (n=22) dos MNC do grupo controle permaneceram em R1 após incubação, em contraste com os 16,1±4,9% (n=22, $p < 1 \times 10^{-30}$) observados, nesta região, nas culturas estimuladas com PHA Ou seja, na presença de PHA, 83,9±4,9% (n=22) das células, de fato, se deslocam para a região R2, corroborando com observações descritas por outros (Gaines *et al*, 1996), sugerindo que esse deslocamento está relacionado a ativação celular

Esses resultados também estão de acordo com a análise citológica dessas duas populações estudadas (e já anteriormente referida), onde a população não estimulada constituiu-se predominantemente de linfócitos, enquanto que aquela incubada na presença de PHA, demonstrou que acima de 89% de suas células eram imaturas, com características morfológicas de blastos De fato, quando se correlacionou os dados obtidos por CF com as análises citomorfológicas, um índice de correlação de $r = 0,98$ foi obtido, indicando que os pontos deslocados para a região R2 nos gráficos FSC x SSC representam linfócitos que foram ativados pela ação da PHA, sofreram transformação blastica e deram origem a linfoblastos funcionais

Com essas considerações e uma vez que os resultados demonstraram claramente que há posicionamento gráfico distinto entre células ativadas/transformadas e células em repouso, corroborando com dados da literatura, tornou-se possível estudar o efeito de substâncias sobre a ativação/proliferação de linfócitos pela análise do número proporcional de eventos observados em cada região

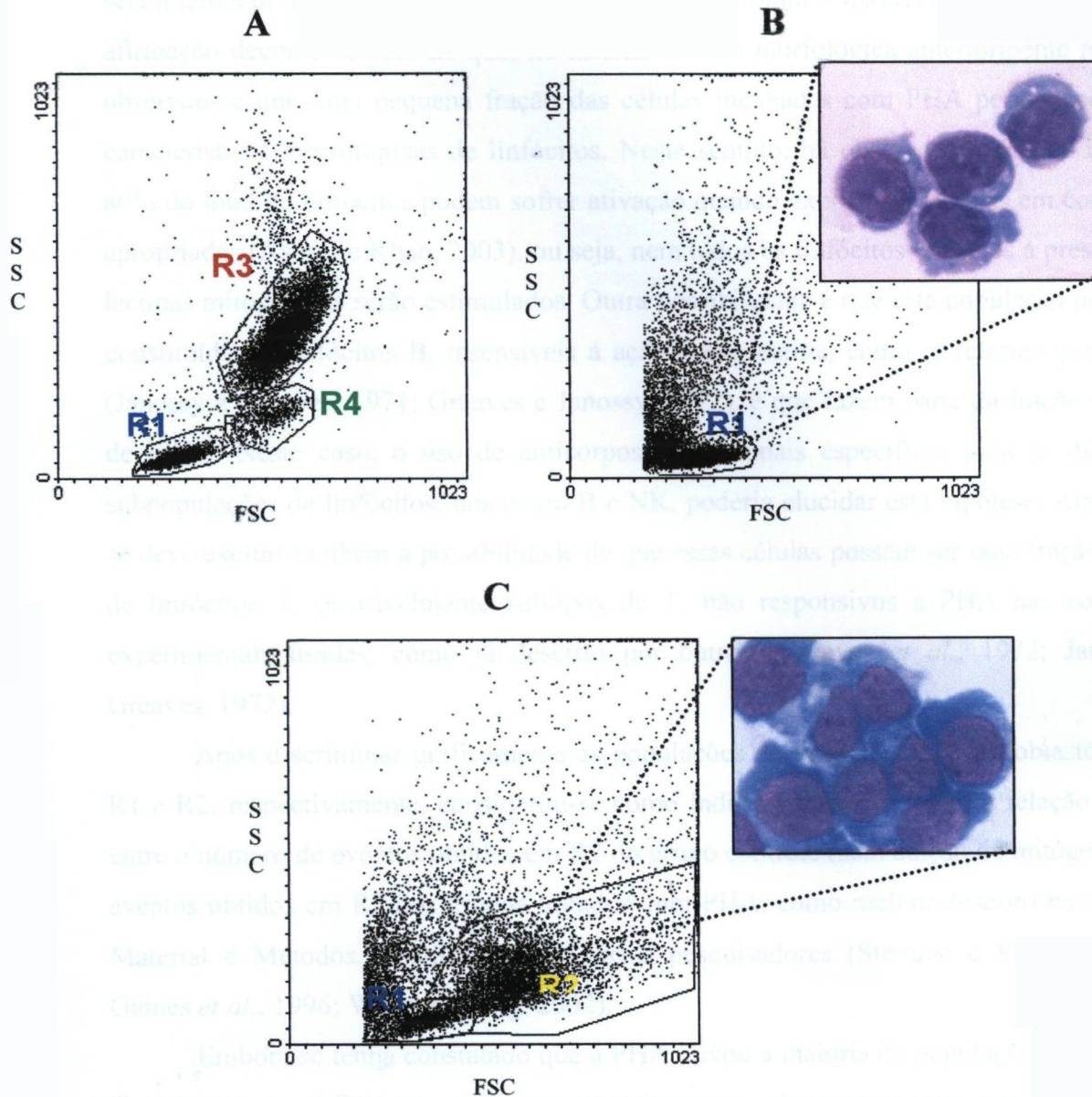


Figura 5. Estratégia para análise da ativação de linfócitos por citometria de fluxo. Os gráficos representam as populações de leucócitos obtidos de sangue periférico de voluntários sadios (A) analisados por citometria de fluxo, onde as características de tamanho (*FSC*) e complexidade interna (*SSC*) foram utilizadas para distinguir cada população e definir as regiões para avaliar a ativação de linfócitos do grupo controle (B) e do grupo estimulado com fitohemaglutinina (C). **R1** denota a região delimitada para linfócitos não ativados, cuja morfologia clássica, após coloração com May-Grunwald-Giemsa, pôde ser observada em citocentrifugados preparados após o período de cultura (destaque); **R2** delinea a região para linfócitos ativados, que se transformam em linfoblastos, cujas características morfológicas estão no destaque. **R3** delimita a área correspondente aos granulócitos e **R4**, e de monócitos. Cada ponto representa uma célula detectada pelo sistema.

Entretanto R2 inclui também células que estão em R1. É provável que essas células sejam também linfócitos que, por algum motivo, não foram sensíveis à ação da PHA. Essa afirmação decorre do fato de que, na mesma análise morfológica anteriormente referida, observou-se que uma pequena fração das células incubadas com PHA permaneceu com características morfológicas de linfócitos. Neste sentido, há observações de que mais de 80% do total de linfócitos podem sofrer ativação quando expostos a lectinas em condições apropriadas (Ashraf e Khan, 2003), ou seja, nem todos os linfócitos expostos à presença de lectinas mitogênicas serão estimulados. Outra possibilidade é que esta população possa ser constituída de linfócitos B, insensíveis à ação desta lectina, como já referido por outros (Janossy e Greaves, 1971, Greaves e Janossy, 1972), e que fazem parte da fração original de MNC. Neste caso, o uso de anticorpos monoclonais específicos para as diferentes subpopulações de linfócitos, tais como B e NK, poderia elucidar esta hipótese. Ainda não se deve excluir também a possibilidade de que essas células possam ser uma fração menor de linfócitos T, provavelmente subtipos de T, não responsivos à PHA nas condições experimentais usadas, como já descrito por outros (Greaves *et al.*, 1972, Janossy e Greaves 1972).

Apos discriminar graficamente as populações de linfócitos e de linfoblastos como R1 e R2, respectivamente, considerou-se como índice proliferativo (IP) a relação inversa entre o número de eventos obtidos em R2 do grupo controle (sem adição de mitógeno) e os eventos obtidos em R2 dos grupos tratados com PHA, como melhor descrito na seção de Material e Métodos, e utilizado por vários pesquisadores (Stemme e Kallberg, 1992, Gaines *et al.*, 1996, Wang e Zheng, 2002).

Embora se tenha constatado que a PHA ativou a maioria da população de linfócitos T presentes nos MNC, causando sua transformação, observou-se que, após três dias de incubação, nenhuma das concentrações testadas do meio contendo PHA foi capaz de promover sua proliferação, a qual tornou-se evidente a partir do quarto dia de incubação, nas concentrações de 5, 10 e 25% de M-PHA, com um aumento significativo de $1,89 \pm 0,22$ ($n=4$, $p<0,01$), $2,95 \pm 0,28$ ($n=5$, $p<0,001$) e $1,77 \pm 0,22$ ($n=5$, $p<0,01$) vezes respectivamente, em relação ao grupo não tratado. Esses resultados estão melhor ilustrados na Figura 6.

Apos 5 dias de incubação, todas as concentrações de M-PHA testadas foram eficientes em estimular a divisão celular, apresentando aumento significativo do número de células em relação ao controle não estimulado. Porém, foi na concentração de 10% de M-PHA onde se observou o melhor e mais significativo efeito, com um IP de $4,90 \pm 0,19$ vezes

maior do que o obtido para o controle (n=4; $p<0,00001$). De forma semelhante, maior e significativo estímulo também foi observado nesta concentração de M-PHA quando se comparou o controle à melhor resposta proliferativa obtida com 4 dias de incubação, onde obteve-se um índice de $2,95\pm 0,28$ em relação ao controle (n = 5; $p = 0,001$) (Figura 6).

Em contraste, nas culturas onde as concentrações de meio com PHA excediam 10%, tanto após 4 quanto 5 dias de incubação, houve uma diminuição significativa do IP, o qual mostrou-se, então, estável. Este decréscimo de estímulo parece estar diretamente relacionado ao grau de toxicidade da PHA relatado anteriormente.

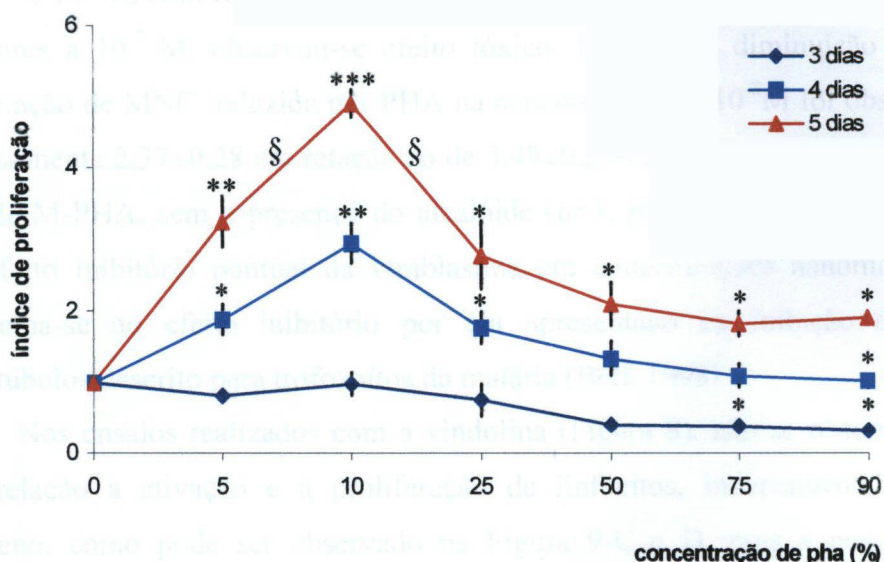


Figura 6. Efeito *in vitro* da fitohemaglutinina sobre a proliferação de linfócitos humanos. Mononucleares obtidos de sangue periférico de voluntários saudáveis, após isolamento em gradiente de densidade, foram tratados com proporções crescentes do meio de cultura Meio para Cariótipo enriquecido com fitohemaglutinina como indicado e incubados a 37°C por 3 a 5 dias, em atmosfera de 5-10% de CO₂. Os pontos representam a relação média \pm EPM do número de eventos detectados por citometria de fluxo entre as culturas estimuladas por fitohemaglutinina em relação à fração não estimulada. (*) $p<0,01$; (**) $p<0,001$; (***) $p<0,0001$.

Com esses resultados, a concentração de 10% de meio contendo PHA e o período de 5 dias de incubação passaram a ser utilizados nos ensaios que se seguiram para a

investigação do potencial imunomodulatório dos alcalóides e extratos de plantas de uso popular proposto neste trabalho

Efeito de alcalóides sobre a imunomodulação de mononucleares

Com o objetivo de avaliar o efeito dos alcalóides vimblastina, perivina e vindolina sobre a proliferação de linfócitos estimulada por PHA, concentrações variadas destes foram incubadas com suspensões de MNC humanos nas condições pre-estabelecidas, ou seja, 5 dias a 37°C e em atmosfera de 5-10% de CO₂ em meio contendo 10% de M-PHA

Para o alcaloide vimblastina (Figura 7), não se observou efeito nas concentrações de 10⁻¹⁰ e 10⁻⁹M com IP de 3,44±0,41 e 3,44±0,34, respectivamente. Já nas concentrações superiores a 10⁻⁷ M observou-se efeito tóxico. Entretanto, diminuição significativa da proliferação de MNC induzida por PHA na concentração de 10⁻⁸M foi observada, com um IP de somente 2,37±0,28 em relação ao de 3,49±0,22 obtido para a população tratada com 10% de M-PHA, sem a presença do alcaloide (n=3, p=0,03). Interessante com relação a este efeito inibitório pontual da vimblastina em concentrações nanomolares e que ele assemelha-se ao efeito inibitório por ela apresentado na inibição da formação de microtubulos descrito para trofozoitos da malária (Bell, 1998)

Nos ensaios realizados com a vindolina (Figura 8), não se observou efeito algum com relação a ativação e a proliferação de linfócitos, independente da presença de mitógeno, como pode ser observado na Figura 9-C e D, pois a população inicial de linfócitos não sofreu o deslocamento esperado para essas células quando ativadas e nem aumentou de número em relação às populações controles. Infelizmente, não foram preparados citocentrifugados do material após cultivo que pudessem confirmar a presença predominante de linfócitos, confirmando os resultados da citometria de fluxo

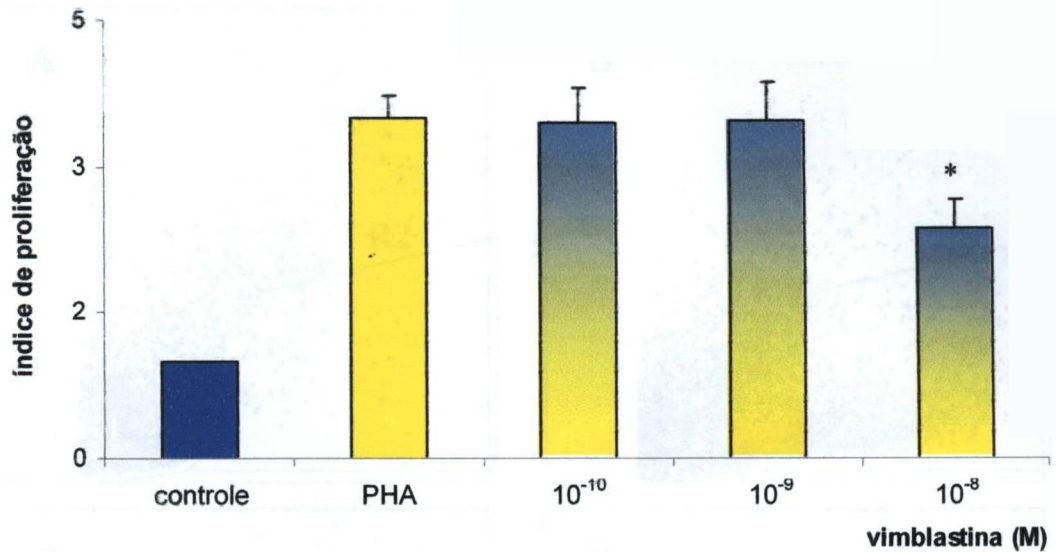


Figura 7. Efeito *in vitro* da vinblastina sobre a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina. Mononucleares obtidos de sangue periférico de voluntários saudáveis, após isolamento em gradiente de densidade, foram tratados com vinblastina como indicado e incubados a 37°C, por 5 dias, em atmosfera de 5-10% de CO₂. Cada coluna representa a média do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo vinblastina e o número obtido no controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos realizados em triplicata. **p*<0,05

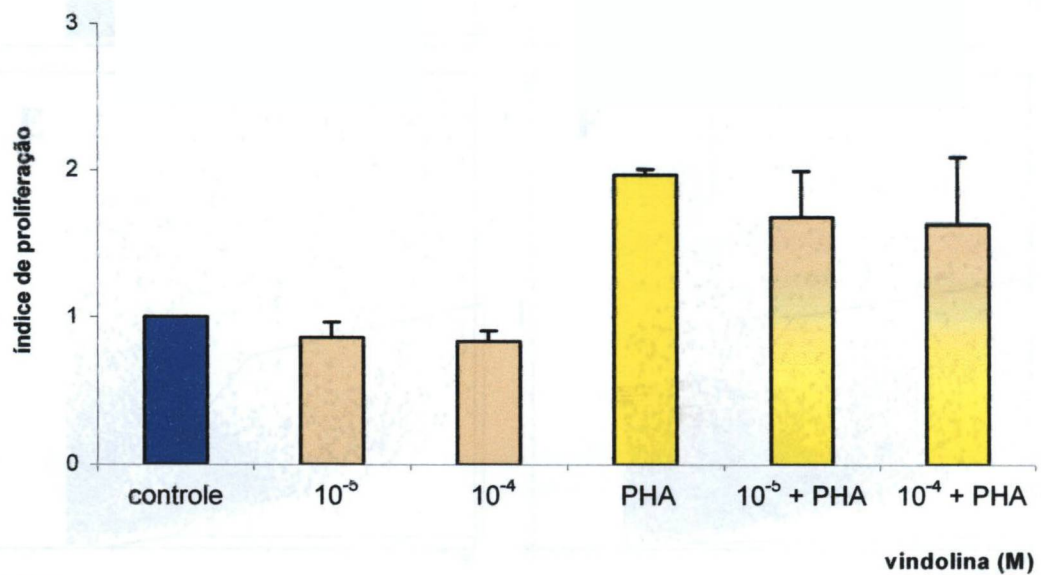


Figura 8. Efeito *in vitro* da vindolina sobre a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina. Mononucleares obtidos de sangue periférico de voluntários saudáveis, após isolamento em gradiente de densidade, foram tratados com vindolina como indicado e incubados a 37°C por 5 dias, em atmosfera de 5-10% de CO₂. Cada coluna representa a média do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo vindolina pelo número obtido no controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos realizados em triplicata.

