

**CHRISTIAN DE ALENCAR SIEBRA**

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Annona glabra* Linn.,  
ANNONACEAE**

**CURITIBA  
2007**

**CHRISTIAN DE ALENCAR SIEBRA**

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Annona glabra* Linn.,  
ANNONACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Área de Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Almeriane Maria Weffort-Santos

**CURITIBA  
2007**

## NOTA BIOGRÁFICA

O autor é Farmacêutico Bioquímico graduado pela Universidade Federal do Paraná em 2001. Durante a graduação, de janeiro a dezembro de 1998, foi voluntário em iniciação científica no Laboratório de Equilíbrio Químico e Quimiométrico do Departamento de Química da UFPR, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Lucia Ramalho Mercê Maia, participando do projeto de pesquisa “Estudo quantitativo, qualitativo, estrutural e complexométrico da arabinogalactana extraída de *Pereskia aculeata*”. De agosto a dezembro de 2000, foi monitor na disciplina de Citologia Clínica A, do Departamento de Patologia Médica da UFPR, período que participou do projeto “Educação para prevenção do câncer e de doenças sexualmente transmissíveis”, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Suely Soares Leonart. Iniciou sua carreira profissional como farmacêutico responsável pelo Metrolab – Laboratório de Análises Clínicas, no município de Colombo-PR, entre setembro de 2001 e março de 2005, e no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital e Maternidade Victor Ferreira do Amaral, de março de 2002 a setembro de 2004. Atualmente é farmacêutico bioquímico no laboratório do Hospital Nossa Senhora das Graças. Em 2005, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Análises Clínicas, onde desenvolveu projeto sobre as atividades biológicas do extrato de *Annona glabra* Linn., cujos resultados estão apresentados nesta dissertação de mestrado.

## DEDICATÓRIA

À minha querida esposa Ligia, aos meus pais e irmãos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu bom Deus, pelas bênçãos concedidas, graças alcançadas e por fazer de mim instrumento de Sua vontade.

A minha esposa, Ligia Maria Claro, pelo companheirismo e amor.

Aos meus pais, Francisco Américo Siebra de Brito e Márcia Maria de Alencar Siebra, pelo dom da vida e por me ensinarem a viver com humildade e honestidade.

Aos meus irmãos, pelo carinho e apoio incondicionais.

A Prof<sup>ª</sup> Almeriane Maria Weffort-Santos, por contribuir definitivamente com minha formação pessoal e profissional, com dedicação, entusiasmo, conhecimento e amizade.

Ao Prof. Brás Heleno Oliveira, pela gentileza de fornecer o extrato de *A. glabra*, o ácido caurenóico e o esteviol, além da sua disponibilidade e apoio.

Ao Prof. Marco Antônio Ferreira Randi, pelos ensinamentos e orientações nos ensaios com células HEP-2.

Ao Prof. José Domingos Fontana, pela atenção e disponibilidade nos ensaios com *Artemia salina*.

Ao Prof. Aguinaldo José do Nascimento, por me ajudar pacientemente com as análises estatísticas.

A Prof<sup>ª</sup> Maria Suely Soares Leonart, por ser uma grande incentivadora e amiga. A todos os professores da UFPR, pelas colaborações que tornaram este trabalho possível.

A Irene e Geni, pela amizade, carinho e ajuda no dia-a-dia do nosso trabalho.

Aos amigos Ângela, Jeanine, Julio, Melissa, Fabiana, Fernanda, Luciana, Tatiana e colegas da Pós-graduação, especialmente, Gabriel, Larissa, Michele, Jaqueline e Janaína, pelas contribuições e amizade. Ao Altair, Adélia e Indianara, pela inestimável ajuda em meus experimentos. Aos meus grandes amigos e irmãos que se formaram comigo nesta escola, pela valiosíssima amizade e união.

A todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, deram sua contribuição para que este trabalho, como fruto de um grande esforço, fosse concretizado, o meu sincero agradecimento.

## EPIGRAFE

Quando a próxima tarefa é uma montanha a sua frente,  
ela pode parecer muito difícil de se escalar.  
Mas, você não precisa escalá-la de uma só vez...  
dê um pequeno passo...  
e dê mais um pequeno passo...  
e, mais um... e então, outro...  
E você descobrirá que a tarefa,  
que era uma montanha à sua frente,  
é apenas uma montanha que você já escalou!

*Ashley Rice*

## SUMÁRIO

<b>NOTA BIOGRÁFICA</b> .....	iii
<b>DEDICATÓRIA</b> .....	iv
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	v
<b>EPÍGRAFE</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. FAMÍLIA ANNONACEAE E <i>Annona glabra</i> .....	2
1.2. CONSTITUINTES QUÍMICOS E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS.....	6
1.3. MECANISMOS DE DEFESA.....	8
1.3.1. INFLAMAÇÃO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	8
1.3.1.1. Adesão celular.....	11
1.3.1.2. Quimiotaxia.....	13
1.3.2. O SISTEMA IMUNITÁRIO.....	15
1.3.2.1. Células do sistema imunitário adaptativo.....	15
1.3.2.2. Interação de linfócitos e antígenos.....	18
1.3.2.3. Ativação e proliferação de linfócitos.....	18
1.3.2.4. Resposta de linfócitos a mitógenos.....	20
1.4. PLANTAS MEDICINAIS COMO AGENTES PROMOTORES DA SAÚDE.....	22
1.5. PLANTAS MEDICINAIS COMO AGENTES ANTIINFLAMATÓRIOS, IMUNOMODULADORES E ANTI-TUMORAIS.....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	26
2.1. OBJETIVO GERAL.....	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
3.1. SOLUÇÕES.....	27
3.2. MATERIAL BOTÂNICO.....	29