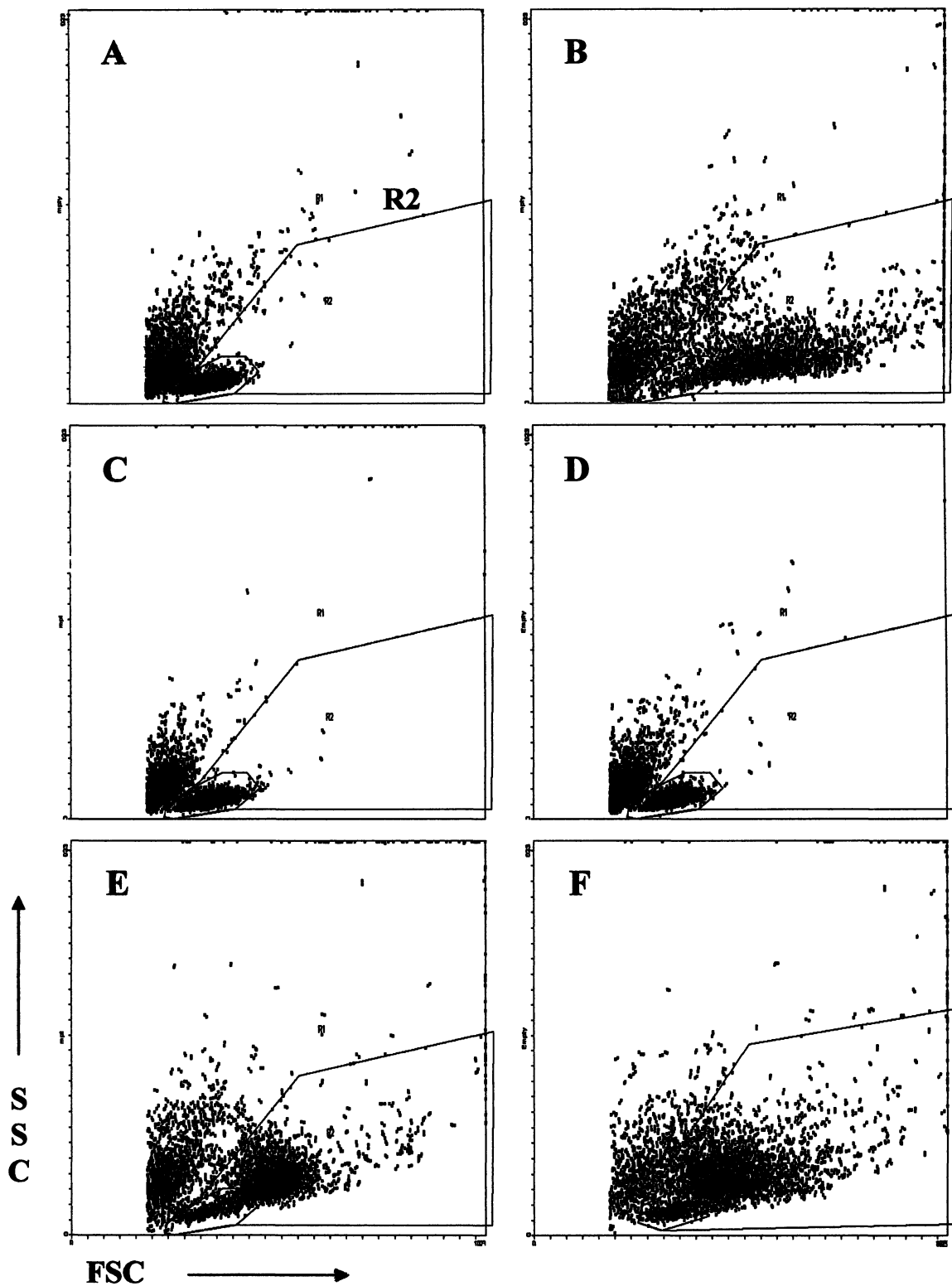


Figura 9 Linfócitos e seu posicionamento no citômetro de fluxo Mononucleares obtidos de sangue periférico de voluntários sadios foram cultivados por 5 dias, a 37°C e em atmosfera de 5-10% CO₂ (A) Em alguns experimentos, essas células foram tratadas com fitohemaglutina (B), vindolina, na concentração de 10⁻³M (C) e a 10⁻⁴M (D), sulfato de vimblastina, a 10⁻⁸M (E) ou perivina, a 10⁻³M (F) Em seguida, foram analisadas por citometria de fluxo, onde as características de tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC) foram utilizadas para distinguir cada população R1 denota a região delimitada para linfócitos, não estimulados, e R2, a região para linfoblastos, onde cada ponto representa uma célula detectada no sistema

Para a perivina, uma atividade inibitória branda, porém significativa, foi observada sobre a proliferação espontânea de linfócitos (Figura 10), cujos valores de IP foram, em média, $0,88 \pm 0,01$ ($n=3$; $p<0,000001$) e $0,74 \pm 0,09$ ($n=3$; $p<0,0001$), respectivamente, para as concentrações de 10^{-7} e 10^{-5} M. Importante ressaltar que, como não há referências na literatura sobre atividades imunomodulatórias do alcalóide perivina, neste trabalho avaliouse concentrações de 10^{-9} a 10^{-3} M, na presença ou não de mitógeno. Convém destacar que nas concentrações superiores a 10^{-5} o alcalóide mostrou-se tóxico.

Também é relevante o fato de que o deslocamento, no citômetro de fluxo, observado da população de linfócitos cultivados com vimblastina (Figura 9-E) e perivina (Figura 9-F), não foi tão evidente quando comparado àquele demonstrado pela PHA (Figura 9-B).

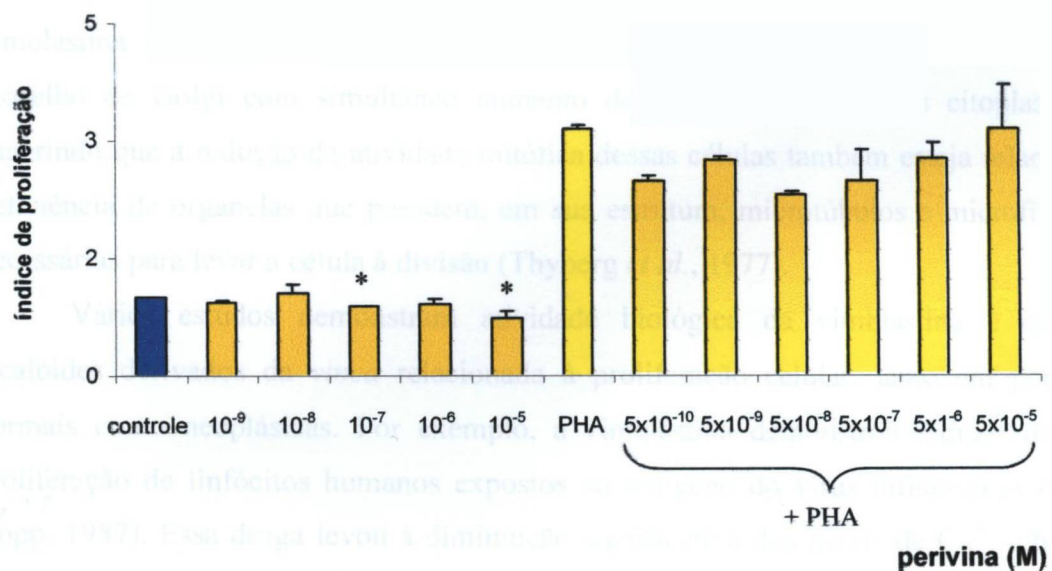


Figura 10. Efeito da perivina sobre a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina. Mononucleares obtidos de sangue periférico de voluntários sadios, após isolamento em gradiente de densidade, foram tratados com perivina como indicado e incubados a 37°C por 5 dias, em atmosfera de 5-10% de CO_2 . Cada coluna representa a média do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo perivina pelo número obtido no controle (não tratado) de pelo menos três experimentos realizados em triplicata.

Vimblastina é um alcaloide derivado da *Vinca rosea* Linn que semelhante a colchicina, tem a capacidade de bloquear a mitose celular. O mecanismo de ação envolve sua ligação específica com a tubulina impedindo sua polimerização e consequentemente, a formação de microtubulos, imprescindíveis para o fuso mitótico (Jordan e Wilson 2004, Wilson e Jordan 2004). Neste contexto, células que estão se preparando para a divisão não conseguem ultrapassar a fase de metafase do ciclo celular (Chabner *et al* 1996). Este bloqueio leva as células a morte celular com mudanças morfológicas características de apoptose (Smets 1994, Jordan e Wilson, 2004). Ainda microtubulos são importantes na estruturação geral das células (Alberts *et al*, 1994), fazendo parte não só do citoesqueleto, como também de organelas.

Estudos usando a transformação blastica e o índice mitótico como parâmetros de proliferação celular mostram que linfócitos estimulados por PHA têm rearranjo dos microfilamentos e microtubulos o qual pode ser inibido por colchicina e vimblastina (Thyberg *et al* 1977, Eisenthal *et al*, 1996). Na ausência de microtubulos induzidos por vimblastina e colchicina, também se observou um número reduzido de cisternas no aparelho de Golgi com simultâneo aumento do número de vacuolos citoplasmáticos, sugerindo que a redução da atividade mitótica dessas células também esteja relacionada a deficiência de organelas que possuem em sua estrutura, microtubulos e microfilamentos necessárias para levar a célula a divisão (Thyberg *et al*, 1977).

Vários estudos demonstram atividade biológica da vimblastina e de outros alcaloides derivados da *vinca* relacionada a proliferação celular tanto em populações normais como neoplásicas. Por exemplo, a vimblastina demonstrou reduzir *in vitro* a proliferação de linfócitos humanos expostos ao antígeno do vírus influenza A (Gorse e Kopp, 1987). Essa droga levou a diminuição significativa dos níveis de Ca^{++} intracelular em células Jurkatt, uma linhagem celular tumoral produtora de IL2 derivada de leucemia humana aguda do tipo T (Gillis e Watson, 1980), mas estimulou a produção de IL2, sugerindo que microfilamentos não interferem na transdução de sinais, pelo menos em linfoblastos leucêmicos estimulados por PHA (Dupuis *et al*, 1993). Interessante notar, também, que a interação da calmodulina, uma proteína citoplasmática ligante de Ca^{++} , com proteínas alvo é inibida pela vimblastina (Molnar *et al*, 1995), indicando que a vimblastina atua simultaneamente em vários mecanismos moleculares.

A maioria dos agentes antimitóticos derivados da *vinca* possui estrutura dimerica assimétrica variada, como já referido na introdução deste trabalho e mudanças mínimas resultam em diferenças significativas com relação a toxicidade e atividades anti-tumorais.

descritas (Chabner *et al* , 1996) A diversidade de resultados aqui apresentados parece, de fato, estar relacionada a estrutura química de cada alcaloide, visto que, apenas os que possuem uma estrutura dimerica têm atividade anti-neoplásica relatada (Kirsch-Volders e Parry, 1996) Neste contexto é interessante notar que a vindolina, um alcaloide de estrutura monomérica como a perivina, com somente um núcleo indólico (Svoboda, 1958), cuja síntese remonta a década de 60 (Farnsworth *et al* , 1963) mostrou-se desprovido de ação nos ensaios propostos, corroborando com o fato de que até o momento, não há atividades biológicas descritas para este composto a exceção de modesta atividade mio-relaxante e hipotensora (Perera *et al* , 1985) Em contraste, gabunina, um alcaloide dimerico derivado da perivina (Cava *et al* , 1965) já demonstrou atividade leishmanicida (Munoz *et al* 1994b, Akendengue *et al* 1999), sustentando a hipótese de que a ausência de efeitos biológicos observados para a vindolina assim como as ações modestas apresentadas pela perivina, podem estar relacionadas a suas estruturas químicas. É possível que esses dois alcaloides possam tornar-se biologicamente ativos se sua estrutura química primária for modificada ou mesmo adicionada de radicais que lhe confirmem melhor (ou maior) atividade como relatado para a própria vinblastina entre outros alcaloides da *vinca*, a qual sofreu modificações moleculares devido a sua neurotoxicidade, baixos instabilidade e rendimento (Buss e Waigh, 1995)

Efeito de extratos de plantas medicinais sobre a imunomodulação de células mononucleares

Para se estudar o efeito imunomodulatório das plantas medicinais incluídas neste trabalho concentrações de 1 a 1000µg/ml de extratos preparados dos capítulos florais de camomila, das raízes de ginseng brasileiro, das folhas de escada-de-macaco, das cascas de agoniada e de pau-pra-tudo, das raízes de equinacea, das folhas de cipo-suma, das raízes de canela-de-veado do mesocarpo interno de pequi e das folhas do pequizeiro foram adicionadas a suspensões de MNC humanos e incubados nas mesmas condições experimentais estabelecidas com PHA ou seja, 5 dias a 37°C e atmosfera de 5-10% de CO₂ Os resultados referentes ao estudo de toxicidade desses extratos estão demonstrados na Tabela 3

De todos os extratos incluídos neste estudo, somente os preparados das raízes e rizomas de ginseng brasileiro não apresentaram toxicidade para com os MNC humanos em

todas das concentrações ensaiadas. A exceção do extrato das cascas de agoniada e do de folhas de cipo-suma, que apresentaram toxicidade a partir da concentração de 10 e 100µg/ml, respectivamente, e do de ginseng brasileiro, que, ao contrário, não se mostrou tóxico em nenhuma das concentrações testadas, todos os demais demonstraram toxicidade às células humanas somente na concentração mais elevada, ou seja, 1000µg/ml. Nas concentrações intermediárias, não foram observados efeitos diferentes daqueles obtidos com os controles não tratados. Pelo contrário, em muitos dos ensaios realizados com os extratos, células demonstraram viabilidade até mesmo superior àquela observada para os controles.

Tabela 3. Avaliação de toxicidade de extratos preparados de diferentes plantas medicinais sobre células mononucleares humanas

| EXTRATOS | controle | 1µg/ml | 10µg/ml | 100µg/ml | 1000µg/ml |
|-------------------------------|-----------------|---------------|----------------|-----------------|------------------|
| camomila | 96,3±1,7 | 94,7±3,0 | 96,0±1,2 | 90,7±5,8 | NR |
| canela-de-veado | 57,0±5,4 | 64,4±3,9 | 66,2±4,0 | 71,0±4,7 | 25,0±1,0 |
| folhas do pequi | 57,0±5,4 | 63,6±3,7 | 71,2±4,4 | 71,0±3,3 | 19,5±3,5 |
| mesocarpo do pequi | 57,0±5,4 | 66,2±4,6 | 66,4±2,7 | 68,6±7,0 | 2,0±1,0 |
| cipó-suma | 48,0±6,4 | 59,8±9,2 | 58,5±9,4 | 39,5±7,1 | 18,5±7,1 |
| equinacea | 46,9±3,6 | 43,2±3,7 | 56,6±1,6 | 61,4±1,2 | 14,1±1,9 |
| agoniada | 43,5±4,5 | 41,0±4,0 | 28,5±3,5 | 4,0±0,4 | NR |
| ginseng brasileiro | 30,0±4,7 | 26,1±1,7 | 29,2±3,9 | 33,6±2,9 | 43,9±3,7 |
| escada-de-macaco | 30,0±4,7 | 30,6±2,5 | 48,5±2,7 | 43,7±4,6 | 17,7±1,3 |
| pau-pra-tudo | 57,0±5,4 | 60,2±7,6 | 71,8±3,7 | 63,4±7,5 | 31,5±1,5 |

Suspensões de células mononucleares obtidas de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram incubadas com as concentrações indicadas de extratos preparados de plantas medicinais e incubadas a 37°C, por 5 dias, em tensão de CO₂. A viabilidade foi observada em hemocitômetro, com solução de azul de tripano. Cada valor representa a percentagem média de células viáveis ± EPM, obtida de, pelo menos, três experimentos realizados em triplicata (NR) não realizado.

Simultaneamente, avaliou-se a capacidade desses mesmos extratos em promover transformação blastica, incubando-se concentrações crescentes com suspensão de MNC

por 5 dias a 37°C em atmosfera reduzida de CO₂. Como efeito positivo dessa capacidade, comparou-se a percentagem de blastos obtidos após exposição de suspensão de MNC a várias concentrações dos extratos aquela obtida após exposição a 10% de M-PHA. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4. Presença de blastos estimulada por extratos preparados de diferentes plantas medicinais em culturas de linfócitos humanos.

| EXTRATOS | BLASTOS (%) | | | | |
|----------------------------|-------------|----------|----------|----------|-----------|
| | controle | 1µg/ml | 10µg/ml | 100µg/ml | 1000µg/ml |
| camomila | 7,2±0,6 | 6,9±0,4 | 6,8±0,3 | 5,6±0,1 | - |
| + PHA | 87,7±0,5 | 88,3±0,8 | 87,6±1,1 | 87,5±0,6 | - |
| canela-de-veado | 9,4±2,5 | 6,6±1,6 | 7,6±2,9 | 6,4±2,0 | - |
| + PHA | 76,8±4,9 | 78,8±6,4 | 78,9±6,0 | 79,2±5,6 | - |
| pequizeiro (folhas) | 9,4±2,5 | 6,3±2,1 | 3,7±0,6 | 3,8±0,5 | - |
| + PHA | 76,8±4,9 | 77,2±6,9 | 77,2±6,4 | 76,6±5,8 | - |
| pequi (mesocarpo) | 9,4±2,5 | 8,3±3,3 | 7,3±2,4 | 6,9±2,7 | - |
| + PHA | 76,8±4,9 | 77,1±7,2 | 78,7±5,5 | 78,8±5,5 | - |
| cipó-suma | 9,4±2,5 | 8,9±3,2 | 6,8±2,5 | 13,9±7,0 | - |
| + PHA | 76,8±4,9 | 78,3±6,1 | 78,0±6,8 | 83,4±2,2 | - |
| equinacea | 3,6±0,1 | 3,9±0,3 | 2,9±0,5 | 3,7±0,8 | - |
| + PHA | 83,4±0,9 | 81,9±1,0 | 82,2±1,2 | 84,2±1,0 | - |
| agoniada | 9,4±2,5 | 10,5±2,1 | 11,9±3,4 | - | - |
| + PHA | 76,8±4,9 | 79,4±4,7 | 79,1±5,3 | - | - |
| ginseng brasileiro | 5,8±0,8 | 6,0±0,9 | 6,1±0,8 | 4,9±0,5 | 4,9±0,8 |
| + PHA | 87,7±1,8 | 86,9±2,3 | 85,9±2,3 | 86,6±2,3 | 88,0±1,4 |
| escada-de-macaco | 5,8±0,8 | 5,7±0,5 | 3,9±0,5 | 4,8±0,9 | - |
| + PHA | 87,7±1,8 | 83,4±1,8 | 81,2±2,1 | 79,8±1,5 | - |
| pau-pra-tudo | 9,4±2,5 | 8,5±3,3 | 4,7±1,6 | 9,8±3,8 | - |
| + PHA | 76,8±4,9 | 77,7±6,1 | 78,6±5,8 | 75,3±4,3 | - |

As concentrações de células mononucleares obtidas de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram comparadas com as concentrações indicadas de extratos preparados de plantas medicinais e incubadas a 37°C, por 5 dias, em tensão de CO₂. Em alguns experimentos, os MNC foram simultaneamente expostos à fitohemaglutinina. A morfologia foi avaliada em citocentrífugados corados com May-Grunwald-Giemsa, sob imersão em microscópio comum. Cada valor representa a percentagem média de blastos ± EPM, obtida de pelo menos três experimentos realizados em triplicata, onde um mínimo de 100 células foi observado por experimento.

De forma geral, observou-se que, quando incubadas somente com extratos, a maioria das células constituiu-se de linfócitos, independente da concentração ensaiada e somente em algumas poucas exceções, a percentagem de linfoblastos ultrapassou 10% da população. Entretanto, quando expostos aos extratos e, simultaneamente, a PHA, a inversão na percentagem de blastos foi evidente, passando esses a constituírem pelo menos três quartos da população analisada. Este comportamento foi muito semelhante aquele descrito anteriormente quando se avaliou a capacidade da PHA em ativar MNC humanos e indicou que os extratos, por si mesmos, não têm habilidade para ativar linfócitos humanos nas condições experimentais propostas.

Todos os extratos, a exceção dos de camomila e escada-de-macaco, inibiram a proliferação espontânea de MNC na concentração de 1 µg/ml, cujo perfil se repetiu na presença de PHA (Tabela 5). Embora este efeito inibitório tenha sido bastante modesto para a maioria dos extratos e significativo para os de equinacea e ginseng brasileiro, sabe-se, por exemplo, que a medida *in vitro* de um efeito envolve um evento celular direto e seria difícil recriar a farmacocinética complexa que ocorre quando essas células são expostas a mesma mistura *in vivo*.

Extratos são constituídos por compostos de natureza química diversificada e é possível que essa mistura complexa tenha interferido com processos metabólicos dos MNC, levando-os a ter esse comportamento inibitório tendencioso. Portanto, esses efeitos devem ser interpretados com cautela, pois, podem de fato ser decorrentes da manipulação de células e sua exposição a substâncias atóxicas presentes nesses extratos que podem ter se tornado nocivas ao sistema após serem metabolizadas, por não possuírem um mecanismo de eliminação (Freshney, 2000).