3.3. OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS HUMANOS.....	29
3.3.1. <i>Separação das populações de leucócitos humanos</i> .....	30
3.4. VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE SOBRE LEUCÓCITOS HUMANOS.....	30
3.5. PREPARO DE CITOCENTRIFUGADOS.....	31
3.6. COLORAÇÃO DE MAY-GRÜNWARD-GIEMSA.....	31
3.7. ENSAIO DE QUIMIOTAXIA DE GRANULÓCITOS.....	31
3.8. ENSAIO DE IMUNOMODULAÇÃO.....	32
1.1 3.8.1. <i>Ativação e proliferação de linfócitos avaliada por citometria de fluxo</i> .....	32
1.1.1.1 3.8.2. <i>Ativação de linfócitos avaliada morfológicamente</i> .....	33
3.9. TESTE DE LETALIDADE PARA NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> ....	33
3.9.1. <i>Eclosão dos cistos de Artemia salina</i> .....	33
3.9.2. <i>Ensaio de letalidade dos náuplios</i> .....	34
1.2 3.9.3. <i>Concentração letal em 50% dos náuplios (CL<sub>50</sub>)</i> .....	34
3.10. ENSAIO COM CÉLULAS HEP-2.....	34
3.10.1. <i>Manutenção de células HEP-2</i> .....	34
3.10.2. <i>Viabilidade e citotoxicidade</i> .....	34
3.10.3. <i>Ensaio de adesão</i> .....	35
3.10.4. <i>Expressão de moléculas de adesão</i> .....	37
3.11. ESTUDOS ESTATÍSTICOS.....	37
3.12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS – FORMATAÇÃO.....	37
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
4.1. ENSAIOS DE SOLUBILIZAÇÃO.....	38
4.2. ENSAIOS COM LEUCÓCITOS HUMANOS.....	38
4.2.1. <i>Toxicidade</i> .....	38
4.2.2. <i>Quimiotaxia</i> .....	43
4.2.3. <i>Imunomodulação</i> .....	50
4.3. TESTE DE LETALIDADE PARA NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> ....	56
4.4. ENSAIOS COM CÉLULAS HEP-2.....	58
4.4.1. <i>Toxicidade</i> .....	60
4.4.2. <i>Adesão celular</i> .....	62
4.4.3. <i>Expressão de moléculas de adesão</i> .....	65
4.5. ÁCIDO CAURENÓICO E ESTEVIOL: ESTRUTURA QUÍMICA x ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	66

<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>81</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – <i>Annona glabra</i> Linn. ....	3
<b>Figura 2</b> – Flores de <i>Annona glabra</i> Linn. ....	4
<b>Figura 3</b> – Fruto de <i>Annona glabra</i> Linn. ....	5
<b>Figura 4</b> – Eventos leucocitários na inflamação.....	9
<b>Figura 5</b> – Aplicação do Programa UTHSCSA <i>ImageToll for Windows</i> , versão 3.00, para o estudo dos efeitos do extrato de <i>A. glabra</i> , do ácido caurenóico e do esteviol sobre a adesão de células HEp-2.....	36
<b>Figura 6</b> – Efeito do extrato de <i>A. glabra</i> , do ácido caurenóico e do esteviol sobre a viabilidade de granulócitos humanos.....	40
<b>Figura 7</b> – Efeito do extrato de <i>A. glabra</i> , do ácido caurenóico e do esteviol sobre a viabilidade de leucócitos mononucleares humanos.....	42
<b>Figura 8</b> – Avaliação dos efeitos do extrato de <i>A. glabra</i> , do ácido caurenóico e do esteviol sobre a quimiotaxia de granulócitos humanos.....	45
<b>Figura 9</b> – Representação gráfica em pontos para análise da atividade imunomodulatória de linfócitos por citometria de fluxo.....	51
<b>Figura 10</b> – Efeitos do extrato de <i>A. glabra</i> , do ácido caurenóico e do esteviol sobre a transformação blástica e a proliferação de linfócitos humanos.....	53
<b>Figura 11</b> – Efeitos do extrato de <i>A. glabra</i> , do ácido caurenóico e do esteviol sobre a transformação blástica e a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina.....	54
<b>Figura 12</b> – <i>Artemia salina</i> , suas formas de vida e ensaio de letalidade.....	57
<b>Figura 13</b> – Cultura de células HEp-2.....	59
<b>Figura 14</b> – Efeito do extrato de <i>A. glabra</i> , do ácido caurenóico e do esteviol sobre a viabilidade de células HEp-2.....	60
<b>Figura 15</b> – Efeito do extrato de <i>A. glabra</i> , do ácido caurenóico e do esteviol sobre a adesão de células HEp-2 à base dos frascos de cultura.....	63
<b>Figura 16</b> – Expressão de moléculas de adesão em células HEp-2.....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Mitógenos: características e células alvo.....	21
<b>Tabela 2</b> – Efeito do extrato de <i>A. glabra</i> , do ácido caurenóico e do esteviol sobre a viabilidade de náuplios de <i>Artemia salina</i> .....	56
<b>Tabela 3</b> - Atividades biológicas do ácido caurenóico e do esteviol.....	67