Tabela 5. Efeito de extratos de plantas medicinais sobre a proliferação de células mononucleares humanas.

| EXTRATOS | ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO ± EPM | | | | |
|------------------------|------------------------------|---------------|----------------|-----------------|----------------------|
| | 1 (µg/ml) | 10 (µg/ml) | 100 (µg/ml) | 1000 (µg/ml) | M-PHA 10% (µg/ml) |
| camomila | 1,10±0,03* | 1,00±0,09 | 1,35±0,03** | - | - |
| | 2,49±0,12 | 2,27±0,22 | 2,28±0,15 | - | 2,58±0,21 |
| canela-de-veado | 0,84±0,16 | 1,03±0,12 | 0,98±0,12 | 0,10±0,04 | - |
| | 1,86±0,36 | 1,87±0,46 | 1,21±0,31 | - | 1,97±0,04 |
| pequizeiro (folhas) | 0,86±0,10 | 1,25±0,12 | 1,44±0,32 | 0,66±0,09 | - |
| | 1,74±0,33 | 2,04±0,46 | 2,25±0,39 | - | 1,97±0,04 |
| pequi (fruto) | 0,79±0,13 | 1,00±0,05 | 1,04±0,08 | 0 | - |
| | 1,71±0,30 | 1,79±0,39 | 1,89±0,49 | - | 1,97±0,04 |
| cipo-suma | 0,76±0,16 | 0,88±0,12 | 0,51±0,09** | 0,18±0,06 | - |
| | 1,76±0,40 | 2,01±0,47 | 1,55±0,38 | - | 1,97±0,04 |
| equinacea | 0,82±0,06* | 1,17±0,06* | 1,20±0,12 | 0,32±0,05 | - |
| | 3,65±0,48 | 4,04±0,64 | 4,36±0,15 | - | 3,71±0,059 |
| agoniada | 0,91±0,27 | 0,64±0,13* | 0,07±0,02 | - | - |
| | 1,50±0,28 | 1,27±0,25 | 0,08±0,01 | - | 1,97±0,04 |
| ginseng brasileiro | 0,84±0,02** | 0,98±0,09 | 1,21±0,05* | 1,55±0,10** | - |
| | 2,18±0,49 | 2,27±0,67 | 2,75±0,40 | 3,90±0,63 | 2,89±0,55 |
| escada-de- macaco | 1,02±0,07 | 1,63±0,11** | 1,44±0,08** | 0,78±0,16 | - |
| | 1,97±0,40 | 2,01±0,48 | 2,50±0,53 | - | 2,89±0,55 |
| pau-pra-tudo | 0,88±0,18 | 1,15±0,05* | 0,75±0,07* | 0,08±0,03 | - |
| | 1,84±0,49 | 1,97±0,48 | 1,24±0,13** | - | 1,97±0,04 |

Suspensões de mononucleares humanos foram tratadas com concentrações crescentes de extratos preparados de plantas medicinais como indicado e incubados a 37°C, por 5 dias em tensão de CO₂. Em alguns experimentos, 10% de meio contendo fitohemaglutinina (M-PHA) foi adicionado às culturas. Cada valor representa o índice proliferativo (IP) obtido por citometria de fluxo, da relação entre a média do número de eventos detectados nos testes pelo número obtido no controle (**p*<0,05, ***p*<0,01).

Revisões recentes da literatura citam a equinacea (e/ou seus componentes) como uma planta de reconhecidas atividades imunomoduladora e anti-inflamatória (Borchers *et al* 2000, Dockrell e Leever 2000, *et al*, 2003, Barrett, 2003, Mishima *et al*, 2004), seja em estudos *in vivo* (Coeugnet e Elek, 1987, Bukovsky *et al*, 1993, Currier e Miller, 2000, 2001, Goel *et al*, 2002a, Wagner e Jurcic, 2002, Bany *et al*, 2003, Jurkstiene *et al*, 2004), incluindo triagens clínicas (*et al*, 2003), ou *in vitro* (Coeugnet e Elek, 1987, Wildfeuer e

Mayerhofer, 1994; Rininger *et al.*, 2000; Goel *et al.*, 2002b; Wilasrusmee *et al.*, 2002; Gan *et al.*, 2003; Randolph *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 2004; Jurkstiene *et al.*, 2004), e o seu extrato foi o primeiro a ser ensaiado com o objetivo de se tentar reproduzir os efeitos imunoestimulantes relatados.

O perfil proliferativo obtido após exposição de MNC ao extrato preparado de cápsulas comerciais de equinácea está demonstrado na Figura 11. Nele, observa-se um efeito estimulador dose-dependente, independente da presença de PHA. O mais surpreendente nesta série de experimentos foi com relação à intensidade dos efeitos obtidos, bastante modestos nas condições experimentais utilizadas e contrastante com os efeitos significativos descritos para esta planta.

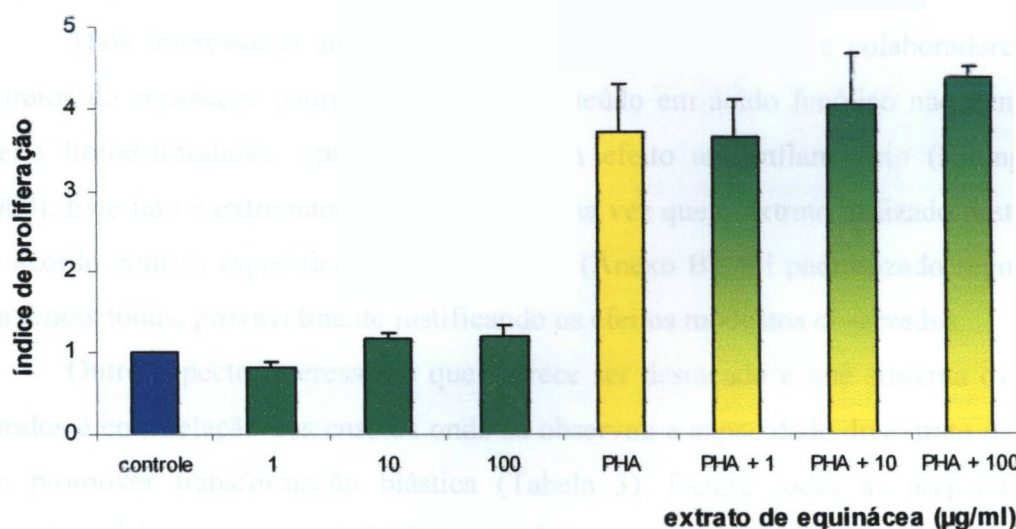


Figura 11. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Echinacea purpurea* sobre a proliferação *in vitro* de mononucleares humanos. Suspensões de mononucleares humanos foram tratadas nas concentrações indicadas de extrato preparado de cápsulas comerciais contendo raízes de equinácea e incubadas por 5 dias, a 37°C em tensão de CO₂. Em alguns experimentos, meio contendo fitohemaglutinina (PHA), na concentração de 10%, foi adicionado. Cada coluna representa a média do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo extrato e o número obtido no controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos realizados em triplicata.

Entretanto, atividades imunoestimulantes de equinácea têm gerado controvérsias e ausência de atividade para preparados desta planta também já foi relatada (Stimpel *et al.*,

1984 Wildfeuer e Mayerhofer, 1994, South e Exon 2001, Barrett 2003) Dessa forma, algumas considerações são necessárias ao se analisar esses dados Primeiro, a equinacea não é uma planta nativa no Brasil, sendo consumida como medicamento imunestimulante na forma de extrato, particularmente como capsulas Segundo, há diferentes preparações usadas para esse fim e que são comercializadas com o mesmo nome fantasia, como extensivamente revisto por Block e Meade (2003) Verificou-se que essas preparações apresentam (1) composição química extremamente variada, (2) incluem diferentes espécies, como a *E purpurea* (L) Moench, a *E angustifolia* DC e a *E pallida* (Nutt) Nutt, (3) são cultivadas em diferentes regiões geográficas, (4) são preparadas por processos diferentes, inclusive com relação a obtenção dos extratos, (5) muitas preparações envolvem não só as raízes, mas também partes aéreas das plantas (Cundell *et al*, 2003), etc Além disso há muita variabilidade na metodologia usada para acessar a atividade imunomodulatória

Mais interessante ainda é o recente relato de Rininger e colaboradores, no qual extratos de equinacea padronizados pelo conteúdo em ácido fenólico não demonstraram efeito linfestimulante, apesar de exercerem efeito anti-inflamatório (Rininger *et al*, 2000) Este fato é extremamente relevante, uma vez que o extrato utilizado neste trabalho, de acordo com as especificações de sua bula (Anexo B), foi padronizado segundo o teor em fenóis totais, provavelmente justificando os efeitos modestos observados

Outro aspecto interessante que merece ser destacado é que sustenta os resultados obtidos e com relação aos ensaios onde se observou a capacidade do extrato de equinacea em promover transformação blastica (Tabela 3) Dentre todas as preparações, a de equinacea foi a que menos induziu a transformação morfológica espontânea de linfócitos, onde menos que 4% de blastos foram detectados após 5 dias de cultura, em todas as concentrações testadas Esses dados estão também de acordo com as observações de (Wildfeuer e Mayerhofer, 1994), ao estudarem duas preparações comerciais de equinacea

Portanto, é possível que o extrato usado neste trabalho não tenha sido eficiente para revelar as atividades imunológicas reputadas à equinacea, sendo necessário o uso de extratos preparados por protocolos alternativos Por outro lado, por terem repetido resultados inibitórios descritos por outros, eles servem como mais um alerta com relação ao uso de preparações de equinacea quando o objetivo clínico for o de estimulante da resposta imunológica

Para os extratos preparados de ginseng brasileiro (Figura 12), escada-de-macaco (Figura 13) e folhas de pequizeiro (Figura 14), nossos estudos demonstraram atividade

proliferativa dose-dependente em relação aos controles não tratados e, embora modesta, essa ação foi significativa para os dois primeiros extratos. Este efeito foi independente da presença de PHA.

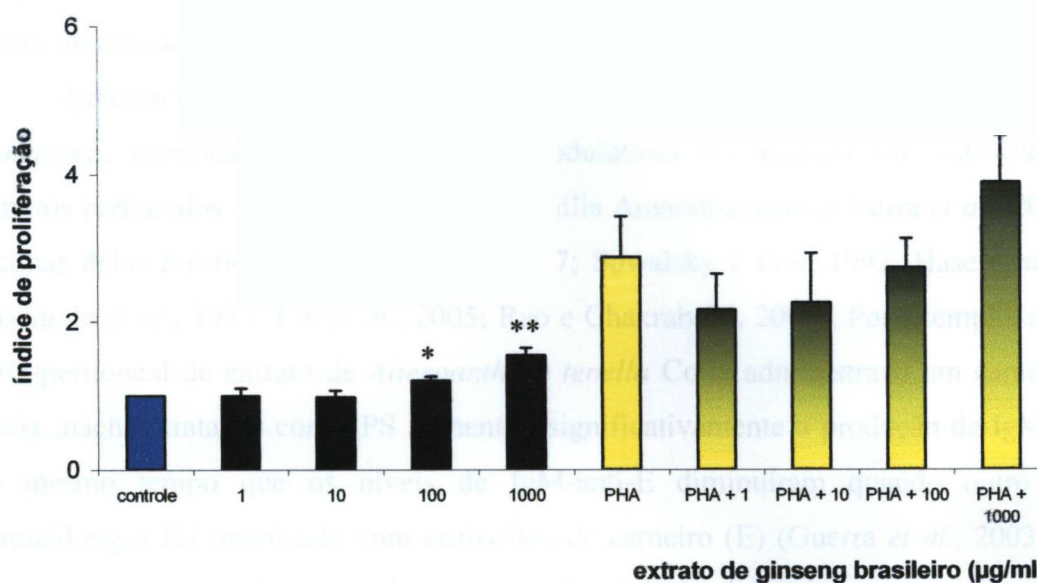


Figura 12. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Pfaffia glomerata* sobre a proliferação *in vitro* de mononucleares humanos. Suspensões de mononucleares humanos foram tratadas nas concentrações indicadas de extrato preparado de raízes e rizomas de ginseng brasileiro e incubadas por 5 dias, a 37°C em tensão de CO₂. Em alguns experimentos, meio contendo fitohemaglutinina (PHA), na concentração de 10%, foi adicionado. Cada coluna representa a média do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo extrato e o número obtido no controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Como extensivamente revisado por Block e Mead (2003), muitas plantas são popularmente denominadas ginseng por apresentarem efeitos similares. Porém, as de origem asiática, coreana (*Panax ginseng* C.A. Meyer Araliaceae), americana (*Panax quinquefolius* L.) e siberiana (*Eleutherococcus senticosus* Maxim., Araliaceae) são consideradas as verdadeiras representantes do grupo. A maioria dos estudos que descrevem atividades biológicas para esse grupo de plantas usa o *P. ginseng* como material de investigação. Dentre suas atividades descritas em modelos *in vivo* e *in vitro*, destaca-se um efeito imunomodulador indireto, envolvendo macrófagos e células NK. Em contraste,

quando se utilizou metodologia similar a desse trabalho não se observou aumento da proliferação de linfócitos T induzida por mitógenos (Jie *et al* , 1984, Kim *et al* 1990) e, sim, supressão dessa atividade (Chong *et al* , 1984) Da mesma forma, atividades indiretas sobre o sistema imunitário foram observadas quando os efeitos inibitórios da *Pfaffia paniculata*, outra espécie popularmente conhecida como ginseng brasileiro, sobre o crescimento de células tumorais alógenas em camundongos (Watanabe *et al* , 2000) foram investigados

Embora não haja estudos demonstrando atividade imunestimulante com a *Pfaffia glomerata*, significativa atividade imunomodulatória em animais tem sido atribuída a extratos preparados de plantas da mesma família Amaranthaceae (Guerra *et al* , 2003) ou a lectinas delas purificadas (Arora *et al* , 1987, Sowalsky e Fox, 1992, Hase *et al* , 1997, Lascurain *et al* , 1997, Lin *et al* , 2005, Rao e Chakrabarti, 2005) Por exemplo, aplicação intra-peritoneal de extrato de *Alternanthera tenella* Colla administrado em camundongos Swiss machos tratados com LPS aumentou significativamente a produção de IgM e IgG₂, ao mesmo tempo que os níveis de IgM-anti-E diminuíram quando outro lote de camundongos foi imunizado com eritrócitos de carneiro (E) (Guerra *et al* , 2003) Peixes alimentados com ração contendo sementes de *Achyranthes aspera* por quatro semanas, antes de serem imunizados intraperitonealmente com eritrócitos de galinha, ao contrário, demonstraram elevação significativa dos níveis de anticorpos hemaglutinantes, assim como níveis elevados da fração globulínica (Rao e Chakrabarti, 2005) Extrato aquoso de *Amaranthus spinosus* estimulou significativamente a proliferação de esplenócitos e linfócitos B de ratas BALB/c (Lin *et al* , 2005) Esses relatos demonstram que os efeitos imunomoduladores dessa família parecem estar relacionados a ativação de linfócitos B

Diante dessas evidências, é possível supor que o extrato de ginseng brasileiro testado contenha lectinas ou biopeptídeos que atuem como mitógenos e que os efeitos modestos observados sejam decorrentes de sua ação sobre a pequena população de linfócitos B presentes na suspensão de MNC sanguíneos Esta hipótese se deve ao fato de que o perfil imunomodulatório observado para este extrato não se modificou na presença de PHA, a qual é um mitógeno específico para células T

A metodologia usada neste trabalho para avaliar as atividades imunomodulatórias não faz distinção entre as populações de linfócitos contidas na fração de MNC periféricos, sendo este um fator que pode mascarar os resultados de uma substância que tenha ação sobre linfócitos B É possível que a repetição destes ensaios com uma população rica em células B e com mitógenos que atuem com maior especificidade sobre essa população,

como o LPS ou o PWM, por exemplo, possa revelar efeitos imunoestimulantes significativos para esse extrato como os observados para outros gêneros.

Quanto ao extrato de escada-de-macaco (Figura 13), atividade mitogênica para linfócitos humanos já foi relatada apenas para o extrato preparado de folhas de *Bauhinia carronii* (Flower *et al.*, 1984). Entretanto, algumas lectinas isoladas de plantas desse gênero têm se mostrado úteis tanto para células T (Imai e Osawa, 1983; Yamaguchi e Osawa, 1984; Sowalsky e Fox, 1992) como para B (Hishinuma *et al.*, 1983; Osawa, 1988), sendo seu maior emprego na separação das diferentes populações de linfócitos.

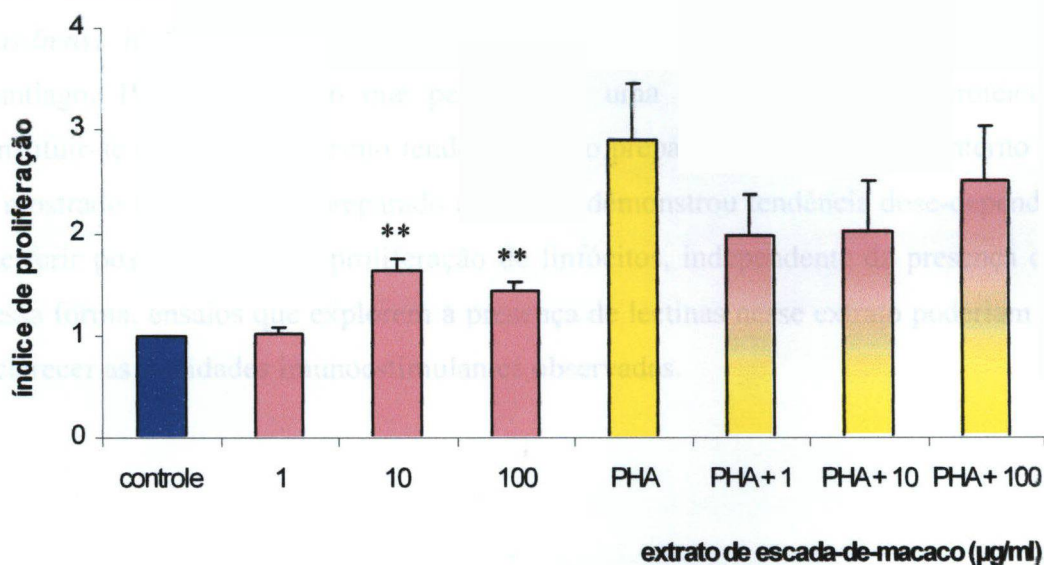


Figura 13. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia microstachya* sobre a proliferação *in vitro* de mononucleares humanos. Suspensões de mononucleares humanos foram tratadas nas concentrações indicadas de extrato preparado de folhas de escada-de-macaco e incubadas por 5 dias, a 37°C, em tensão de CO₂. Em alguns experimentos, meio contendo fitohemaglutinina (PHA), na concentração de 10%, foi adicionado. Cada coluna representa a média do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo extrato e o número obtido no controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos realizados em triplicata. ** $p < 0,01$.

Esta propriedade seletiva parece estar relacionada aos diferentes carboidratos presentes na membrana celular com os quais as lectinas seletivamente interagem (Yamaguchi e Osawa, 1984; Osawa, 1988). Por exemplo, lectina aglutinante purificada de

Bauhinia purpurea se mostrou útil para selecionar células T (Sowalsky e Fox, 1992) produtoras de IL2 de camundongos (Imai e Osawa 1983) para selecionar linfócitos T humanos de amígdalas (Sarker *et al* , 1993) ou, por outro lado, para enriquecer células B de camundongos (Hishinuma *et al* 1983, Yamaguchi e Osawa, 1984 Osawa, 1988) Mais recentemente esta lectina demonstrou ligar-se a membrana de células CD34⁺ com a mesma intensidade e padrão com que o faz com linfócitos T humanos, particularmente após tratamento com neuramidase (Kuemmel *et al* 1997), sugerindo seu uso na seleção de células primordiais hematopoiéticas

Em relação ao pequi (Figura 14), cujo extrato preparado de mesocarpo interno não se mostrou ativo nas condições experimentais propostas, não há relatos sobre atividade imunomodulatória. Porém, proteínas de diferentes partes do fruto e de sementes de *C. brasiliense* já foram isoladas e, dentre essas, atividade hemaglutinante já foi descrita (Santiago, 1998), sugerindo que pelo menos uma parte desta fração proteica parece constituir-se de lectinas. Mesmo tendo o extrato preparado do mesocarpo interno do fruto se mostrado sem efeito, o preparado de folhas demonstrou tendência dose-dependente em interferir positivamente na proliferação de linfócitos, independente da presença de PHA. Dessa forma, ensaios que explorem a presença de lectinas nesse extrato poderiam ajudar a esclarecer as atividades imunoestimulantes observadas.

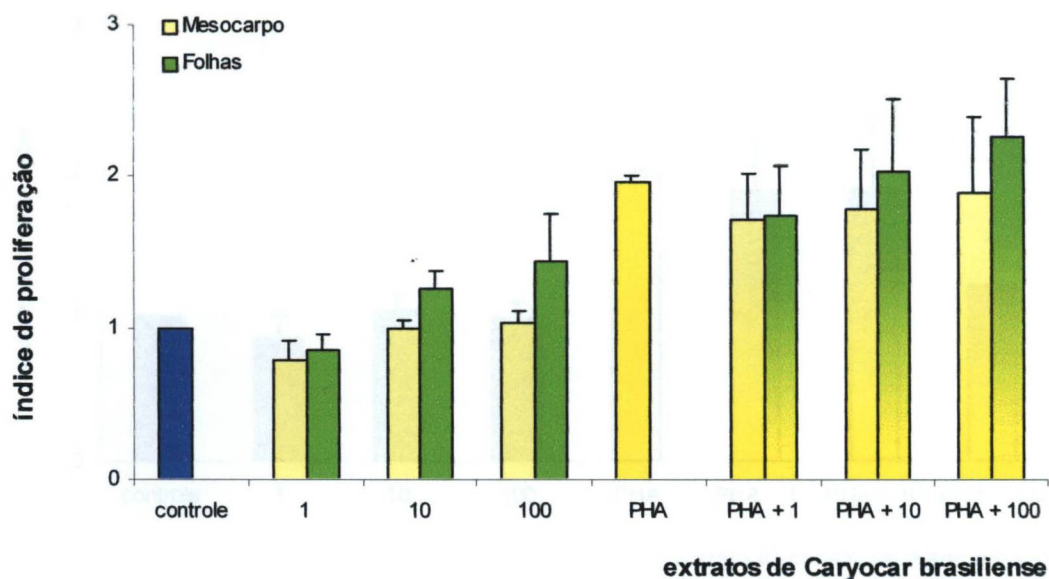


Figura 14. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Caryocar brasiliense* sobre a proliferação *in vitro* de mononucleares humanos. Suspensões de mononucleares humanos foram tratadas nas concentrações indicadas de extratos preparados de folhas de pequi e de mesocarpo interno de pequi e incubadas por 5 dias, a 37°C, em tensão de CO₂. Em alguns experimentos, meio contendo fitohemaglutinina (PHA), na concentração de 10%, foi adicionado. Cada coluna representa a média do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo extrato e o número obtido no controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos realizados em triplicata.

Da mesma forma como observado para os dois extratos anteriores, não se observou atividade proliferativa induzida pelo extrato de canela-de-veado (Figura 15).

Entretanto, para o extrato preparado de botões florais de camomila (Figura 16) observou-se estímulo significativo da proliferação espontânea de linfócitos, sendo este efeito proporcional à concentração de extrato utilizada.

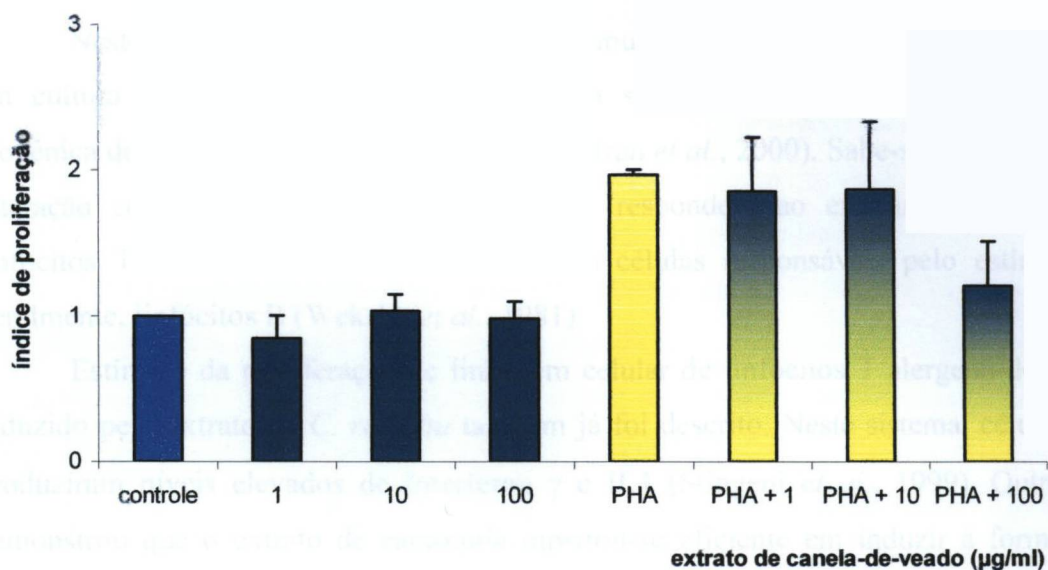


Figura 15. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Hybanthus bigibbosus* sobre a proliferação *in vitro* de mononucleares humanos. Suspensões de mononucleares humanos foram tratadas nas concentrações indicadas de extratos preparados de raízes de canela-de-veado e incubadas por 5 dias, a 37°C, em tensão de CO₂. Em alguns experimentos, meio contendo fitohemaglutinina (PHA), na concentração de 10%, foi adicionado. Cada coluna representa a média do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo extrato e o número obtido no controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos realizados em triplicata.

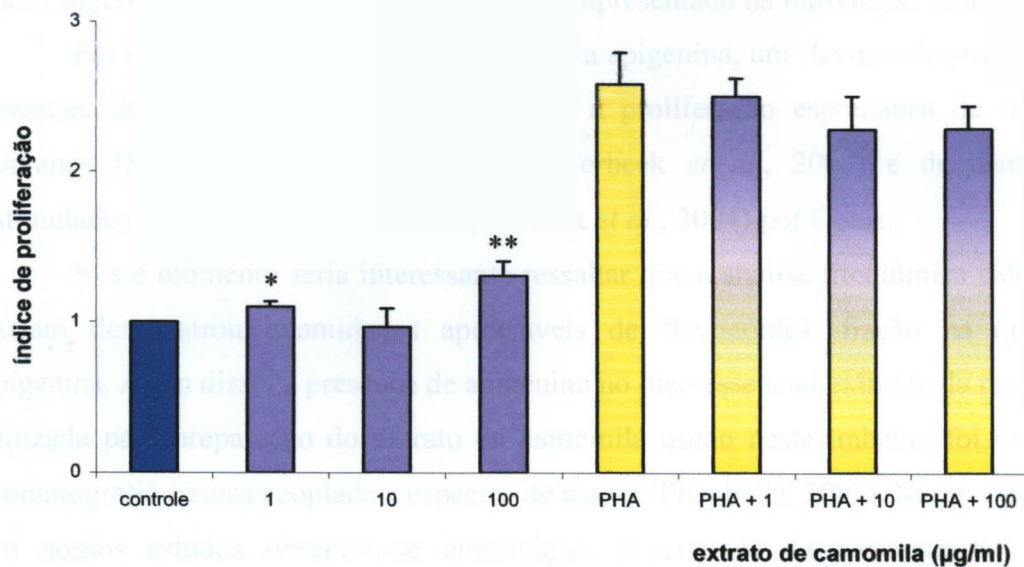


Figura 16. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Chamomilla recutita* sobre a proliferação *in vitro* de mononucleares humanos. Suspensões de mononucleares humanos foram tratadas nas concentrações indicadas de extrato preparado dos capítulos florais de camomila e incubadas por 5 dias, a 37°C, em tensão de CO₂. Em alguns experimentos, fitohemaglutinina (PHA), na concentração de 10%, foi adicionada como indicado. Cada coluna representa a média do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo extrato e o número obtido no controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Neste contexto surpreendente ação estimulante deste extrato quando incorporado em cultura mista de linfócitos humanos, um sistema *in vitro* que envolve ativação alogênica de células T, já foi descrita (Amirghofran *et al*, 2000) Sabe-se que neste tipo de interação celular a maioria das células que respondem ao estímulo constitui-se de linfócitos T (Weksler *et al*, 1978) e que as células responsáveis pelo estímulo são, geralmente linfócitos B (Weksler *et al*, 1981)

Estímulo da proliferação de linhagem celular de linfócitos T alérgeno-dependente induzido pelo extrato de *C. recutita* também já foi descrito Neste sistema, células CD4⁺ produziram níveis elevados de Interferon γ e IL4 (Stingem *et al*, 1999) Outro relato demonstrou que o extrato de camomila mostrou-se eficiente em induzir a formação de rosetas em pacientes imunodeficientes em otorrinolaringologia (Kliachko *et al*, 1994)

Wagner e colaboradores demonstraram que uma fração polissacarídica isolada de extrato aquoso em meio alcalino de *C. recutita* demonstrou atividade imunoestimulante (Wagner *et al*, 1985) Neste aspecto, é importante salientar que o grau de mitogenicidade de uma substância pode estar relacionado às diferenças na especificidade de açúcares envolvidos nos mecanismos de interação das moléculas biotivas com seus receptores, como sugerido por outros (Hsu e Ree, 1983) e apresentado na introdução desta dissertação

Por outro lado, já foi demonstrado que a apigenina, um flavonoide presente no óleo essencial de camomila, foi capaz de inibir a proliferação espontânea de linfócitos T humanos (Schwartz e Middleton, 1984, Verbeek *et al*, 2004) e de camundongos, estimulados (Lee *et al*, 1995) ou não (Verbeek *et al*, 2004) por ConA

Neste momento seria interessante ressaltar que a análise fitoquímica clássica desse extrato demonstrou quantidades apreciáveis de flavonoides, fração na qual está a apigenina Além disso, a presença de apigenina no óleo essencial extraído da matéria prima utilizada para preparação do extrato de camomila usado neste trabalho foi revelada por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (Presibella, 2003) Neste aspecto, como em nossos estudos observou-se diminuição, dependente da concentração, do efeito proliferativo induzido por PHA, poderia se sugerir também que a apigenina presente no extrato poderia estar competindo com a PHA pelos mesmos sítios de interação celular Enfim, os efeitos imunomodulatórios modestos observados podem estar relacionados à presença simultânea, no extrato de camomila, de substâncias estimulantes e inibidoras da proliferação de linfócitos, as quais agem de modo contrário quando interagem com os MNC Se esta hipótese é verdadeira, essas substâncias, agindo simultaneamente, contribuiriam não só para com a diversidade dos efeitos observados, como também

reduziriam (ou mascarariam) um efeito individual. Interessante seria, então, primeiro pesquisar-se a presença de carboidratos e substâncias de natureza protéica capazes de promover ativação/proliferação de linfócitos em ensaios *in vitro* convencionais. Segundo, proceder-se um fracionamento biomonitorado desse extrato, com a finalidade de se isolar os compostos presentes em cada fração responsáveis por essas atividades.

No estudo com os extratos preparados de cascas de agoniada (Figura 17) e de folhas de cipó-suma (Figura 18), observou-se queda significativa, proporcional à concentração, do número de células, perfil que se repetiu ao serem incubados na presença de PHA. Este declínio do número celular provavelmente está relacionado à citotoxicidade dos extratos, particularmente o de agoniada, uma vez que, quando se avaliou a viabilidade dos MNC frente a esses extratos, praticamente todas as células apresentaram-se mortas na concentração de 100µg/ml.

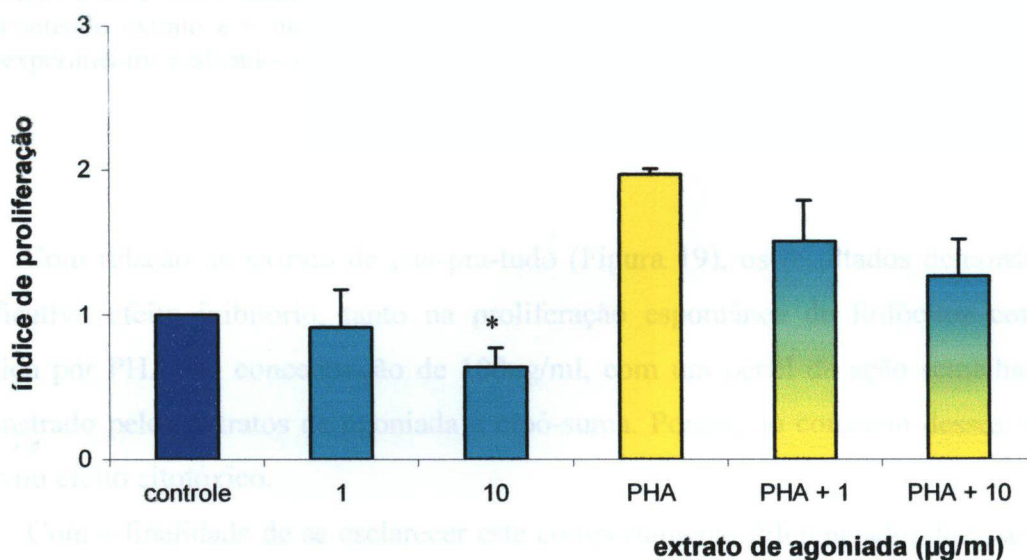


Figura 17. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Himatanthus lancifolius* sobre a proliferação *in vitro* de mononucleares humanos. Suspensões de mononucleares humanos foram tratadas nas concentrações indicadas de extrato preparado das cascas de agoniada e incubadas por 5 dias, a 37°C, em tensão de CO₂. Em alguns experimentos, fitohemaglutinina (PHA), na concentração de 10%, foi adicionada como indicado. Cada coluna representa a média do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo extrato e o número obtido no controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$.

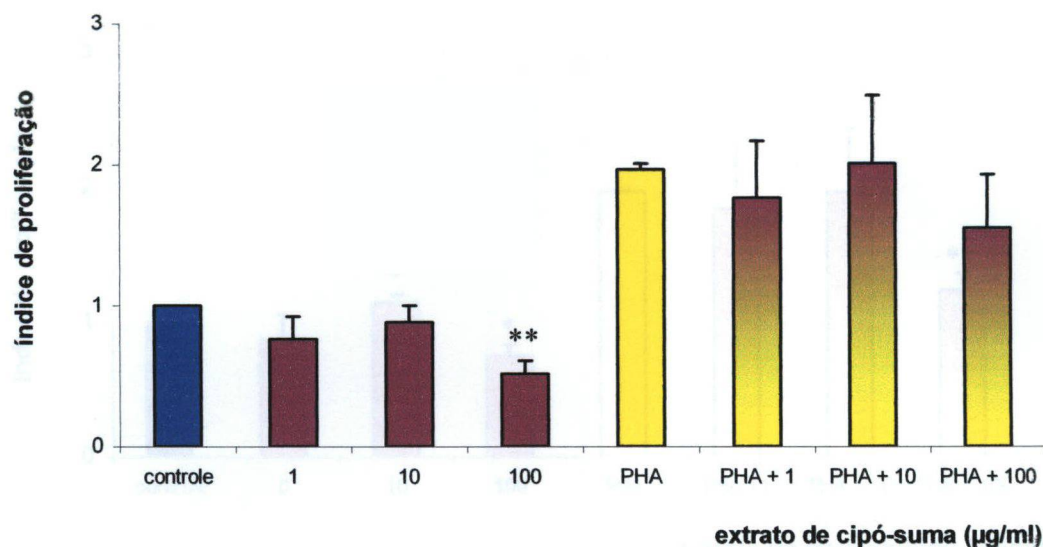


Figura 18. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Anchieta pyrifolia* sobre a proliferação *in vitro* de mononucleares humanos. Suspensões de mononucleares humanos foram tratadas nas concentrações indicadas de extrato preparado das cascas de cipó-suma e incubadas por 5 dias, a 37°C, em tensão de CO₂. Em alguns experimentos, fitohemaglutinina (PHA), na concentração de 10%, foi adicionada como indicado. Cada coluna representa a média do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo extrato e o número obtido no controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos realizados em triplicata. ** $p < 0,01$.

Com relação ao extrato de pau-pra-tudo (Figura 19), os resultados demonstraram significativo efeito inibitório, tanto na proliferação espontânea de linfócitos como na induzida por PHA, na concentração de 100µg/ml, com um perfil de ação semelhante ao demonstrado pelos extratos de agoniada e cipó-suma. Porém, ao contrário desses, não se observou efeito citotóxico.

Com a finalidade de se esclarecer este comportamento diferenciado, duas séries de experimentos foram realizadas. Na primeira série, incubou-se as células com PHA por 72 horas; em seguida, adicionou-se o extrato e incubou-se por mais dois dias. Na segunda série, incubou-se suspensão de MNC humanos com 100µg/ml do extrato por 24 horas e, após, adicionou-se meio contendo PHA, seguindo-se incubação por mais quatro dias. Os resultados desta série de experimentos estão ilustrados na Figura 20.

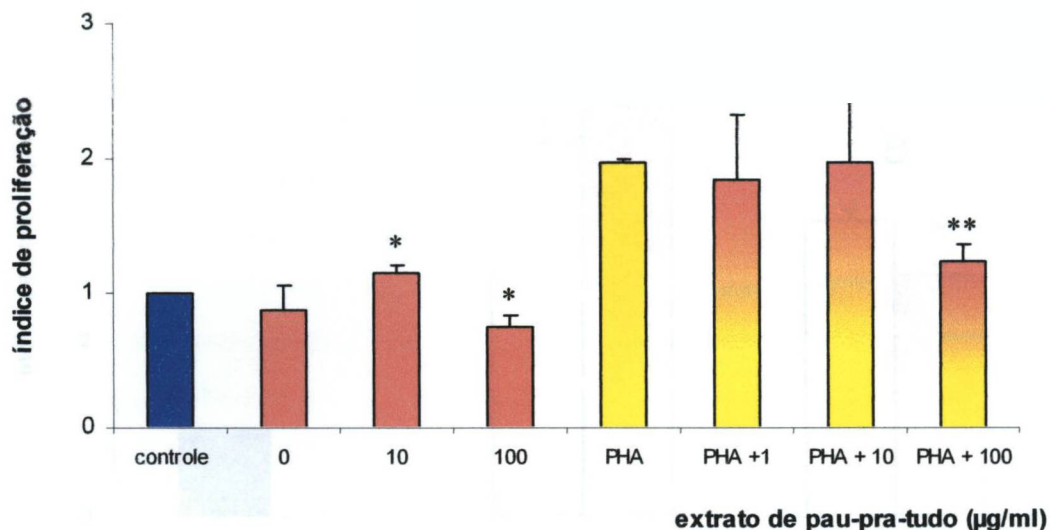


Figura 19. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Rauwolfia sellowii* sobre a proliferação *in vitro* de mononucleares humanos. Suspensões de mononucleares humanos foram tratadas nas concentrações indicadas de extrato preparado das cascas de pau-pra-tudo e incubadas por 5 dias, a 37°C, em tensão de CO₂. Em alguns experimentos, fitohemaglutinina (PHA), na concentração de 10%, foi adicionada como indicado. Cada coluna representa a média do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo extrato e o número obtido no controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

O índice de proliferação médio (IP) obtido para os MNC incubados previamente com extrato e depois acrescidos de PHA por mais quatro dias foi de $2,73 \pm 0,13$, significativamente menor em relação ao IP de $3,37 \pm 0,13$ obtido pelo grupo tratado somente com PHA durante o mesmo período de incubação ($n=3$; $p=0,02$). Em contraste, para a população previamente incubada com o mitógeno e posteriormente acrescida de extrato, o IP foi de $4,66 \pm 0,05$, sem diferença quando comparado ao IP de $4,26 \pm 0,24$ ($n=3$; $p=0,18$) obtido do grupo controle, ou seja, contendo somente PHA. Esses resultados sugerem que o extrato preparado das cascas de pau-pra-tudo tem a habilidade de inibir a proliferação de linfócitos por atuar nas etapas que envolvem a ativação celular.