## RESUMO

A *Annona glabra* Linn. (Annonaceae), conhecida no Brasil como Araticum-do-brejo ou Araticum-bravo, é uma árvore de pequeno porte encontrada em todo território brasileiro, principalmente nas áreas costeiras. Na medicina popular, tem sido utilizada principalmente como vermífuga e anti-reumática. Diferentes métodos *in vitro* têm sido empregados para a investigação de atividades biológicas de plantas usadas na medicina popular. Este trabalho teve como objetivos investigar as atividades biológicas *in vitro* do extrato de *A. glabra* e do ácido caurenóico dele purificado, enfatizando sua toxicidade sobre leucócitos humanos, sobre náuplios de *Artemia salina* e sobre células HEP-2. Ainda, observou-se seus efeitos sobre a quimiotaxia de granulócitos e seu potencial imunomodulatório sobre células mononucleares. Observou-se sua influência sobre a adesão de células HEP-2 e a expressão de moléculas de adesão. Por ter uma estrutura química muito parecida com o ácido caurenóico, diferindo deste pela presença de uma hidroxila no carbono 13 do anel terpênico, em paralelo, avaliou-se os efeitos do esteviol. Os resultados obtidos demonstraram que somente o ácido caurenóico apresentou-se tóxico sobre leucócitos humanos mononucleares em concentrações iguais ou superiores a 100  $\mu\text{M}$ , e sobre náuplios de *Artemia salina*, com  $\text{CL}_{50}$  de 54,4  $\mu\text{M}$ . Os ensaios de quimiotaxia revelaram que o extrato inibe, de forma dose dependente, a migração natural de granulócitos, sugerindo uma atividade antiinflamatória, enquanto o ácido caurenóico, a 0,001 a 0,01  $\mu\text{M}$ , e o esteviol a 0,1  $\mu\text{M}$ , demonstraram estimulá-la. Em contraste, nenhum efeito foi observado com relação à imunomodulação. De particular interesse, ambos, extrato e ácido caurenóico, interferiram, de forma significativa e dependente da dose, na adesão natural de células HEP-2, efeito este não promovido pelas integrinas  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$ . Alguns dos efeitos apresentados ainda não foram descritos e, dessa forma, complementam a lista de atividades biológicas já conhecidas, não só para o extrato de *A. glabra*, mas também para o ácido caurenóico.

Palavras-chaves: *Annona glabra*, ácido caurenóico, esteviol, citotoxicidade, HEP-2, *Artemia salina*, quimiotaxia, adesão celular.

## ABSTRACT

*Annona glabra* Linn. (Annonaceae), known in Brazil as Araticum-do-brejo or Araticum-bravo, is a small tree that grows over the Brazilian coast and have been used in the folk medicine as a vermifuge and anti-rheumatic. Different *in vitro* methods have been used for investigating biological activities of medicinal plants. The aims of this study were to evaluate the *in vitro* biological potential of the extract of *A. glabra* and its purified kaurenoic acid, focusing their toxicity upon human leukocytes, *Artemia salina* nauplii, and HEP-2 cell line. Their effects upon the human granulocyte chemotaxis, and upon mononuclear cells immunomodulation were also investigated, as well as their influence upon the natural adhesion of HEP-2 cells and the expression of cell adhesion molecules were studied. As steviol is similar to kaurenoic acid in their chemical structure, differing from it in a hydroxyl group linked to the carbon 13 of the terpenic ring, its effects were also evaluated. The results herein described showed that only the kaurenoic acid, at 100  $\mu\text{M}$  and over, was toxic to mononuclear cells, and upon *A. salina* nauplii, with a  $\text{DL}_{50}$  of 54,4  $\mu\text{M}$ . In the chemotactic assay, inhibition dose-dependent of the granulocyte migration could be observed for the extract, suggesting an anti-inflammatory activity, in contrast with the stimulation observed for the kaurenoic acid, at 0,001 and 0,01  $\mu\text{M}$ , and for steviol, at 0,1  $\mu\text{M}$ . When focusing immunomodulation properties, no activity could be drawn. Of interest were the findings that both, extract and kaurenoic acid, were able to significantly increase, in a dose-dependent fashion, the adhesion of HEP-2 cells to the plastic surface, which were not mediated by  $\alpha_4\beta_1$  and  $\alpha_5\beta_1$  integrins. Some of the effects presented in this work are reported for the first time and will improve the list of biological activities already described not only for the *A. glabra* extract but also for the kaurenoic acid.

Keywords: *Annona glabra*, kaurenoic acid, citotoxicity, HEP-2, *Artemia salina*, chemotaxis, cellular adhesion.

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma planta para ser considerada medicinal deve aliviar, prevenir ou curar uma doença ou alterar um processo fisiológico ou patológico ou, ainda, ser empregada como fonte de uma droga ou seus precursores (WHO, 2002a). Uma preparação fitofarmacêutica ou medicinal caracteriza-se como qualquer medicamento manufaturado obtido exclusivamente das partes aéreas e não aéreas de plantas medicinais, além de resinas, óleos e sucos, usadas em seu estado bruto ou em uma formulação farmacêutica (Calixto, 2000).

A utilização de plantas como drogas para o tratamento de uma variedade de doenças tem sido realizada desde a atinguidade. As plantas medicinais desempenham papel chave na saúde humana, mesmo com os avanços observados na medicina moderna. Isto porque, segundo a OMS, *“devido à pobreza e a dificuldade de acesso a medicina moderna, aproximadamente 65 a 80% da população mundial que mora em países em desenvolvimento dependem essencialmente de plantas medicinais para o tratamento primário de doenças”* (WHO, 2002b).