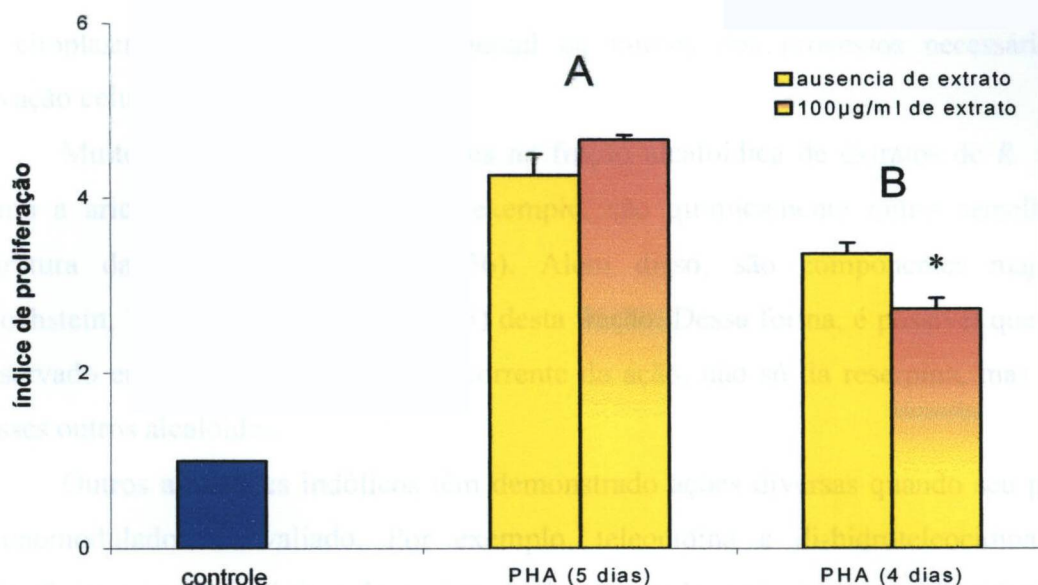


Figura 20. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Rauwolfia sellowii* sobre a proliferação *in vitro* de mononucleares humanos induzida por fitohemaglutinina. Suspensões de mononucleares humanos foram tratadas na concentração de 100µg/ml de extrato preparado das cascas de pau-pra-tudo e incubadas por 5 dias, a 37°C, em tensão de CO₂. Em (A), incubou-se as células com PHA por 72 horas; em seguida, adicionou-se o extrato e incubou-se por mais dois dias. Em (B), incubou-se suspensão de MNC humanos com 100ug/ml do extrato por 24 horas e, após, adicionou-se meio contendo PHA, seguindo-se incubação por mais quatro dias. Cada coluna representa a média do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo extrato e o número obtido no controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$.

Embora não haja estudos que relatem a presença de lectinas no gênero ou na espécie, muito já foi descrito sobre a composição fitoquímica da *R. sellowii*, sendo um alto teor de alcalóides indólicos sua principal característica (Hochstein, 1955; Pakrashi *et al.*, 1955; Belem-Pinheiro *et al.*, 1988; Batista *et al.*, 1996; Rech *et al.*, 1998). Entre tantos, destaca-se a presença da reserpina (Hochstein, 1955; Pakrashi *et al.*, 1955), alcalóide que tem reconhecida ação hipotensora (Mc *et al.*, 1954; Meier *et al.*, 1954; Baschieri *et al.*, 1955; Palmer, 1955; Sreemantula *et al.*, 2004; Okano *et al.*, 2005).

Além dessa atividade, estudos com a reserpina demonstraram seu efeito inibitório sobre a ativação (Mekori *et al.*, 1985) e proliferação de linfócitos T estimulados por PHA (Mekori *et al.*, 1989). Interessante é o relato de que a reserpina interfere com a produção de IL2 induzida por mitógeno, mas não com a expressão de receptores para IL2 (Mekori *et al.*, 1989). Este efeito é decorrente do fato de que este alcalóide bloqueia o acesso de Ca⁺⁺

ao citoplasma celular, etapa fundamental de muitos dos processos necessários para ativação celular (Mekori *et al* 1989)

Muitos dos compostos presentes na fração alcaloídica de extratos de *R. sellowii*, como a aricina e a ajmalicina, por exemplo, são quimicamente muito semelhantes à estrutura da reserpina (Pereira, 1956) Além disso, são componentes majoritários (Hochstein, 1955, Pakrashi *et al* , 1955) desta fração Dessa forma, é possível que o efeito observado em nossos estudos seja decorrente da ação, não só da reserpina, mas também desses outros alcalóides

Outros alcalóides indólicos têm demonstrado ações diversas quando seu potencial imunomodulador é avaliado Por exemplo teleocidina e di-hidroteleocidina B são mitogênicos para linfócitos humanos e de camundongos, enquanto lingbiatoxina A mostrou pouca atividade (Novogrodsky *et al* , 1984) Ibogaina e harmalina, em contraste, mostraram-se supressores de todas as funções imunomoduladoras avaliadas *in vitro* (proliferação de linfócitos B e T, produção de IL2, IL4 IL6 e TNF, citotoxicidade mediada por células NK, indução de atividade lítica por células T) a exceção da produção de IL6 e TNF por macrófagos (House *et al* , 1995) Recentemente, vários derivados sintéticos do grupo dos alcalóides indólicos da indoloquinolizina demonstraram atividade estimulante da proliferação de timócitos e macrófagos de camundongos *in vitro* (Solis-Maldonado *et al* , 2003)

A diversidade de ações desses compostos pode estar relacionada aos grupamentos químicos ligados a estrutura central desses alcalóides

Como já mencionado extratos são misturas complexas contendo componentes de natureza diversa (Schmid *et al* , 1999) Estes podem agir de forma sinérgica, aditiva, antagônica, ou mesmo, não exercer interferência alguma no efeito de uma sobre outra ou, ainda, não terem nenhum efeito sobre o sistema Portanto, dependendo das condições experimentais em que os ensaios são realizados, não é incomum observar efeitos contrários provenientes da ação de uma ou mais substâncias ativas no mesmo extrato

Assim, o efeito brando observado na maioria dos ensaios aqui demonstrados poderia estar relacionado a situações de interferência entre substâncias presentes no mesmo extrato, mascarando seu real potencial A realização de um fracionamento dos mesmos poderia conduzir ao isolamento e purificação de um ou mais compostos responsáveis pelas atividades biológicas demonstradas Interessante neste aspecto é o relato recente de Lin e colaboradores, em que o efeito imunoestimulante observado para o extrato aquoso preparado das folhas de *Amaranthus spinosus* foi cerca de trezentas vezes menor ao efeito

obtido após purificação da proteína responsável pela atividade imunoestimulatória obtida (Lin *et al*, 2005) Por outro lado, não se pode deixar de lado o fato de que um fracionamento pode, também, levar à perda do efeito por interferir com as propriedades físico-químicas do composto ativo ou mesmo alterar ou destruir sua estrutura

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial imunomodulador *in vitro* de alguns alcaloides e de extratos preparados de plantas medicinais usadas na medicina caseira para varios fins, tendo a citometria de fluxo como metodologia experimental

O conjunto de dados contidos nesta dissertação revelou alguns aspectos interessantes e desconhecidos com relação a atividade biologica investigada e, embora estudos mais aprofundados sejam necessarios, os resultados apresentados e as considerações que deles puderam ser derivadas permitem concluir que

- a citometria de fluxo e um metodo experimental que pode ser utilizado para se investigar a ação de substâncias puras ou complexas como extratos, por exemplo sobre a transformação blastica de linfocitos humanos obtidos de sangue periferico,
- a citometria de fluxo mostrou-se util, tambem, para estudos de proliferação dessa população,
- alcaloides indolicos exercem efeitos distintos sobre linfocitos humanos, os quais parecem estar relacionados com a sua estrutura quimica,
- extratos preparados de plantas medicinais agem de forma variada sobre a transformação e proliferação de linfocitos humanos, podendo ser estimulantes, inibidores ou mesmo se mostrarem desprovidos de ação,
- o extrato de camomila demonstrou ser estimulante da proliferação de linfocitos, corroborando com relatos anteriores,
- os extratos de ginseng brasileiro e de escada-de-macaco mostraram-se eficientes em promover a proliferação de linfocitos, ação esta pela primeira vez descrita,
- os extratos de agoniada e cipo-suma inibiram a proliferação de linfocitos humanos, provavelmente pela sua toxicidade,
- o extrato de pau-pra-tudo inibiu a proliferação de linfocitos humanos por atuar, provavelmente, sobre os mecanismos de estímulo celular

Alguns resultados apresentados nesta dissertação ainda não foram descritos e constituem uma base rica de dados científicos referentes as atividades farmacologicas de

plantas usadas na medicina tradicional que pode servir como fonte preliminar de informações para investigações futuras

REFERÊNCIAS

- Aabenhus, R , Hynes S O Permin H , Moran, A P e Andersen L P (2002) "Lectin typing of *Campylobacter concisus* " J Clin Microbiol **40**(2) 715-7
- Aggag, M E e Yousef R T (1972) "Study of antimicrobial activity of chamomile oil " Planta Med **22** 140-4
- Ahmed, F H El Badri, A A Ibrahim, M M K , El Shahed, A S e El Khalafawy, H M M (1994) "Comparative studies of antifungal potentialities for some natural plant oils against different fungi isolated from poultry " Grasas y Aceites **45** 260-4
- Akendengue, B , Ngou-Milama, E Laurens A e Hocquemiller R (1999) "Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products " Parasite **6**(1) 3-8
- Alberts, B , Bray, D , Lewis, J Raff, M Roberts, K e Watson J D (1994) Molecular biology of the cell New York, Garland Publishing Inc 1294
- Alcantara O , Phillips, J L e Boldt, D H (1986) "Phorbol diesters and transferrin modulate lymphoblastoid cell transferrin receptor expression by two different mechanisms " J Cell Physiol **129**(3) 329-35
- Amirghofran, Z , Azadbakht, M e Karimi, M H (2000) "Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants " J Ethnopharmacol **72**(1-2) 167-72
- Ammon, H P , Sabieraj, J e Kaul, R (1996) "Chamomile mechanisms of anti-inflammatory activity of chamomile extracts and components " Deutsche Apotheker Zeitung **136** 17-8
- Anderson C M , Walters, R S e Hortobagyi, G N (1996) "Mediastinitis related to probable central vinblastine extravasation in a woman undergoing adjuvant chemotherapy for early breast cancer " Am J Clin Oncol **19**(6) 566-8
- Arora, J S , Sandhu, R S , Kamboj, S S e Chopra, S K (1987) "Occurrence and characterization of lympho-agglutinins in Indian plants " Vox Sang **52**(1-2) 134-7
- Ashraf, M T e Khan, R H (2003) "Mitogenic lectins " Med Sci Monit **9**(11) RA265-9
- Ashwell, G e Harford, J (1982) "Carbohydrate-specific receptors of the liver " Annu Rev Biochem **51** 531-54
- Assenmacher, M , Manz, R , Miltenyi, S , Scheffold, A e Radbruch, A (1995) "Fluorescence-activated cytometry cell sorting based on immunological recognition " Clin Biochem **28**(1) 39-40

- Avallone R, Zanolì P, Corsì L, Cannazza G e Baraldì, M (1996) "Benzodiazepine-like compounds and GABA in flower head of *Matricaria chamomilla* " Phytoth Res **10** S177-S9
- Avallone, R, Zanolì P, Puia G, Kleinschnitz M, Schreier P e Baraldì M (2000) "Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla* " Biochem Pharmacol **59**(11) 1387-94
- Balakrishnan S, Payawal J, Schuler, M J, Hasegawa-L e Eastmond D A (2002) "Enhancing the in vitro and in vivo detection of aneuploidy by fluorescence in situ hybridization with the use of bromodeoxyuridine as a proliferation marker " Mutat Res **521**(1-2) 81-9
- Bany, J, Siwicki, A K, Zdanowska, D, Sokolnicka, I, Skopinska-Rozewska, E e Kowalczyk, M (2003) "Echinacea purpurea stimulates cellular immunity and anti-bacterial defence independently of the strain of mice " Pol J Vet Sci **6**(3 Suppl) 3-5
- Barrett B (2003) "Medicinal properties of Echinacea: a critical review " Phytomed **10**(1) 66-86
- Baschieri, L, Lotti, P e Vassalle, M (1955) "[Hypotensive effect of reserpine: clinical and hemodynamic research] " Progr Med (Napoli) **11**(9) 260-9
- Batista C V F, Schripsema, J, Verpoorte, R, Rech, S B e Henriques, A T (1996) "Indole alkaloids from *Rauwolfia sellowii* " Phytochem **41**(3) 969-73
- Belem-Pinheiro M L, Imbiriba da Rocha, A F, Quetin-Leclercq, J, Wauters, J N e Angenot, L (1988) "Alkaloids of *Rauwolfia sellowii* from Amazonia " J Pharm Belg **43**(5) 379-81
- Bell, A (1998) "Microtubule inhibitors as potential antimalarial agents " Parasitology Today **14** 234-40
- Belmont, J W, Rich, R R e Rich S S (1979) "Physiology of mixed leukocyte reaction suppressor factor I: Role of cytoskeleton and protein synthesis in production and secretion " J Immunol **122**(3) 1022-8
- Berry, M (1995) "Herbal Products Part 6 Chamomiles " Pharmac J **254** 191-3
- Bettens, F, Kristensen, F, Walker C e de Weck, A L (1982) "Human lymphocyte proliferation II: Formation of activated (G1) cells " Eur J Immunol **12**(11) 948-52
- Bezerra, J C, Silva, I A, Ferreira, H D, Ferri, P H e Santos, S C (2002) "Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants " Fitoterapia **73**(5) 428-30
- Biberfeld, P (1971a) "Endocytosis and lysosome formation in blood lymphocytes transformed by phytohemagglutinin " J Ultrastruct Res **37**(1) 41-68

- Biberfeld P (1971b) "Morphogenesis in blood lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin (PHA) A light and electron microscopic study " Acta Pathol Microbiol Scand [A] **223** Suppl 223 1-70
- Bier, O (1977) Bacteriologia e Imunologia São Paulo Melhoramentos 1056
- Bies, C Lehr, C M e Woodley, J F (2004) "Lectin-mediated drug targeting history and applications " Adv Drug Deliv Rev **56**(4) 425-35
- Birt, D F , Mitchell, D , Gold, B Pour, P e Pinch, H C (1997) "Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin a plant flavonoid " Anticancer Res **17**(1A) 85-91
- Blatt S L Fock R , Favero, M E Souza A C , Tsujita, M , Vinolo M , Silva, M C F e Borelli, P (2003) Avaliação do perfil imunofenotípico e da apoptose da medula óssea em desnutrição proteica XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FESBE n 14052, Curitiba/PR
- Block K I e Mead, M N (2003) "Immune system effects of echinacea ginseng, and astragalus a review " Integr Cancer Ther **2**(3) 247-67
- Bogdanov A A , Jr Gordeeva L V , Torchilin, V P e Margolis L B (1989) "Lectin-bearing liposomes differential binding to normal and to transformed mouse fibroblasts " Exp Cell Res **181**(2) 362-74
- Bohlool, B B e Schmidt, E L (1976) "immunofluorescent polar tips of *Rhizobium japonicum* possible site of attachment or lectin binding " J Bacteriol **125**(3) 1188-94
- Boldt, D H e Zimmer, S G (1983) "Analysis of lectin receptors on rat embryo fibroblasts transformed by adenovirus 2 " J Natl Cancer Inst **70**(5) 943-8
- Borchers A T , Keen, C L , Stern J S e Gershwin, M E (2000) "Inflammation and ative American medicine the role of botanicals " Am J Clin Nutr **72**(2) 339-47
- Boyd, W C e Shapleigh, E (1954a) "Diagnosis by subgroups of blood groups A and AB by use of plant agglutinins (lectins) " J Lab Clin Med **44**(2) 235-7
- Boyd, W C e Shapleigh, E (1954b) "Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin) " Blood **9**(12) 1194-8
- Bradlev. R P (1992) British Herbal Compendium Bournemouth, British Herbal Medicine Association 239
- Brostoff, J e Male D K (1994) Clinical immunology - an illustrated out/ine London. Mosby 132
- Broyn (1975) "Kinetics of cell proliferation and cell loss in the-peripheral and central parts of Walker tumours growing in rats and nude mice " Virchows Arch B Cell Pathol **18**(3) 181-91

- Brunner K T Mauel J , Cerottini J C e Chapuis B (1968) "Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro, inhibition by isoantibody and by drugs " Immunol **14**(2) 181-96
- Bukovsky M Vaverkova S Kostalova D e Magnusova, R (1993) "Immunomodulating activity of ethanol-water extracts of the roots of *Echinacea gloriosa* L *Echinacea angustifolia* DC and *Rudbeckia speciosa* Wenderoth tested on the immune system in C57BL6 inbred mice " Cesk Farm **42**(4) 184-7
- Burgermeister, E Endl J e Scheuer, W V (2003) "Activation of cytosolic phospholipase A2 in human T-lymphocytes involves inhibitor-kappaB and mitogen-activated protein kinases " Eur J Pharmacol **466**(1-2) 169-80
- Buss A D e Waigh, R D (1995) Natural compounds as leads for new pharmaceuticals Burger's medical chemistry and drug discovery Wolff, M E Oxford, John Wiley & Sons Inc . 983-1033
- Bychkov V e Toto, P D (1986) "Lectin binding to normal, dysplastic and neoplastic cervical epithelium " Am J Clin Pathol **85**(5) 542-7
- Caldero J , Campo E , Vinas, J e Cardesa. A (1989) "Lectin-binding sites in neoplastic and non-neoplastic colonic mucosa of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats " Lab Invest **61**(6) 670-6
- Cantrell, D A e Smith, K A (1984) "The interleukin-2 T-cell system a new cell growth model " Science **224**(4655) 1312-6
- Cardoso L (2001) Leishmaniose cutânea influência da casca e folha do *Caryocar brasiliense* Cambess no curso da infecção Departamento de Biologia Geral Montes Claros Universidade Estadual de Montes Claros: 53
- Carlson R W Dorfman, R F e Sikic, B I (1990) "Successful treatment of metastatic thymic carcinoma with cisplatin, vinblastine, bleomycin, and etoposide chemotherapy " Cancer **66**(10) 2092-4
- Cava. M P , Talapatra, S K , Weisbach, J A , Douglas, B , Raffauf R F e Beal, J L (1965) "Gabunine a natural dimeric indole derived from perivine " Tetrahedron Lett **14** 931-5
- Chabner, B A , Allegra, C J , Curt, G A e Calabresi, P (1996) Antineoplastic agents Goodman & Gilman's - the pharmacological basis of therapeutics JG , H e Limbird, L E New york, McGraw-Hill: 1905
- Chatterjee, B P Guha, A K , Pal, R e Bhattacharyya, M (1989) "Lectin typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains of different serogroups, Habs and Fisher types " Zentralbl Bakteriol **271**(3) 364-71
- Chaumontet. C Droumaguet, C , Bex, V , Heberden, C , Gaillard-Sanchez, I e Martel, P (1997) "Flavonoids (apigenin, tangeretin) counteract tumor promoter-induced inhibition of intercellular communication of rat liver epithelial cells " Cancer Lett **114**(1-2) 207-10

- Chavali S R Francis T e Campbell J B (1987) "An in vitro study of immunomodulatory effects of some saponins " Int J Immunopharmacol 9(6) 675-83
- Chong, S K , Brown H A , Oberholzer, V e Walker-Smith J A (1982) "Effect of ginseng saponins and hydrocortisone on phytohemagglutinin transformation of lymphocytes " Lancet 2(8299) 663-4
- Chong, S K Brown H A , Rimmer, E , Oberholzer V , Hindocha P e Walker-Smith, J A (1984) "In vitro effect of Panax ginseng on phytohaemagglutinin-induced lymphocyte transformation " Int Arch Allergy Appl Immunol 73(3) 216-20
- Civin. C I e Loken M R (1987) "Cell surface antigens on human marrow cells dissection of hematopoietic development using monoclonal antibodies and multiparameter flow cytometry " Int J Cell Cloning 5(4) 267-88
- Ckless K , Schlottfeldt, J L , Pasqual, M , Moyna, P Henriques J A e Wajner, M (1995) "Inhibition of in-vitro lymphocyte transformation by the isoquinoline alkaloid berberine " J Pharm Pharmacol 47(12A) 1029-31
- Coeugnet, E G e Elek, E (1987) "Immunomodulation with *Viscum album* and *Echinacea purpurea* extracts " Onkologie 10(3 Suppl) 27-33
- Colombo, M P , Parenza, M e Parmiani, G (1985) "Adoptive immunotherapy of a BALB/c lymphoma by syngeneic anti-DBA/2 immune lymphoid cells characterization of the effector population and evidence for the role of the host's non-T cells " Cancer Immunol Immunother 20(3) 198-204
- Cooper, H L (1972) "Studies on RNA metabolism during lymphocyte activation " Transplant Rev 11 3-38
- Corrêa, P (1984) Dicionario das plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas Rio de Janeiro, Imprensa Nacional 262
- Cotran, R S , Kumar, V e Robbins, S L (1994) Robbins - Pathologic basis of disease Philadelphia, W B Saunders Co 1400
- Cundell, D R Matrone, M A , Ratajczak, P e Pierce, J D , Jr (2003) "The effect of aerial parts of *Echinacea* on the circulating white cell levels and selected immune functions of the aging male Sprague-Dawley rat " Int Immunopharmacol 3(7) 1041-8
- Currier, N L e Miller, S C (2000) "Natural killer cells from aging mice treated with extracts from *Echinacea purpurea* are quantitatively and functionally rejuvenated " Exp Gerontol 35(5) 627-39
- Currier, N L e Miller, S C (2001) "Echinacea purpurea and melatonin augment natural-killer cells in leukemic mice and prolong life span " J Altern Complement Med 7(3) 241-51
- Dacie, J e Lewis, S M (1995) Laboratory methods used in the investigation of the haemolytic anaemias Practical haematology London, Churchill Livingstone: 210-1