“Medicina tradicional” (MT) é um termo amplo e refere-se a sistemas de tratamento como as medicinas tradicionais chinesa, indiana, arábica ou a medicina indígena. A MT pode se utilizar de terapias medicamentosas – se envolvem o uso de plantas medicinais, partes animais ou minerais – e não medicamentosas – se não utilizam medicamentos no tratamento primário, como é observado na acupuntura, nas terapias manuais e espirituais. Em países onde o sistema nacional de saúde é baseado principalmente na medicina alopática, ou quando a MT não está incorporada nos sistemas de saúde, este termo também pode ser conhecido como medicina complementar, alternativa ou não-convencional (WHO, 2002b).

Grande parte da população mundial faz uso da medicina complementar para cuidar de sua saúde e uma parte significativa dessa terapia tradicional envolve plantas, utilizadas particularmente sob a forma de chás e extratos. No Brasil, este costume não é diferente e a incorporação de plantas medicinais ao aparato terapêutico utilizado nas mais variadas doenças têm conquistado espaço cada vez maior.

A diversidade de climas e regiões geográficas no Brasil favorece o desenvolvimento de uma flora diversificada. Neste contexto, observa-se o uso de plantas medicinais como terapia alternativa e/ou como suporte às terapias convencionais. No entanto, a idéia de que as drogas preparadas de plantas são seguras e isentas de efeitos adversos é falsa. As plantas contêm centenas de constituintes e alguns deles são muito tóxicos como, por exemplo, as drogas citotóxicas derivadas de plantas com atividade anti-câncer. Mesmo assim, estudos clínicos apontam que os efeitos adversos de agentes fitoterápicos são menos freqüentes se comparados com os de drogas sintéticas (Calixto, 2000).

Além disso, o Brasil gasta cerca de dois a três bilhões de dólares por ano na importação de matérias-primas utilizadas no preparo de medicamentos. O panorama, nessa área, mostra que 84% dos fármacos consumidos no Brasil são importados e que 78 a 80% da produção é feita por indústrias multinacionais (Varanda, 2006), o que justifica a busca de alternativas para superar a dependência externa por parte da indústria químico-farmacêutica brasileira.

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

### 1.1. FAMÍLIA ANNONACEAE E *Annona glabra*

A família Annonaceae, de distribuição pantropical, caracterizada por árvores e arbustos, tem cerca de 110 gêneros e aproximadamente 2.150 espécies identificadas (Mabberley, 1997). No Brasil, foram registrados 29 gêneros, compreendendo cerca de 260 espécies (Barroso *et al.*, 1978). Dentre essas, situa-se a *Annona glabra* Linn., comumente conhecida no Brasil como Araticum-do-brejo ou Araticum-bravo (Figura 1A).

É uma árvore de pequeno porte, semidecídua, encontrada em todo o território brasileiro, principalmente nas áreas costeiras, e alcança aproximadamente 12 a 15 metros de altura. Um espécime possui normalmente tronco único, porém as sementes germinam em grupo (Figura 1, B e C), dando aparência de moitas com vários caules (Protection, 2004). Necessita de solo

úmido para crescimento e beneficia-se de inundações regulares, porém não permanentes.

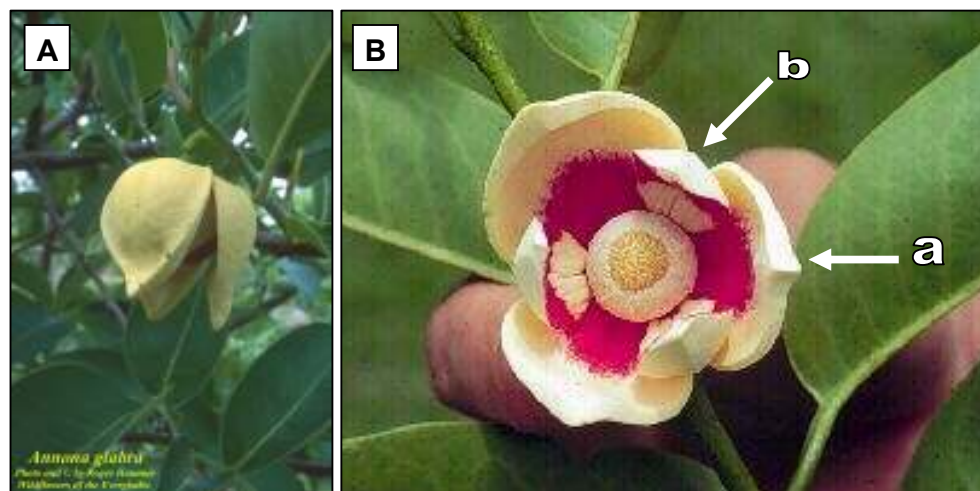


**Figura 1. *Annona glabra* Linn.** Árvore de pequeno porte, encontrada principalmente em regiões alagadiças, salobras ou não, onde muitas sementes podem germinar juntas, dando o aspecto de moitas.

Fonte: (A e B) Weed Management Guide, Pond Apple, *Annona glabra*, 2003. (C) Facts, Pond Apple, *Annona glabra*, 2004.

Crescendo naturalmente também nas Américas do Norte, do Sul e Central, além do oeste Africano, em regiões alagadas, salobras ou não, seu crescimento ocorre em *habitats* que estão, periodicamente ou permanentemente, inundados (Croat, 1978), ou seja, ao longo de rios, margens de lagos e em regiões salobras próximas ao litoral. A adaptação a esses ambientes se deve às várias características estruturais da planta, como intumescimento da base de seu tronco, raízes adventícias, aerênquima nas raízes, tronco pequeno, frutos que bóiam e à dispersão das sementes na água (Zotz *et al.*, 1997). Consegue sobreviver em períodos de seca, porém seu crescimento torna-se severamente comprometido. Os frutos flutuam e podem sobreviver por períodos prolongados quando imersos em água, salobra ou não (Protection, 2004).

As flores, ilustradas na Figura 2, são raramente observadas, porém muito atrativas, geralmente com 2 a 3 cm de diâmetro, variando de amarelo pálido a creme, com três pétalas maiores externas encouraçadas e três pétalas pequenas internas (Protection, 2004).



**Figura 2. Flores de *Annona glabra* Linn.** De cor amarelo pálido a creme, possuem externamente três pétalas maiores (a), encouraçadas e três pétalas pequenas (b) internamente.

Fonte: (A) Atlas de Plantas Vascularizadas da Flórida, Universidade do Sul da Flórida – EUA; (B) Albion College, 1983, Michigan – EUA.

As folhas possuem de 7 a 12 cm de comprimento, pecíolo cilíndrico, lâmina oblonga, cartácea, base obtusa, ápice acuminado, margem plana, com 9 a 13 pares de nervuras secundárias. A maturidade reprodutiva é atingida após aproximadamente dois anos, quando se inicia a floração e a produção de frutos.

O fruto é esférico, com cerca de 5 a 15 cm de diâmetro, naturalmente verde (Figura 3), o qual, após a queda, torna-se amarelado, escurecendo em seguida. Contém pouco mais de 100 sementes, de aspecto semelhante aos da abóbora, com aproximadamente 1 cm de comprimento.

No Brasil, os frutos caem entre os meses de março e abril, permanecendo viáveis por alguns meses em água doce ou salobra. Para que ocorra a germinação, a semente necessita de ambiente alagadiço ou úmido. Uma vez estabelecida a germinação, a planta pode sobreviver em altos níveis de salinidade, possuindo, na fase adulta, considerável tolerância a ambientes salinos (Protection, 2004).



**Figura 3. Fruto de *Annona glabra* Linn.** Naturalmente verde, após a queda, torna-se amarelado e, em seguida, escurece.

Fonte: Albion College, 1983, Michigan – EUA.

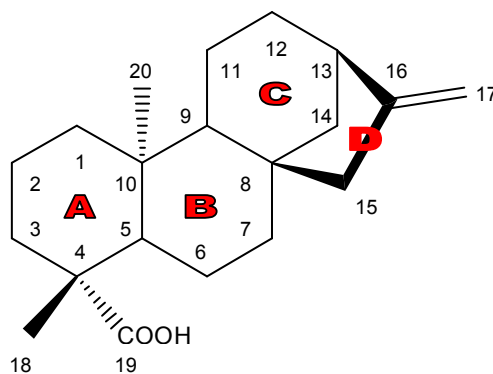
## 1.2. CONSTITUINTES QUÍMICOS E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

A família Annonaceae é quimicamente uma das famílias de plantas tropicais menos estudadas. Entretanto, investigações fitoquímicas e, em menor extensão, farmacológicas sobre membros desta família vêm se intensificando nos últimos anos.

Vários estudos têm demonstrado grande quantidade de compostos de natureza química diversificada nas mais variadas partes da planta. Os principais grupos de compostos químicos presentes em extratos preparados de cascas (Chen *et al.*, 2000), folhas e frutos (Chang *et al.*, 1998) são os alcalóides, as acetogeninas e os diterpenos (Chen *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2002). Na China, por exemplo, a *A. glabra* é amplamente cultivada e utilizada como inseticida e parasiticida (Chen *et al.*, 2004). Nesse contexto, as acetogeninas anonáceas já demonstraram atividades anti-helmíntica, antimalárica, antimicrobiana, antiprotozoária e pesticida, além de ser tóxica para células tumorais (Alali *et al.*, 1999).

Dentre os compostos isolados da espécie, o ácido caurenóico, ou ácido caur-ent-16-en-19-oico, é um dos diterpenos mais estudados, para o qual já foram descritas diversas atividades biológicas, desde inibidor da replicação do vírus HIV em linfócitos (Chang *et al.*, 1998), como agente citotóxico (Chavez *et al.*, 1997; Costa-Lotufo *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004), trypanosomicida (Alves *et al.*, 1995; Vieira *et al.*, 2002), larvicida (Slimestrad *et al.*, 1995), antimicrobiano (Padmaja *et al.*, 1995; Velikova *et al.*, 2000), vermífugo, esporicida (Padmaja *et al.*, 1995), analgésico (Block *et al.*, 1998), contraceptivo (Page *et al.*, 1992), relaxante da musculatura lisa vascular aórtica de ratos (Tirapelli *et al.*, 2004), até como agente antiinflamatório (Paiva *et al.*, 2002).

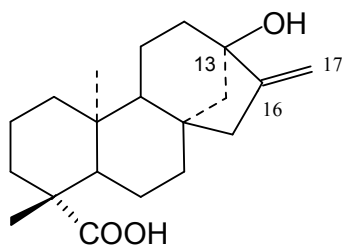
O ácido caurenóico (I) é um dos compostos intermediários envolvidos na biossíntese de vários diterpenos caurenos, que têm em comum uma estrutura constituída por uma unidade peridrofenantreno (anéis A, B e C) ligada, por uma ponte entre C-8 e C-13, a uma unidade ciclopentano (anel D). Este grupo de compostos, por apresentar um amplo espectro de atividades biológicas, revisadas por Ghisalberti (1997) e García e colaboradores (2007), tem sido alvo de uma infinidade de estudos de modificações estruturais no esqueleto caurânico com o objetivo de se obter substâncias bioativas, seja por métodos químicos ou microbiológicos.