- Dao M A Hannum C H Kohn D B e Nolta J A (1997) "FLT3 ligand preserves the ability of human CD34+ progenitors to sustain long-term hematopoiesis in immune-deficient mice after ex vivo retroviral-mediated transduction" Blood **89**(2) 446-56
- de Paula W (2004) Atividades biológicas in vitro de extratos hidroetanólicos de folhas e mesocarpo interno de *Caryocar brasiliense* Cambess Departamento de Patologia Médica Curitiba, Universidade Federal do Paraná: 81
- de-Paris F , Neves, G Salgueiro, J B , Quevedo, J , Izquierdo I e Rates, S M (2000) "Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng (Amaranthaceae) in rodents " J Ethnopharmacol **73**(1-2) 261-9
- Dockrell. T R e Leever J S (2000) "An overview of herbal medications with implications for the school nurse " J Sch Nurs **16**(3) 53-8
- Douglas, S D (1972) "Electron microscopic and functional aspects of human lymphocyte response to mitogens " Transplant Rev **11** 39-59
- Dupuis, G , Martel J , Bastin, B Dion, J e Payet, M D (1993) "Microtubules are not an essential component of phytohemagglutinin-dependent signal transduction in Jurkat T lymphocytes " Cell Immunol **146**(1) 38-51
- Eisenthal A Marder, O Lifschitz-Mercer, B , Skornick, Y Tirosh, R , Weinreb, A e Deutsch, M (1996) "Inhibition of mitogen-induced changes in intracellular fluorescein fluorescence polarization of human peripheral blood lymphocytes by colchicine vinblastine and cytochalasin B " Cell Struct Funct **21**(3) 159-66
- Eldin, S e Dunford, A (2001) Fitoterapia na atenção primária a saúde São Paulo, Manole 163
- Elsasser-Beile, U Willenbacher, W , Bartsch, H H , Gallati, H , Schulte Monting, J e von Kleist, S (1996) "Cytokine production in leukocyte cultures during therapy with *Echinacea* extract " J Clin Lab Anal **10**(6) 441-5
- Farmacopeia, C P d R d (1996) Farmacopeia Brasileira São Paulo, Atheneu: nv il
- Farnsworth N R Loub, W D e Blomster R N (1963) "Studies on *Catharanthus lanceus* (Vinca lancea)—I Isolation of Leurosine, Perivine and Yohimbine " J Pharm Sci **52** 1114
- Feske, S , Draeger, R , Peter, H H , Eichmann, K e Rao, A (2000) "The duration of nuclear residence of NFAT determines the pattern of cytokine expression in human SCID T cells " J Immunol **165**(1) 297-305
- Fiserova, A , Trinchieri, G , Chan, S , Bezouska, K , Fieger, M e Pospišil, M (1995) "Ergot alkaloid-induced cell proliferation, cytotoxicity and lymphokine production " Adv Exp Med Biol **371A** 163-6
- Flower. R L , Wilcox, G E , Chugg, V e Neal, J R (1984) "Lectins from indigenous Australian wildflowers--detection of lectins from *Bauhinia carronii*, *Hardenbergia*

- comptomiana. Ptilotis obovatus and Rhadogia crassifolia " Aust J Exp Biol Med Sci **62 (Pt 6)** 763-9
- Forster H B , Niklas H e Lutz, S (1980) "Antispasmodic effects of some medicinal plants " Planta Med **40** 309-19
- Freed D L (1985) "Lectins " Br Med J (Clin Res Ed) **290(6468)** 584-6
- Freshney, R I (2000) Culture of animal cells - a manual of basic technique New York Wiley-Liss 577
- Gabius, H J e Gabius S , Eds (1993) Lectins and glycobiology Berlin, Springer-Verlag
- Gabor F , Bogner, E Weissenboeck, A e Wirth, M (2004) "The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery " Adv Drug Deliv Rev **56(4)** 459-80
- Gadjeva, M , Takahashi K e Thiel, S (2004) "Mannan-binding lectin--a soluble pattern recognition molecule " Mol Immunol **41(2-3)** 113-21
- Gaidi G , Miyamoto T , Laurens, V e Lacaille-Dubois M A (2002) "New acylated triterpene saponins from *Silene fortunei* that modulate lymphocyte proliferation " J Nat Prod **65(11)** 1568-72
- Ganes H , Andersson, L e Biberfeld G (1996) "A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry " J Immunol Methods **195(1-2)** 63-72
- Gan, X H , Zhang, L , Heber, D e Bonavida, B (2003) "Mechanism of activation of human peripheral blood NK cells at the single cell level by Echinacea water soluble extracts recruitment of lymphocyte-target conjugates and killer cells and activation of programming for lysis " Int Immunopharmacol **3(6)** 811-24
- Gerritsen M E , Carley, W W Ranges, G E , Shen, C P , Phan S A , Ligon, G F e Perry, C A (1995) "Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression " Am J Pathol **147(2)** 278-92
- Gery, I , Gershon, R K e Waksman B H (1972) "Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens I The responding cell " J Exp Med **136(1)** 128-42
- Gery, I e Waksman, B H (1972) "Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens II The cellular source of potentiating mediator(s) " J Exp Med **136(1)** 143-55
- Gillis, S , Ferm, M M , Ou, W e Smith, K A (1978) "T cell growth factor parameters of production and a quantitative microassay for activity " J Immunol **120(6)** 2027-32
- Gillis, S e Watson J (1980) "Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules V Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line " J Exp Med **152(6)** 1709-19

- Glowania, H J Rauln C e Swoboda M (1987) "Effect of chamomile on wound healing - a clinical double-blind study " Z Hautkr **62** 1262,7-71
- Goel, V , Chang, C , Slama, J , Barton R , Bauer, R Gahler R e Basu, T (2002a) "Echinacea stimulates macrophage function in the lung and spleen of normal rats " J Nutr Biochem **13(8)** 487
- Goel, V , Chang, C , Slama, J V , Barton R Bauer, R Gahler R e Basu, T K (2002b) "Alkylamides of Echinacea purpurea stimulate alveolar macrophage function in normal rats " Int Immunopharmacol **2(2-3)** 381-7
- Goldstein I J e Hayes, C E (1978) "The lectins carbohydrate-binding proteins of plants and animals " Adv Carbohydr Chem Biochem **35** 127-340
- Gorczyca, W , Bruno S , Melamed M R e Darzynkiewicz Z (1992) "Cell cycle-related expression of p120 nucleolar antigen in normal human lymphocytes and in cells of HL-60 and MOLT-4 leukemic lines effects of methotrexate camptothecin, and teniposide " Cancer Res **52(12)** 3491-4
- Gorman M Neuss N , Svoboda, G H , Barnes, A J , Jr e Cone N J (1959) "A note on the alkaloids of Vinca rosea Linn (Catharanthus roseus G Don) II Catharanthine, lochnericine vindolinine and vindoline " J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim) **48(4)** 256-7
- Gorse G J e Kopp, W C (1987) "Modulation by immunosuppressive agents of peripheral blood mononuclear cell responses to influenza A virus " J Lab Clin Med **110(5)** 592-601
- Grabley, S e Thiericke, R (1999) "Bioactive agents from natural sources trends in discovery and application " Adv Biochem Eng Biotechnol **64** 101-54
- Granja e Barros, M A (1982) "Flora medicinal do Distrito Federal " Brasil Florestal **12(50)** 35-45
- Greaves M e Janossy, G (1972) "Elicitation of selective T and B lymphocyte responses by cell surface binding ligands " Transplant Rev **11** 87-130
- Greaves, M F , Bauminger, S e Janossy, G (1972) "Lymphocyte activation 3 Binding sites for phytomitogens on lymphocyte subpopulations " Clin Exp Immunol **10(3)** 537-54
- Guerra, R N , Pereira, H A , Silveira, L M e Olea, R S (2003) "Immunomodulatory properties of Alternanthera tenella Colla aqueous extracts in mice " Braz J Med Biol Res **36(9)** 1215-9
- Haar, J L , Raynor, R H , Russell, E C , Bhatnagar, A S e Mohanakumar, T (1985) "Ultrastructural analysis of spleen lymphoblastic cells peanut lectin binding correlates with degree of differentiation of the leukemic cells " Exp Hematol **13(3)** 169-73

- Hamada K, Koreeda, A, Ohtsu Y, Yonemitsu K e Tsunenari S (2002) "A simple dot enzyme-linked immunosorbent assay for ABO blood typing of biological fluid and stains effects of heating samples " Leg Med (Tokyo) 4(4) 217-22
- Hamel, E (1996) "Antimitotic natural products and their interactions with tubulin " Med Res Rev 16(2) 207-31
- Hase, K, Basnet, P, Kadota, S e Namba, T (1997) "Immunostimulating activity of Celosian, an antihepatotoxic polysaccharide isolated from *Celosia argentea* " Planta Med 63(3) 216-9
- Hawrylko, E (1975) "BCG immunopotential of an antitumor response evidence for a cell-mediated mechanism " J Natl Cancer Inst 55(2) 413-23
- Hirano T, Oka, K, Kawashima E e Akiba M (1989) "Effects of synthetic and naturally occurring flavonoids on mitogen-induced proliferation of human peripheral-blood lymphocytes " Life Sci 45(15) 1407-11
- Hirazumi A, Furusawa E, Chou, S C e Hokama Y (1996) "Immunomodulation contributes to the anticancer activity of morinda citrifolia (noni) fruit juice " Proc West Pharmacol Soc 39 7-9
- Hishinuma A, Imai, Y, Nakano, T e Osawa T (1983) "The reactivities of Bauhinia purpurea and Lens culinaris lectins to mouse B Lymphocytes and their subsets " Int Arch Allergy Appl Immunol 72(4) 330-5
- Ho L J, Juan T Y, Chao P, Wu, W L, Chang, D M, Chang, S Y e Lai, J H (2004) "Plant alkaloid tetrandrine downregulates IkappaBalpha kinases-IkappaBalpha-NF-kappaB signaling pathway in human peripheral blood T cell " Br J Pharmacol 143(7) 919-27
- Hochstem F A (1955) "Alkaloids of Rauwolfia sellowii " J Am Chem Soc 77(21) 5744-5
- Homolka, J, Ziegenhagen, M W, Gaede K I, Entzian P, Zissel, G e Muller-Quernheim, J (2003) "Systemic immune cell activation in a subgroup of patients with idiopathic pulmonary fibrosis " Respiration 70(3) 262-9
- House, R V, Thomas, P T e Bhargava, H N (1995) "Comparison of the hallucinogenic indole alkaloids ibogaine and harmaline for potential immunomodulatory activity " Pharmacol 51(1) 56-65
- Hsu, S M e Ree, H J (1983) "Histochemical studies on lectin binding in reactive lymphoid tissues " J Histochem Cytochem 31(4) 538-46
- Hwang, S A, Dasgupta, A e Actor, J K (2004) "Cytokine production by non-adherent mouse splenocyte cultures to Echinacea extracts " J Ethnopharmacol 97(1-2) 161-6
- Hynes, S O, Hirno, S, Wadstrom, T e Moran, A P (1999) "Differentiation of Helicobacter pylori isolates based on lectin binding of cell extracts in an agglutination assay " J Clin Microbiol 37(6) 1994-8

- Imai Y e Osawa T (1983) "Enrichment of IL-2-producer T cells from mouse spleen by use of Bauhinia purpurea lectin " Scand J Immunol **18**(3) 217-24
- Imamura, Y , Sugihara, H , Miyake, T , Ikeda, T Noriki, S , Miyoshi N Nakanishi, K e Fukuda, M (1989) "Lectin histochemistry in rat thyroid tumours " Basic Appl Histochem **33**(3) 185-96
- Inaba M e Nagashima, K (1986) "Non-antitumor vinca alkaloids reverse multidrug resistance in P388 leukemia cells in vitro " Jpn J Cancer Res **77**(2) 197-204
- Isaac O (1979) "Pharmacological investigations with compounds of chamomile on the pharmacology of (-)-alpha-bisabolol and bisabolol oxides (review) " Planta Med **35**(2) 118-24
- Itoh K , Hayakawa, K Salmeron, M A , Legha, S S , Murray J L Talpaz, M , Balch, C M , Parkinson, D R Lee K , Zukowski, A A e et al (1991) "Alteration in interactions between tumor-infiltrating lymphocytes and tumor cells in human melanomas after chemotherapy or immunotherapy " Cancer Immunol Immunother **33**(4) 238-46
- Ivanovska, N , Philipov, S e Georgieva, P (1997) "Immunopharmacological activity of aporphinoid alkaloid oxoglucine " Pharmacol Res **35**(4) 267-72
- Jack D L e Turner, M W (2003) "Anti-microbial activities of mannose-binding lectin " Biochem Soc Trans **31**(Pt 4) 753-7
- Jakovlev, V , Isaac, O e Flaskamp, E (1983) "Pharmacologic studies on chamomile compounds VI Studies on the antiphlogistic effect of chamazulene and matricine " Planta Med **49**(2) 67-73
- Jakovlev, V , Isaac, O , Thiemer, K e Kunde, R (1979) "Pharmacological investigations with compounds of chamomile II New investigations on the antiphlogistic effects of (-)-alpha-bisabolol and bisabolol oxides " Planta Med **35**(2) 125-40
- Janeway, C A (2002) Imunologia o sistema imunologico na saude e na doenca Porto Alegre, ArTmed 767
- Janossy, G e Greaves, M F (1971) "Lymphocyte activation I Response of T and B lymphocytes to phytomitogens " Clin Exp Immunol **9**(4) 483-98
- Janossy, G e Greaves, M F (1972) "Lymphocyte activation II discriminating stimulation of lymphocyte subpopulations by phytomitogens and heterologous antilymphocyte sera " Clin Exp Immunol **10**(3) 525-36
- Janzen, D H, Juster, H B e Liener, I E (1976) "Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle " Science **192**(4241) 795-6
- Jarlov, J O , Hansen J E , Rosdahl, V T e Espersen, F (1992) "The typing of Staphylococcus epidermidis by a lectin-binding assay " J Med Microbiol **37**(3) 195-200

- Jarlov J O Rosdahl V T Yeo M e Marples R R (1993) "Lectin typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from Singapore, England and Wales, and Denmark " J Med Microbiol **39**(4) 305-9
- Jie Y H , Cammisuli, S e Baggiolini, M (1984) "Immunomodulatory effects of Panax Ginseng C A Meyer in the mouse " Agents Actions **15**(3-4) 386-91
- Jordan, M A e Wilson, L (2004) "Microtubules as a target for anticancer drugs " Nat Rev Cancer **4**(4) 253-65
- Judd, W J (1980) "The role of lectins in blood group serology " Crit Rev Clin Lab Sci **12**(3) 171-214
- Judd, W J , Murphy, L A , Goldstein, I J , Campbell, L e Nichols M E (1978) "An anti-B reagent prepared from the alpha-D-galactopyranosyl-binding isolectins from *Bandeiraea simplicifolia* seeds " Transfusion **18**(3) 274-80
- Jurkstiene, V , Kondrotas A J e Kevelaitis, E (2004) "Compensatory reactions of immune system and action of Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* (L) Moench) preparations " Medicina (Kaunas) **40**(7) 657-62
- Kedzia, B (1991) "Antimicroorganisms activity of oil Chamomillae and its components " Herba Polonica **37** 29-38
- Khan, F Khan, R H , Sherwani, A , Mohmood, S e Azfer, M A (2002) "Lectins as markers for blood grouping " Med Sci Monit **8**(12) RA293-300
- Kilpatrick, D C (1999) "Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis " Mol Biotechnol **11**(1) 55-65
- Kim, J Y , Germolec D R e Luster, M I (1990) "Panax ginseng as a potential immunomodulator studies in mice " Immunopharmacol Immunotoxicol **12**(2) 257-76
- Kirsch-Volders, M e Parry, E M (1996) "Genetic toxicology of mitotic spindle inhibitors used as anticancer drugs " Mutat Res **355**(1-2) 103-28
- Kliacnko, L L , Ankhimova, E S , Svitina, N N e Iaremenko, K V (1994) "The effect of medicinal herbs on lymphocyte rosette-forming function " Vestn Otorinolaringol(2) 31-3
- Koch, M O e Coussens, D (1993) "Impact of methotrexate, vinblastine, adriamycin, and cisplatin chemotherapy in patients with lymph node metastases from transitional cell carcinoma of the lower urinary tract " Semin Urol **11**(1) 14-9
- Korting, H C e Abeck, D (1992) "The lectin type of *Candida albicans*--an epidemiologic marker relevant to pathogenesis " Mycoses **35**(3-4) 89-94
- Korting, H C , Abeck, D , Johnson, A P , Ballard, R C , Taylor-Robinson, D e Braun-Falco, O (1988) "Lectin typing of *Haemophilus ducreyi* " Eur J Clin Microbiol Infect Dis **7**(5) 678-80

- Kristensen B, Kristensen F Vandeveld M Higgins, R J e de Weck, A L (1982a) "Canine lymphocyte cultures in vitro evaluation of peripheral blood lymphocyte response to mitogens " Vet Immunol Immunopathol 3(4) 439-48
- Kristensen. F Walker C Joncourt F, Bettens F e de Weck A L (1982b) "Human lymphocyte proliferation I Correlation between activated and proliferating T-lymphocytes " Immunol Lett 5(2) 59-63
- Kristensen F, Walker C Muller J e de Weck A L (1982c) "Evaluation of murine thymocyte stimulation using a defined culture medium " Immunobiol 161(5) 429-41
- Kubbies M Schindler D Hoehn, H e Rabinovitch, P S (1985) "Cell cycle kinetics by BrdU-Hoechst flow cytometry an alternative to the differential metaphase labelling technique " Cell Tissue Kinet 18(5) 551-62
- Kuempel T A Thiele J Blaeser, A H Wickenhauser C Baldus, S E e Fischer R (1997) "Lectin binding sites on CD34+ human haematopoietic stem cells and lymphocytes from peripheral blood an ultrastructural post-embedding study " Histochem J 29(9) 695-705
- Lai J H Ho, L J Kwan C Y, Chang, D M e Lee T C (1999) "Plant alkaloid tetrandrine and its analog block CD28-costimulated activities of human peripheral blood T cells potential immunosuppressants in transplantation immunology " Transplantation 68(9) 1383-92
- Lascuran, R Porras, F, Baez, R, Chavez, R, Martinez-Cairo, S Alvarez, G e Zenteno, E (1997) "Amaranthus leucocarpus lectin recognizes human naive T cell subpopulations " Immunol Invest 26(5-7) 579-87
- Lee C, Liu Q H, Tomkowicz B, Yi, Y, Freedman, B D e Collman, R G (2003) "Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways " J Leukoc Biol 74(5) 676-82
- Lee G R, Foerster, J, Lukens, J, Paraskevas, F, Greer, J P e Rodgers, G M (1999) Wintrobe's clinical hematology Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 2763
- Lee, S J, Choi, J H, Son, K H, Chang, H W, Kang, S S e Kim, H P (1995) "Suppression of mouse lymphocyte proliferation in vitro by naturally-occurring biflavonoids " Life Sci 57(6) 551-8
- Lens, M B e Eisen, T G (2003) "Systemic chemotherapy in the treatment of malignant melanoma " Expert Opin Pharmacother 4(12) 2205-11
- Lin, B F, Chiang, B L e Lin, J Y (2005) "Amaranthus spinosus water extract directly stimulates proliferation of B lymphocytes in vitro " Int Immunopharmacol 5(4) 711-22
- Lis H e Sharon N (1973) "The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins) " Annu Rev Biochem 42(0) 541-74