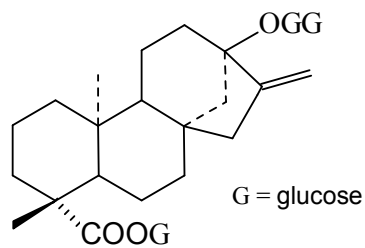
I

O uso de métodos biológicos para transformação de compostos orgânicos tem sido foco de crescente atenção devido às suas vantagens inerentes. O esteviol (II) serve como exemplo desse tipo de transformação. Tendo uma estrutura química muito semelhante ao ácido caurenóico, diferindo deste por ter um grupo hidroxila no carbono 13, muitas atividades biológicas distintas daquelas acima listadas para o ácido caurenóico já foram descritas.

Na *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae), o esteviol é um composto químico intermediário, sintetizado através da via metabólica do ácido mevalônico, a partir do caureno. Dentro do complexo de Golgi, pode ser glicosilado ou ramnosilado para formar edulcorantes, como o esteviosídeo (III), por exemplo (Jarma *et al.*, 2006).



II



III

O esteviol tem sido descrito como substância tóxica, com atividade mutagênica e bactericida em *Salmonella typhimurium* TM-677 (Pezzuto *et al.*, 1985). Inibição da absorção de glicose em intestino de hamster foi também observada após tratamento com esteviol (Toskulkao *et al.*, 1995). Além disso, esteviol e esteviosídeo também têm sido considerados como drogas diuréticas, possuindo atividade vasodilatadora sistêmica que afeta a função renal, induzindo diurese e natriurese (Melis, 1992). Também, como antidiabéticos, por estimularem a secreção de insulina pelo pâncreas (Jeppesen *et al.*, 2000).

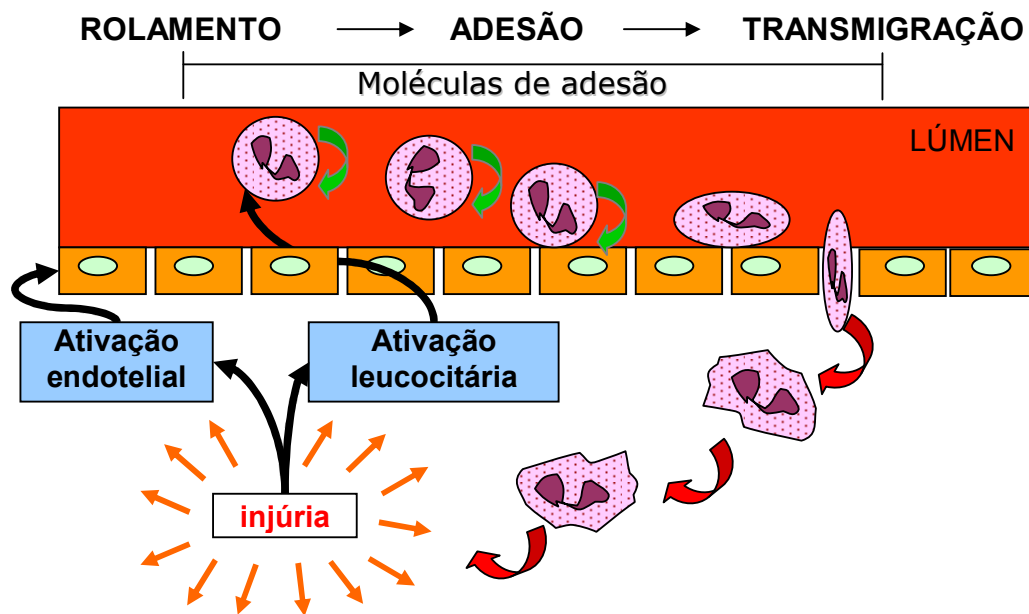
### 1.3. MECANISMOS DE DEFESA

#### 1.3.1. INFLAMAÇÃO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A inflamação é uma resposta de defesa dos tecidos de um organismo a estímulos nocivos ou injúria. Constitui-se de uma série de eventos resultantes de alterações celulares e vasculares. A resposta é geralmente rápida e similar quando o estímulo é de natureza química, física, microbiológica ou imunológica, sendo caracterizada por inchaço e vermelhidão (ou eritema) como resultado de uma transferência de plasma e proteínas do sangue para espaços intersticiais, comumente acompanhado por aumento do fluxo sanguíneo local (hiperemia). Estas são as primeiras reações visíveis, que podem estar seguidas de deposição plaquetária, marginalização dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) nos capilares sanguíneos e subsequente infiltração para os tecidos. Nos estágios mais avançados da inflamação, quando não há eliminação ou supressão do agente causador, o processo torna-se crônico e ocorre também a infiltração de leucócitos mononucleares (MNC), representados por linfócitos e monócitos (Cotran *et al.*, 1994).