- Liu F T (1993) "S-type mammalian lectins in allergic inflammation " Immunol Today **14**(10) 486-90
- Lu, T, Cantrell C L, Robbs, S L Franzblau S G e Fisher N H (1998) "Antimycobacterial matricaria esters and lactones from asteracea species " Planta Med **64**(665-667)
- Luetdig, B Steinmuller, C, Gifford G E, Wagner, H e Lohmann-Matthes, M L (1989) "Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of Echinacea purpurea " J Natl Cancer Inst **81**(9) 669-75
- Lyons, A B (2000) "Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution " J Immunol Methods **243**(1-2) 147-54
- Macev M G (1994) Flow cytometry - clinical applications Oxford Blackwell Scientific Publications 310
- Malik, S M (2004) "The impact of aging on chemotherapy " Clin Lung Cancer **5**(4) 243-4
- Mann, B J (2002) "Structure and function of the Entamoeba histolytica Gal/GalNAc lectin " Int Rev Cytol **216** 59-80
- Mann, C e Staba, E j (1986) The chemistry, pharmacology and commercial formulations of chamomile Herbs spices and medicinal plants recent advances in botany horticulture and pharmacology Craker, L E e Simon J E Arizona, Oryx Press 1: 235-80
- Mans, D R A, Rocha, A B e Schwartzman, G (2000) "Anti-cancer drug discovery and development in Brazil targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds " The Oncologist **5** 185-98
- Margni, R A (1990) Inmunologia e inmunoquimica Buenos Aires Medica Panamericana 701
- Martinelli, G Cocorocchio E, Saletti P C, Orecchia, R, Bernier, J, Tradati, N, Santoro, P, Robertson, C, Peccatori, F A, Zucca, E e Cavalli, F (2003) "Efficacy of vinblastine, bleomycin methotrexate (VBM) combination chemotherapy with involved field radiotherapy in early stage (I-IIA) Hodgkin disease patients " Leuk Lymphoma **44**(11) 1919-23
- Mc, Q E, Doyle, A E e Smirk, F H (1954) "Mechanism of hypotensive action of reserpine, an alkaloid of Rauwolfia serpentina " Nature **174**(4439) 1015
- McCoy, J J, Mann, B J e Petri, W A, Jr (1994) "Adherence and cytotoxicity of Entamoeba histolytica or how lectins let parasites stick around " Infect Immun **62**(8) 3045-50
- McNeill G W, Barrie, F R Burdet H M, Demoulin, V, T S, F, Nicholson, D H, Silva, P C, Skog, J E, Thehane, P, Turland, N J e Hawksworth, D L (2000) International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code) Konigstein. Koeltz Scientific Books

- Meier R, Bein H J, Gross F, Tripod, I e Tuchmann-Duplessis, H (1954) "[Hypotensive effect of reserpine, a new Rauwolfia serpentina Benth, on animal] " C R Hebd Seances Acad Sci **238**(4) 527-8
- Mekori Y A, Blickstein D, Baram, D, Alter A, Radnay J, Rozenszajn, L A e Ravid, M (1989) "Characterization of the interference of T cell activation by reserpine " Cell Immunol **124**(2) 308-19
- Mekori Y A, Weitzman, G L e Galli, S J (1985) "Reevaluation of reserpine-induced suppression of contact sensitivity Evidence that reserpine interferes with T lymphocyte function independently of an effect on mast cells " J Exp Med **162**(6) 1935-53
- Menezes P R, Schwarz E A e Santos C A (2004) "In vitro antioxidant activity of species collected in Parana " Fitoterapia **75**(3-4) 398-400
- Merchant, D, Kahn, R e Murphy, W (1964) Handbook of cell and organ culture Broken Arrow, Burgess Publishing
- Miller K D, Loehrer, P J, Gonin R e Einhorn, L H (1997) "Salvage chemotherapy with vinblastine, ifosfamide and cisplatin in recurrent seminoma " J Clin Oncol **15**(4) 1427-31
- Miller T, Wittstock, U, Lindequist, U e Teuscher, E (1996) "Effects of some components of the essential oil of chamomile, Chamomilla recutita, on histamine release from rat mast cells " Planta Med **62**(1) 60-1
- Mishima, S, Saito, K, Maruyama, H, Inoue, M, Yamashita, T, Ishida, T e Gu, Y (2004) "Antioxidant and immuno-enhancing effects of Echinacea purpurea " Biol Pharm Bull **27**(7) 1004-9
- Molnar, A, Liliom K, Orosz, F, Vertessy, B G e Ovadi, J (1995) "Anti-calmodulin potency of indol alkaloids in in vitro systems " Eur J Pharmacol **291**(2) 73-82
- Molochko V A e Lastochkina, T M (1990) "The antistaphylococcal proprieties of plant extracts in relation to their prospective use as therapeutic and prophylatic formulaions for the skin " Vestn Dermatol Venerol **8** 54-6
- Mookerjee, B K, Lee, T P, Lippes, H A e Middleton, E, Jr (1986a) "Some effects of flavonoids on lymphocyte proliferative responses " J Immunopharmacol **8**(3) 371-92
- Mookerjee, B K, Lee, T P, Logue, G P, Lippes, H A e Middleton, E (1986b) "The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses " Prog Clin Biol Res **213** 511-20
- Morikawa, S, Morikawa, S (1992) "Inhibition of proliferation and differentiation of human B-lymphocytes by a biscoclaurine alkaloid " Int J Immunopharmacol **14**(5) 941-9
- Moyes, A e Young, H (1993) "Typing of Neisseria gonorrhoeae by auxotype, serovar and lectin agglutination " Br J Biomed Sci **50**(4) 295-300

- Muhlfordt H, Ebert F, Schottelius J, Cedillos R, Velasco J e Mosca W (1984) "Comparative characterization of Venezuelan *Trypanosoma cruzi* stocks by electron microscopy, isoelectrofocusing and lectin typing " Tropenmed Parasitol **35**(1) 11-4
- Munoz A, Alonso, B, Alvarez, O e Llovo J (2003) "Lectin typing of five medically important *Candida* species " Mycoses **46**(3-4) 85-9
- Munoz A, Alvarez, O, Alonso B e Llovo J (1999) "Lectin typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* " J Med Microbiol **48**(5) 495-9
- Munoz A, Lopez, A e Llovo, J (1994a) "Lectin typing of beta-haemolytic streptococci of groups A and B " J Med Microbiol **41**(5) 324-8
- Munoz V, Moretti, C, Sauvain, M, Caron, C, Porzel, A, Massiot G, Richard B e Le Men-Olivier, L (1994b) "Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera van heurkii* (syn *Tabernaemontana van heurkii*) " Planta Med **60**(5) 455-9
- Myers, R L (1995) Immunology - a laboratory manual Dubuque, WCB Publishers 133
- Namgoong, S Y, Son, K H, Chang, H W, Kang, S S e Kim, H P (1994) "Effects of naturally occurring flavonoids on mitogen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture " Life Sci **54**(5) 313-20
- Neto A G, Costa, J M, Belati, C C, Vmholis, A H, Possebom, L S, Da Silva Filho, A A, Cunha, W R, Carvalho J C, Bastos, J K e e Silva, M L (2005) "Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen " J Ethnopharmacol **96**(1-2) 87-91
- Newall C A, Anderson, L A e Phillipson, J D (1996) "Herbal medicines - a guide for health-care professionals" London, Pharmaceutical Press
- Ni, Y e Tizard, I (1996) "Lectin-carbohydrate interaction in the immune system " Vet Immunol Immunopathol **55**(1-3) 205-23
- Nishimoto, N, Nakai, S, Takagi, N, Hayashi, S, Takemoto, T, Odashima, S, Kizu, H e Wada, Y (1984) "Pfaffosides and nortriterpenoids saponins from *Pfaffia paniculata* " Phytochem **23**(1) 139-42
- Noble. R L, Beer, C T e Cutts, J H (1958) "Role of chance observations in chemotherapy *Vinca rosea* " Ann N Y Acad Sci **76**(3) 882-94
- Norman, P (1998) "New drug targets in inflammation and immunomodulation " Drug News Perspect **11**(7) 442-7
- Novogrodsky, A, Patya, M, Fujiki, H, Kuroki, M, Lippman, M T e Stenzel, K H (1984) "Mitogenic and comitogenic properties of the indole alkaloid class of tumor promoters " J Cell Physiol **120**(1) 36-40
- Nowell P C (1960) "Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes " Cancer Res **20** 462-6

- Nunez M J, Mana P, Linares D, Riveiro M P, Balboa, J, Suarez-Quintanilla, J, Maracchi M, Mendez M R, Lopez J M e Freire-Garabal M (2002) "Music, immunity and cancer " Life Sci **71**(9) 1047-57
- Okano H, Masuda H e Ohkubo, C (2005) "Effects of 25 mT static magnetic field on blood pressure in reserpine-induced hypotensive Wistar-Kyoto rats " Bioelectromagnetics **26**(1) 36-48
- Oliveira, F (1986) "Pfaffia paniculata (Martius) Kuntze - O ginseng-brasileiro " Rev Bras Farmacog **1**(1) 1-117
- Oliveira, M M, Sampaio, R P, Giorgi W, Gilbert B e Mors W B (1970) "Caryocar brasiliense - isolamento e identificação de algumas substâncias atividade biológica sobre o sarcoma 180 " Arq do Inst Biol **37** Supl I 25-7
- Oppenheim, J J e Rosenstreich D L (1976) Mitogens in immunobiology New York NY Academic Press
- Osawa, T (1988) "The separation of immunocyte subpopulations by use of various lectins " Adv Exp Med Biol **228** 83-104
- O'Sullivan, N, Benjamin, J e Skirrow M B (1990) "Lectin typing of Campylobacter isolates " J Clin Pathol **43**(11) 957-60
- Pakrashi, S C, Djerassi C, Wasicky, R e Neuss, N (1955) "Alkaloid studies IX Rauwolfia alkaloids IV Isolation of reserpine and other alkaloids from Rauwolfia sellowii Muell Argov " J Am Chem Soc **77**(24) 6687-9
- Palmer, R S (1955) "The hypotensive action of Rauwolfia serpentina and reserpine a double hidden placebo study of ambulatory patients with hypertension " Am Pract Dig Treat **6**(9) 1323-7
- Pandey, R, Maurya, R, Singh, G, Sathiamoorthy, B e Naik, S (2005) "Immunosuppressive properties of flavonoids isolated from Boerhaavia diffusa Linn " Int Immunopharmacol **5**(3) 541-53
- Parham, P (2001) O sistema imune Porto Alegre, Artmed 372
- Passos, X S, Santos Sda, C, Ferri, P H, Fernandes Ode, F, Paula Tde, F, Garcia, A C e Silva Mdo, R (2002) "[Antifungal activity of Caryocar brasiliensis (Caryocaraceae) against Cryptococcus neoformans]" Rev Soc Bras Med Trop **35**(6) 623-7
- Paul, E W (2003) The immune system an introduction Fundamental Immunology Paul, W E Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 1-22
- Pereira, N A (1956) "Composição alcaloídica da Rauwolfia sellowii MULL. ARG." Rev Bras Farm **37**(9) 419-22
- Perera, P, Kanjanapoth, D, Sandberg, F e Verpoorte, R (1985) "Muscle relaxant activity and hypotensive activity of some Tabernaemontana alkaloids " J Ethnopharmacol **13**(2) 165-73

- Plohmann B Bader G Hiller K e Franz G (1997) "Immunomodulatory and antitumoral effects of triterpenoid saponins " Pharmazie **52**(12) 953-7
- Powderly, W G Pier G B e Markham R B (1986) "In vitro T cell-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa* IV Nonresponsiveness in polysaccharide-immunized BALB/c mice is attributable to vinblastine-sensitive suppressor T cells " J Immunol **137**(6) 2025-30
- Presibella, M M (2003) O efeito de extratos de plantas medicinais na quimiotaxia leucocitaria in vitro Departamento de Farmacia Curitiba Universidade Federal do Parana 78
- Qiao, L , Gorczyca, W , Pizzolo, J G , Melamed, M R e Darzynkiewicz, Z (1995) ' Flow cytometric characterization of proliferation-associated nuclear antigen (p105) during the cell cycle in normal lymphocytes and promyelocytic leukemia cells (HL-60) " Anal Quant Cytol Histol **17**(3) 183-8
- Qin J Tao D , Duan, R Leng, Y Shen, M , Zhou, H , Feng, Y , Gao C , Yu, Y Li, Q Q , Hu, J e Gong, J (2002) "Cytokinetic analysis of cell cycle and sub-phases in MOLT-4 cells by cyclin E + A/DNA multiparameter flow cytometry " Oncol Rep **9**(5) 1041-5
- Randolph, R K Gellenbeck K , Stonebrook, K , Brovelli, E , Qian Y , Bankaitis-Davis D e Cheronis, J (2003) "Regulation of human immune gene expression as influenced by a commercial blended Echinacea product preliminary studies " Exp Biol Med (Maywood) **228**(9) 1051-6
- Rao, A , Luo, C e Hogan, P G (1997) "Transcription factors of the NFAT family regulation and function " Annu Rev Immunol **15** 707-47
- Rao, Y V e Chakrabarti, R (2005) "Stimulation of immunity in Indian major carp *Catla catla* with herbal feed ingredients " Fish Shellfish Immunol **18**(4) 327-34
- Rech, S B , Batista, C V F , Schripsema, J , Verpoorte, R e Henriques, A T (1998) "Cell cultures of *Rauwolfia sellowii* growth and alkaloid production " Plant Cell, Tissue and Organ Culture **54**(1) 61-3
- Reeves, G e Todd, I (2000) Lectures notes on immunology Oxford Blackwell Science
- Rekka, E A , Kourounakis, A P e Kourounakis, P N (1996) "Investigation of the effect of chamazulene on lipid peroxidation and free radical processes " Res Commun Mol Pathol Pharmacol **92**(3) 361-4
- Rininger, J A , Kickner, S , Chigurupati, P , McLean, A e Franck, Z (2000) "Immunopharmacological activity of Echinacea preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells " J Ethnopharmacol **68**(4) 503-10
- Robinson. J P (1993) Handbook of flow cytometry methods New York, Willey-Liss, Inc

- Roesler J, Emmendorffer A, Steinmuller C, Luettig B, Wagner H e Lohmann-Matthes, M L (1991) "Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to test subjects mediates activation of the phagocyte system " Int J Immunopharmacol **13**(7) 931-41
- Roitt I M, Male, D K e Brostoff, J (2003) Imunologia São Paulo Manole 481
- Rojas Hernandez N M (1979) "[Evaluation of antimicrobial activity of indol alkaloids] " Rev Cubana Med Trop **31**(3) 199-204
- Ruscetti, F W e Chervenick, P A (1975) "Regulation of the release of colony-stimulating activity from mitogen-stimulated lymphocytes " J Immunol **114**(5) 1513-7
- Ruszkowska J, Chrobak R, Maurin, J K e Czarnocki, Z (2004) "Vindoline and 16-demethoxyvindoline two catharanthus-derived alkaloids " Acta Crystallogr C **60**(Pt 5) o377-80
- Safayhi, H, Sabieraj, J, Sailer, E R e Ammon, H P (1994) "Chamazulene an antioxidant-type inhibitor of leukotriene B4 formation " Planta Med **60**(5) 410-3
- Salamon, I (1992) "Chamomile a medicinal plant " The Herb, Spice and Medicinal Plant Digest **10** 1-4
- Santiago, F M (1998) Estudo das propriedades lectínicas tóxicas e hemolíticas do fruto de *Caryocar brasiliensis* Departamento de Ciências Biológicas Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia: 72
- Sarker A B, Akagi, T, Yoshino, T, Fujiwara, K e Murakami, I (1993) "Bauhinia purpurea lectin (BPA) binding spectra in hyperplastic human tonsil and in peripheral blood immunohistochemical, immunoelectron microscopic, and flow cytometric analyses " J Histochem Cytochem **41**(6) 811-7
- Saude, M (1996) SUS - construindo um modelo de atenção a saude para a qualidade de vida 10a Conferência Nacional de Saude Final, R Brasília Ministério da Saude: 28-9
- Schmid, I I, Sattler, I I, Grabley, S e Thiericke, R (1999) "Natural Products in High Throughput Screening - Automated High-Quality Sample Preparation " J Biomol Screen **4**(1) 15-25
- Schwartz, A e Middleton, E, Jr (1984) "Comparison of the effects of quercetin with those of other flavonoids on the generation and effector function of cytotoxic T lymphocytes " Immunopharmacol **7**(2) 115-26
- Sciola, L, Spano, A, Monaco, G, Brucione, M G e Barni, S (2003) "Different apoptotic responses and patterns of tubulin binding and microtubule depolymerization in coculturing neoplastic cell cultures effects of microtubule antagonists " Histochem Cell Biol **119**(1) 77-90
- Scott, M J, Hoth J J, Gardner, S A, Peyton, J C e Cheadle, W G (2003) "Natural killer cell activation primes macrophages to clear bacterial infection " Am Surg **69**(8) 679-86, discussion 86-7

- See D M Broumand, N Sahl L e Tilles J G (1997) "In vitro effects of echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients " Immunopharmacol **35**(3) 229-35
- Seigel G M e Notter M F (1992) "Lectin-induced differentiation of transformed neuroretinal cells in vitro " Exp Cell Res **199**(2) 240-7
- Shand F L, Orme I M e Ivanyi, J (1980) "The induction of suppressor T cells by concanavalin A is independent of cellular proliferation and protein synthesis " Scand J Immunol **12**(3) 223-31
- Shapiro, H M (1985) Practical flow cytometry New York, Alan R Liss, Inc 529
- Sharon N (1983) "Lectin receptors as lymphocyte surface markers " Adv Immunol **34** 213-98
- Sharon, N (1987) "Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease " FEBS Lett **217**(2) 145-57
- Sharon N e Lis H (1972) "Lectins cell-agglutinating and sugar-specific proteins " Science **177**(53) 949-59
- Silva G L C, Gaertner, P, Marson, P G, Schwartz, E A e Santos, C A M (2004) "An ethno-pharmacobotanical survey in Salto Caxias Hydroelectric Power Plant in Parana State, Brazil, before the flooding " Acta Farm Bonaerense **22**(2) 149-54
- Smets, L A (1994) "Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs " Anticancer Drugs **5**(1) 3-9
- Smith, K A e Cantrell, D A (1985) "Interleukin 2 regulates its own receptors " Proc Natl Acad Sci U S A **82**(3) 864-8
- Soderstrom, K O (1988) "Lectin binding to serous ovarian tumours " J Clin Pathol **41**(3) 308-13
- Solis-Maldonado C, Quintanilla-Licea, R Tamez-Guerra, R Rodriguez-Padilla, C e Gomez-Flores, R (2003) "Differential effects of synthetic indoloquinolizines on in vitro rat lymphocyte and macrophage functions " Int Immunopharmacol **3**(9) 1261-71
- South, E H e Exon, J H (2001) "Multiple immune functions in rats fed Echinacea extracts " Immunopharmacol Immunotoxicol **23**(3) 411-21
- Souza, W M, Stingham, A E e Santos, C A (2004) "Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius* " Fitoterapia **75**(7-8) 750-3
- Sowalsky, R A e Fox, B S (1992) "Pattern of lectin binding to murine T lymphocytes " Immunol **75**(1) 92-8