A principal função dos leucócitos é a defesa dos tecidos, sendo o sangue sua principal via de transporte. Como esquematicamente ilustrado na Figura 4, um sítio de infecção ou injúria em qualquer tecido rapidamente atrai os leucócitos por meio de uma variedade de sinais moleculares produzidos localmente. Alguns desses sinais moleculares agem sobre os capilares, diminuindo a adesão entre as células endoteliais, ao mesmo tempo em que favorecem a adesão de superfície para passagem dos leucócitos através do endotélio.

Os leucócitos, por sua vez, aderem inicialmente às células endoteliais através de selectinas e, posteriormente, para realizar a diapedese, ligam-se fortemente, mas de forma transitória, às integrinas. Outras moléculas agem como quimioatratoras de tipos específicos de leucócitos, causando sua polarização e seu deslocamento em direção ao sítio inflamatório (Alberts *et al.*, 1994). Dessa forma, pelo menos três etapas estão distintamente envolvidas no desenvolvimento de um processo inflamatório agudo: (1) adesão dos leucócitos ao endotélio, (2) sua passagem através do mesmo e (3) sua migração em direção ao estímulo quimiotático (Dekker *et al.*, 2000; Mackai *et al.*, 2000).



**Figura 4. Eventos leucocitários na inflamação.** Durante o processo inflamatório, os leucócitos são atraídos para a área da lesão por meio de citocinas pró-inflamatórias liberadas localmente. Primeiramente, rolam e aderem-se transitoriamente ao endotélio vascular, ocorrendo, então, a diapedese; em seguida, migram em direção ao local da lesão, onde exercem suas atividades de eliminação do agente causal e cooperam na reparação do tecido lesado.

Das células com grande capacidade de responder a estímulos inflamatórios destacam-se os granulócitos (GNC) circulantes no sangue periférico. Dentre esses, há os PMN, que constituem a população celular primária na defesa aguda contra vários tipos de microorganismos presentes no meio ambiente, acumulando-se rapidamente no sítio de lesão. Sua participação no processo inflamatório é multifuncional e envolve (1) reconhecimento seletivo do agente agressor, (2) resposta apropriada por meio de locomoção, (3) fagocitose do microorganismo e (4) sua subsequente destruição. Para tanto, possuem a habilidade de secretar substâncias não só capazes de retardar a disseminação da infecção, mas, quando necessário, também recrutar outros tipos de leucócitos para o foco infeccioso/inflamatório (Cassatella, 1995).

As citocinas inflamatórias são substâncias químicas circulantes no plasma e importantes mediadores das respostas vascular e celular desencadeadas pelo estímulo inflamatório agudo. Dentre elas, destacam-se as interleucinas 1 (IL-1), 6 e 8, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e o fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (Cassatella, 1995; Springer, 1994).

O neutrófilo é uma célula que participa da defesa inata e, nos tecidos, está presente em todas as portas de entrada do organismo humano que fazem contato com o meio externo. Com um tempo de vida média na circulação de aproximadamente sete horas (Quesenberry *et al.*, 2000), passam a maior parte desse tempo circulando no sangue periférico, num processo passivo.

Em contraste com a reação aguda, a inflamação crônica caracteriza-se por uma maior infiltração de células MNC, incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos, como reflexo de lesão tecidual persistente (Cotran *et al.*, 1994). Dentre essas células, os macrófagos ocupam posição de destaque comparável ao papel principal desempenhado pelos PMN na reação aguda.

Os macrófagos são células que se originam dos monócitos circulantes que, à semelhança dos PMN, são descendentes de progenitores hematopoiéticos presentes na medula óssea (Lee *et al.*, 1999). Após diapedese, os monócitos distribuem-se nos mais diferentes tecidos do organismo dos mamíferos (Reeves *et al.*, 2000), tornando-se macrófagos residenciais. Em contraste com um tempo de vida de cerca de 24 horas para os monócitos circulantes, os macrófagos sobrevivem por vários meses, durante os

quais, ao responderem a vários estímulos, especialmente de citocinas, tornam-se ativados e capazes de exercer inúmeras funções, como proliferação, síntese, armazenamento e secreção de moléculas biologicamente ativas (enzimas proteolíticas, componentes do sistema complemento, fibronectina,  $\alpha_2$ -macroglobulina, prostaglandinas, fatores de crescimento, citocinas etc), atuam como células apresentadoras de antígenos para linfócitos, produzem metabólicos reagentes do oxigênio e outras moléculas importantes para a eliminação de microorganismos (Cotran *et al.*, 1994; Reeves *et al.*, 2000).

#### 1.3.1.1. Adesão celular

Além da resposta inflamatória, o processo de adesão celular ocorre também em vários eventos biológicos, sendo essencial durante a morfogênese, no crescimento, na organização e estabilidade teciduais, na resposta do hospedeiro às infecções, nos processos de cicatrização, assim como na resposta imunocelular.

Organismos multicelulares possuem diferentes tecidos constituídos por células que estão em íntimo contato com uma rede complexa de macromoléculas denominada matriz extracelular (MEC), a qual, além de servir como suporte físico, possui múltiplas funções biológicas (Engel *et al.*, 1991). Dentre elas, destacam-se a de reservatório de diferentes hormônios, que controlam o crescimento e a diferenciação celulares, a de promover uma estrutura em malha na qual as células podem aderir, locomover-se, promover trocas entre si e com o ambiente. É essencial, também, na reorganização da forma do citoesqueleto celular, na migração e na diferenciação durante a embriogênese. Destaca-se na recuperação de lesões e feridas por facilitar a localização de macrófagos e outras células do sistema imunitário na área lesada (Alberts *et al.*, 1994).