- Sreemantula S, Boini, K M e Nammı S (2004) "Reserpine methonitrate a novel quaternary analogue of reserpine augments urinary excretion of VMA and 5-HIAA without affecting HVA in rats " BMC Pharmacol **4**(1) 30
- Steinmuller C Roesler J, Grottrup, E, Franke G, Wagner, H e Lohmann-Matthes, M L (1993) "Polysaccharides isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea* enhance the resistance of immunosuppressed mice against systemic infections with *Candida albicans* and *Listeria monocytogenes* " Int J Immunopharmacol **15**(5) 605-14
- Stemme, S e Kallberg, B (1992) "Quantitation and phenotyping of T cell clones by flow cytometry " J Immunol Methods **156**(1) 107-14
- Stimpel, M, Proksch A, Wagner, H e Lohmann-Matthes M L (1984) "Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea* " Infect Immun **46**(3) 845-9
- Stingem, L, Agea, E Lisi, P e Spinozzi, F (1999) "T-lymphocyte cytokine profiles in compositae airborne dermatitis " Br J Dermatol **141**(4) 689-93
- Sugunda A G, Amoros, M, Girre L e Fauconnier, B (1983) "Inhibitory effects of several crude and semepurified extracts of plants indigenous of France to the multiplication of human Herpesvirus 1 and of human Poliovirus 2 in cell culture " J Nat Prod **46** 626-32
- Svennerholm, B, Olofsson, S, Jeansson, S, Vahlne, A e Lycke, E (1984) "Herpes simplex virus type-selective enzyme-linked immunosorbent assay with *Helix pomatia* lectin-purified antigens " J Clin Microbiol **19**(2) 235-9
- Svoboda, G H (1958) "A note on several new alkaloids from *Vinca rosea* Linn I Leurosine virosine, perivine " J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim) **47**(11) 834
- Szalontai, M, Petri-Verzar, G e Florian E (1976) "Data on the antifungal effect of the biologically active components of *Matricaria chamomilla* L " Act Pharmac Hung **46** 232-47
- Szalontai, M, Petri-Verzar G e Florian, E (1977) "Contribution to study of antimycotic effect of biologically active componentes of *Matricaria chamomilla* L " Parfuemerie und Kosmetik **46** 232-47
- Szelenyi, I, Isaac, O e Thiemer, K (1979) "Pharmacological experiments with compounds of chamomile III Experimental studies of the ulcerprotective effect of chamomile " Planta Med **35**(3) 218-27
- Tanaka, K, Furue, M, Seki, Y, Inoue, Y, Tsuchida, T, Ohara, K e Kukita, A (1986) "Lectin-binding sites in eccrine sweat gland tumours " Br J Dermatol **114**(1) 451-8
- Thyberg, J, Moskalewski, S e Friberg, U (1977) "Effects of colchicine and vinblastine on the phytohaemagglutinin-induced transformation of lymphocytes " J Cell Sci **27** 183-98

- Trama, J Lu, Q , Hawley, R G e Ho S N (2000) "The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner " J Immunol **165**(9) 4884-94
- Turner M W e Hamvas R M (2000) "Mannose-binding lectin structure, function, genetics and disease associations " Rev Immunogenet **2**(3) 305-22
- Utz I, Hofer S , Regenass, U Hilbe, W Thaler, J Grunicke H e Hofmann, J (1994) "The protein kinase C inhibitor CGP 41251 a staurosporine derivative with antitumor activity reverses multidrug resistance " Int J Cancer **57**(1) 104-10
- Verbeek, R , Plomp, A C , van Tol, E A e van Noort J M (2004) "The flavones luteolin and apigenin inhibit in vitro antigen-specific proliferation and interferon-gamma production by murine and human autoimmune T cells " Biochem Pharmacol **68**(4) 621-9
- Verheyen, G R Pauwels G Verschaeve L e Schoeters, G (2003) "Effect of coexposure to 50 Hz magnetic fields and an aneugen on human lymphocytes, determined by the cytokinesis block micronucleus assay " Bioelectromagnetics **24**(3) 160-4
- Verotta, L , Guerrini, M , El-Sebakhy, N A Asaad A M , Toaima S M , Abou-Sheer M E , Luo, Y D e Pezzuto, J M (2001) "Cycloartane saponins from *Astragalus peregrinus* as modulators of lymphocyte proliferation " Fitoterapia **72**(8) 894-905
- Vilela, G F (1998) Variações em populações naturais de *Caryocar brasiliense* Camb (Caryocaraceae) fenológicas, genéticas e de valores nutricionais dos frutos Departamento de Engenharia Florestal Lavras, Universidade Federal de Lavras: 88
- Viola, H , Wasowski, C , Levi de Stein, M , Wolfman C , Silveira, R , Dajas, F Medina J H e Paladini, A C (1995) "Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects " Planta Med **61**(3) 213-6
- Volhardt, J (2000) "Natural extracts for baby care " Cosmetics & Toiletries **115** 63-73
- Vu Van. T , Maunoury, R e Febvre H (1971) "[Demonstration of lectin receptor sites on the membrane of human tumoral cells] " C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D **272**(9) 1320-3
- Vuk-Pavlovic Z e Rohrbach, M S (1990) "Induction of interleukin-1-beta release from human monocytes by cotton bract tannin " Int Arch Allergy Appl Immunol **91**(4) 394-7
- Vuk-Pavlovic Z , Russell, J A e Rohrbach, M S (1988) "Cotton bract tannin a novel human T-lymphocyte mitogen and a possible causative agent of byssinosis " Int Arch Allergy Appl Immunol **87**(1) 14-8
- Wagner, H e Jurcic, K (2002) "Immunological studies of Revitoni1, a phytopharmaceutical containing *Echinacea purpurea* and *Glycyrrhiza glabra* root extract " Phytomed **9**(5) 390-7

- Wagner, H , Proksch A , Riess-Maurer I Vollmar A , Odenthal S Stuppner H , Jurcic, K , Le Turdu M e Fang, J N (1985) "Immunostimulating action of polysaccharides (heteroglycans) from higher plants " Arzneimittelforschung **35**(7) 1069-75
- Wang, C C , Chen, L G e Yang, L L (2002) "In vitro immunomodulatory effects of cuphuin D1 on human mononuclear cells " Anticancer Res **22**(6C) 4233-6
- Wang, Y Y e Zheng, X X (2002) "A flow cytometry-based assay for quantitative analysis of cellular proliferation and cytotoxicity in vitro " J Immunol Methods **268**(2) 179-88
- Wassarman P M (1987) "The biology and chemistry of fertilization " Science **235**(4788) 553-60
- Watanabe, T Watanabe M , Watanabe Y e Hotta, C (2000) "Effects of oral administration of Pfaffia paniculata (Brazilian ginseng) on incidence of spontaneous leukemia in AKR/J mice " Cancer Detect Prev **24**(2) 173-8
- Wei H , Tye, L . Bresnick E e Birt, D F (1990) "Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice " Cancer Res **50** 499-502
- Weis, W I e Drickamer, K (1996) "Structural basis of lectin-carbohydrate recognition " Annu Rev Biochem **65** 441-73
- Weiss, A e Samelson, L E (2003) T-lymphocyte activation Fundamental immunology Paul, W E Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 321-63
- Weksler M E , Kuntz, M M , Birnbaum, G e Innes, J B (1978) "Lymphocyte transformation induced by autologous cells " Fed Proc **37**(10) 2370-3
- Weksler, M E , Moody, C E , Jr e Kozak, R W (1981) "The autologous mixed-lymphocyte reaction " Adv Immunol **31** 271-312
- Wilasrusmee C , Siddiqui, J , Bruch, D , Wilasrusmee, S , Kittur S e Kittur, D S (2002) "In vitro immunomodulatory effects of herbal products " Am Surg **68**(10) 860-4
- Wildfeuer, A e Mayerhofer, D (1994) "The effects of plant preparations on cellular functions in body defense " Arzneimittelforschung **44**(3) 361-6
- Willianson E M Okpako, D T e Evans, F J (1996) Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material Pharmaceutical methods in phytotherapy research Chechester, Wiley: 228p
- Wilson L e Jordan. M A (2004) "New microtubule/tubulin-targeted anticancer drugs and novel chemotherapeutic strategies " J Clin Oncol **22** 83-5
- Yamada, K , Miura, T e Mimaki, Y S , Y (1996) "Effect of inhalation of chamomile oil vapour on plasma ACTH level in ovariectomized - rat under restrivtion stress " Biol & Pharm Bulletin **19** 1244-6

- Yamaguchi H (1992) "Immunomodulation by medicinal plants " Adv Exp Med Biol **319** 287-97
- Yamaguchi, N e Osawa T (1984) "Separation and characterization of macrophage precursors and of interleukin 2-responding cells from nylon wool-nonadherent murine spleen cells by using Bauhinia purpurea agglutinin " Int Arch Allergy Appl Immunol **75(4)** 309-16
- Yang, T Buchan H L , Townsend, K J e Craig, R W (1996) "MCL-1 a member of the BCL-2 family, is induced rapidly in response to signals for cell differentiation or death, but not to signals for cell proliferation " J Cell Physiol **166(3)** 523-36
- Zarkovic N , Vukovic, T Loncaric, I , Miletic, M , Zarkovic, K Borovic, S , Cipak, A , Sabolovic, S , Konitzer, M e Mang, S (2001) "An overview on anticancer activities of the Viscum album extract Isorel " Cancer Biother Radiopharm **16(1)** 55-62
- Zhu-Salzman, K e Salzman, R A (2001) "Functional mechanics of the plant defensive Griffonia simplicifolia lectin II resistance to proteolysis is independent of glycoconjugate binding in the insect gut " J Econ Entomol **94(5)** 1280-4

ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (maiores de 21 anos)

Antes de consentir em participar do estudo, assinando este documento, afirmo que fui informado a respeito da coleta de sangue e dos seus possíveis desconfortos e riscos. Também recebi uma cópia escrita com o resumo dessas informações.

Autorizo o investigador e a instituição relacionada ao estudo a consultarem minha história clínica, mantendo a máxima confidencialidade possível.

Com base nessas informações, aceito voluntária e livremente participar deste estudo, entendendo que, assino este documento.

| | Assinatura e RG | Nome em letra de forma (Preenchido por quem assina) |
|--------------|--------------------------|--|
| Doador | | |
| Investigador | | |
| Local e data | (Preenchido pelo doador) | |

Curitiba, 11 de novembro de 2003

Ilmo (a) Sr (a)
Dr Júlio Cesar Machado Júnior
Nesta

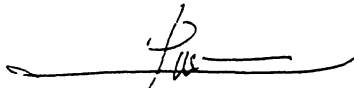
Prezado(a) Senhor(a)

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado 'ESTUDO IN VITRO DO POTENCIAL IMUNOMODULATORIO DE EXTRATO DE PLANTAS MEDICINAIS', foi analisado e aprovado pelo Comitê de Etica em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 28 de outubro de 2003. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96 e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Protocolo CEP/HC 105 EXT 059/2003-10

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas as modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos

Data para entrega do primeiro relatório 11 de maio de 2004

Atenciosamente



Prof Dr Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Etica em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

Echinacea purpurea (L.) Moench Compositae (Asteraceae)

Leia com atenção antes de usar o produto
MEDICAMENTO FITOTERAPICO TRADICIONAL

APRESENTAÇÃO Embalagem com 2 blisters contendo 15 capsulas cada
USO ADULTO

COMPOSIÇÃO Cada capsula contem em media
 Extrato seco de equinacea 250mg
 Excipiente (lactose) q s p 500mg

CONCENTRAÇÃO DOS PRINCIPIOS ATIVOS
 O extrato esta padronizado em 4% de fenois totais
 Cada capsula contem 10mg de fenois totais (acido cafeico calculado como acido clorogenico)

NOMENCLATURA BOTANICA OFICIAL
Echinacea purpurea (L.) Moench Compositae (Asteraceae)

PARTE UTILIZADA DA PLANTA
 Raiz

INFORMAÇÕES AO PACIENTE
 IMUNNAL extrato seco de equinacea e um fitoterapico indicado no tratamento e prevençao de infecçoes respiratorias virais tais como gripes e resfriados
 Este medicamento deve ser guardado ao abrigo da luz do calor e da umidade Nestas condiçoes o medicamento se mantera proprio para o consumo respeitando o prazo de validade indicado na embalagem

O prazo de validade do produto e de 24 meses a partir da data de fabricaçao
 Nao tome medicamento com o prazo de validade vencido pode ser perigoso a sua saude
 Informe seu medico a ocorrencia de gravidez na vigencia do tratamento ou apos o seu termino
 Informar ao medico se esta amamentando
 Siga a orientaçao do seu medico respeitando sempre os horarios as doses e a duraçao do tratamento

Nao interromper o tratamento sem o conhecimento do seu medico
 IMUNNAL e um estimulante do sistema imunologico Por isso nao deve ser usado por longos periodos sem indicaçao medica
 Recomenda se que seu uso nao ultrapasse oito semanas consecutivas
 Ha relatos de que o uso da *Echinacea purpurea* por um periodo superior a 8 semanas pode ocasionar hepatotoxicidade
 Informe seu medico o aparecimento de reaçoes desagradaveis As reaçoes diversas com o uso de extrato seco de equinacea sao brandas e raras Contudo pode ocorrer gosto desagradavel na boca nauseas e vomitos ardencia na faringe dor abdominal diarreia desconforto na garganta ou ao engolir sialorreia (aumento anormal do fluxo salivar) vertigens cefaleia

TODO MEDICAMENTO DEVERA SER MANTIDO FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS
 A *Echinacea purpurea* pode interferir com drogas imunossupressoras (corticosteroides e ciclosporina) Desta forma o uso concomitante devera ser realizado somente com orientaçao e supervisao medica

Informe seu medico sobre qualquer medicamento que esteja usando antes do inicio ou durante o tratamento
 O uso da *Echinacea purpurea* deve ser evitado por pacientes portadores de AIDS tuberculose em casos de doençcas autoimunes e colagenoses
 Nao deve ser utilizado durante a gravidez e a lactaçao

NAO TOME REMEDIO SEM O CONHECIMENTO DO SEU MEDICO PODE SER PERIGOSO A SAUDE

INFORMAÇÃO TECNICA
 Composiçao fitoquimica
 A *Echinacea purpurea* possui a seguinte composiçao fitoquimica
 Polissacarideos com alto peso molecular heteroxilina arabinogalactano equinacina O metil glucosarabinosilina (polissacarideo I) arabinorarnnogalactan (polissacarideo II) inulina (5.8%)
 Derivados do acido cafeico acidos fenolicos (fenois totais acidos clorogenico e equinacosideo 0.5-1.0% cinarina acido clorogenico acido quimico acido cafeoil tartarico glicosideo cafeoil verbascosideo Alquilamidas cerca de 20 derivados de isobutilamina de acidos graxos de cadeia plana (de C11 C16) quinacina neoarculina α sanshool acido chicorico (0.04%) Flavonoides rutina rutosideo (0.48-0.38%) Oleos essenciais (0.6%) humuleno borneol burnil acetato germacreno D crionileno Alcaloides (saturados tipo pitrolizidina) isotussilagina e tussilagina 0.006% Outros constituintes betaina(carotenoides) resinas (1.9%) acidos graxos (oleico linoleico carotimico pimitico) fitosterols poliacetilenos glicosideos do acido quimico sais minerais achinolona açucars reduzidos (glicose frutose outras pentoses)

MODO DE AÇÃO
 A farmacologia do extrato seco de equinacea encontra se muito bem estudada e possui diversos mecanismos de açao envolvidos Os estudos realizados comprovam seu uso tradicional no tratamento de infecçoes respiratorias e cutaneas demonstrando atividade imunologica antiinflamatória e antiviral principalmente Açao imunoestimulante e imunomoduladora A açao imunoestimulante e dada por diferentes mecanismos A fraçao polissacaridea da equinacea estimula os macrofagos aumentando a atividade de fagocitose e a produçao de fator de necrose tumoral

pouca açao estimulante sobre os linfocitos estes ligam se aos receptores de superficie dos lin T estimulando a produçao de interferon e outras citocinas (interleucinas) Isto resulta em aumento da replicaçao das celulas T ativaçao dos macrotagos das ligaçoes antigeno/anticorpo e aumento do numero de neutrófilos circulantes Os derivados do acido cafeico e as alquilamidas como estimulantes adicionais da fagocitose aumentando a capacidade fagocitica at lisossomas e a explosao respiratoria importantes para a destruicão de bacterias O acido cloro e um potente inibidor da via classica do complemento mas nao possui influencia na via alter sugerindo que a imibicão seja na fase inicial da sua ativaçao A inulina estimula a via alterna complemento tendo varios efeitos secundarios sobre o sistema fagocitico A via alterna causar a fixaçao de complemento em substancias estranhas ao organismo como as bacterias alem de liberar substancias que estimulam a migraçao de leucocitos para area haja infecçao Os efeitos da inulina sobre a via alternativa do complemento sao causados pelo estímulo a sintese de properdina aumentando seus niveis sericos A properdina e um dos da imunidade nao especifica do organismo Alem de ativar o complemento na presençca de anti bacterianos e estimular a imunidade humoral a properdina participa tambem dos processos bacteriana Como conclusao de varios estudos o extrato seco de equinacea po considerado um estimulante inespecifico da imunidade celular e do sistema fagocitario

INDICAÇÕES
 Terapia adjuvante e profilaxia de infecçoes recorrentes do trato respiratorio superior (gripe cl

CONTRA INDICAÇÕES
 O extrato seco de equinacea nao deve ser usado durante a gravidez e lactaçao pois nao e informaçoes sobre a farmacocinetica e a passagem de substancias pelo leite materno ou o da administraçao de *Echinacea purpurea* nessas condiçoes

Pessoas com hipersensibilidade a equinacea ou aos seus componentes
Colagenoses e outras doençcas autoimunes como a *Echinacea purpurea* causa um e generalizado das funçoes do sistema imunologico a maioria dos auto concorda que recomendavel sua administraçao a pacientes com doençcas autoimunes pois pode agrava condiçoes

AIDS (Síndrome da imunodeficiencia adquirida) a *Echinacea purpurea* causa aume liberaçao de interleucinas e fator de necrose tumoral que aumentam a replicaçao do virus n isso e possivel que sua administraçao na AIDS venha a causar mais maleficios que benéficos que leva a maioria dos autores a contra indica la em infecçao por HIV
Tuberculose devido ao seu estimulo imunologico

PRECAUÇÕES E ADVERTENCIAS
 Seguir a posologia recomendada
 Em caso de hipersensibilidade ao produto descontinuar o uso
 Usar cuidadosamente em portadores de Diabetes Mellitus pois a equinacea e muito rica em glic podendo alterar a glicemia
 O extrato seco de equinacea e estimulante do sistema imunologico Por isso nao deve ser por longos periodos sem indicaçao medica Recomenda se que seu uso nao ultrapasse oito se consecutivas

INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS
 A *Echinacea purpurea* pode interferir com drogas imunossupressoras (corticoster ciclosporina) Desta forma o uso concomitante devera ser realizado somente com orient supervisao medica

REAÇÕES ADVERSAS/EFEITOS COLATERAIS
 As reaçoes adversas com o uso de extrato seco de equinacea sao brandas e raras Contudo ocorrer gosto desagradavel na boca nauseas e vomitos ardencia na faringe dor abdominal o desconforto na garganta ou ao engolir sialorreia (aumento anormal do fluxo salivar) ver cefaleia

POSOLOGIA
 Ingerir 1 capsula contendo 250mg de extrato seco padronizado de equinacea a 4% de totais 3 a 4 vezes ao dia

SUPERDOSAGEM
 A superdosagem por *Echinacea purpurea* por via oral nao foi relatada em humanos muito altas podem produzir nauseas vomitos e sialorreia Em caso de superdosagem lavagem gastrica Caso hajam nauseas e vomitos devera ser usada metoclorpramida intramuscular

PACIENTES IDOSOS
 Não existem recomendações especificas para o emprego de IMUNNAL em pacientes idosos

CUIDADOS DE CONSERVAÇÃO
 Manter ao abrigo da luz do calor e da umidade
 Lote data de fabricaçao e validade vide embalagem

VENDA SEM PRESCRIÇÃO MEDICA

HERBARIUM LABORATORIO BOTANICO LTDA
 Av Santos Dumont 1111 Colombo PR CNPJ 78.950.011/0001-20 Industria Brasileira
 Farmaceutica resp Dra Anny M M Trentini CRF PR 4081
 MS 11860-0008

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR 0800 723 8383

13717 01/04