A MEC constitui-se de uma combinação de proteínas que variam de acordo com o tecido, tais como colágeno, fibronectinas, laminina, vitronectina, dentre outras, e que interagem por meio de múltiplos sítios de interação (ou domínios), sendo cada um específico para o acoplamento com outras moléculas da matriz ou com receptores circulantes ou presentes na superfície de células (Alberts *et al.*, 1994).

Como já descrito, para alcançar os locais de inflamação, os leucócitos periféricos devem sair da circulação sangüínea e atravessar o endotélio. Para isto, empregam moléculas de adesão (MA), primeiramente, ligando-se ao endotélio vascular e, posteriormente, migrando para dentro dos tecidos adjacentes (Mackai *et al.*, 2000; Springer, 1994). Estes fenômenos são decorrentes da ação de diferentes mediadores inflamatórios, que também induzem as células endoteliais vasculares a expressarem diferentes MA, as quais, por sua vez, interagem com receptores protéicos presentes na superfície dos leucócitos. Estes também são estimulados e, quando ativados, passam a expressar níveis mais elevados de várias MA, as quais se ligam a receptores protéicos expressos na superfície de células endoteliais. Essas interações iniciais são as responsáveis pela "captura" dos leucócitos periféricos circulantes, os quais "rolam" pela superfície interna dos vasos (Lawrence *et al.*, 1991; Mackai *et al.*, 2000).

As MA são, pois, glicoproteínas que medeiam o contato entre duas células ou entre a célula e a MEC, sendo responsáveis pela adesão intercelular, adesão celular ao epitélio e ao endotélio, recrutamento e migração seletiva de células inflamatórias dos vasos sangüíneos até o local da inflamação (Simmons, 1995). Estão agrupadas em quatro superfamílias, as imunoglobulinas, as selectinas, as integrinas e as caderinas, dependendo de suas características moleculares.

As MA pertencentes à família das selectinas são expressas em células endoteliais (E-selectina), plaquetas (P-selectina) e leucócitos (L-selectina) e medeiam os processos envolvidos no rolamento dos leucócitos ao longo da parede do vaso (Lawrence *et al.*, 1991), enquanto as MA da família das integrinas promovem a adesão transitória dessas células ao endotélio (Springer, 1990).

As integrinas são heterodímeros que formam uma classe especial de receptores constituídos por subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , ambas cooperando para a formação dos domínios usados para acoplamento (Hynes, 1987; Hynes, 1992). A maioria das integrinas é expressa em uma ampla variedade de células, ao mesmo tempo em que, a maioria das células expressam alguma integrina. Foram descritas até o momento 8 subunidades  $\beta$  e

14 subunidades  $\alpha$ , de natureza glicoprotéica e na forma de proteoglicanos facultativos (Veiga *et al.*, 1997), cada uma delas, com um segmento transmembrânico hidrofóbico único (Hynes, 1992), com especificidade para componentes da MEC e ligantes da superfície celular (Arnaout, 1990; Burridge *et al.*, 1988; Springer, 1990).

Deve-se ressaltar que cada receptor  $\alpha\beta$  reconhece um ou mais ligantes e a especificidade de ligação de um determinado receptor pode ser marcadamente comprometida pelo ambiente em que ele se encontra ou pelo estado de ativação. Dessa forma, a expressão de uma integrina não necessariamente indica que ela terá um papel funcional na adesão, até mesmo se o seu ligante estiver presente em um contexto disponível. Muitas vezes, precisam ser primeiramente ativadas por mediadores solúveis, como hormônios e particularmente por citocinas, ou por proteínas componentes da MEC (Hynes, 1992; Lampugnani *et al.*, 1997; Springer, 1990) para, então, aumentar sua afinidade e interagir com o ligante.

Neste contexto, no domínio da fibronectina que interage com as integrinas expressas na superfície celular, há a seqüência tripeptídica arginina-glicina-ácido aspártico, conhecida como seqüência RGD, responsável pelo acoplamento da fibronectina às integrinas  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_{11b}\beta_3$  e  $\alpha_v\beta$ , sendo que a seqüência ácido glutâmico-isoleucina-leucina-asparagina-valina (EILDV) interage especificamente com a integrina  $\alpha_4\beta_1$ , enquanto asparagina-glicina-ácido glutâmico-alanina (DGEA) acopla-se a integrina  $\alpha_2\beta_1$  (Doherty *et al.*, 1990).

#### 1.3.1.2. Quimiotaxia

Além da função adesiva, os leucócitos têm função quimiotática. A quimiotaxia caracteriza-se por ser um movimento celular direcional a favor ou contra um gradiente químico e é comum a várias células eucarióticas. No caso particular dos leucócitos, é o mecanismo pelo qual estas células se acumulam no sítio inflamatório. Este fenômeno implica uma série sucessiva de eventos que se iniciam com a polarização celular, fixação ao substrato e retração do corpo celular. Todos esses eventos dependem da dinâmica do citoesqueleto de actina que se organiza em resposta ao sinal recebido (Wilkinson, 1996).

Os atratores químicos são, em geral, moléculas pequenas e solúveis que reconhecem e se ligam a receptores transmembrânicos específicos, via proteína G, localizados na superfície dos leucócitos. O sinal quimiotático liberado dessa interação é o AMPc (adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico), mensageiro intermediário que ativa vias específicas com conseqüente aumento da polimerização de actina, produzindo filamentos ramificados (F-actina) na linha de frente, em direção ao sinal. Esta polimerização localizada empurra a membrana celular para frente, acompanhada de contração do pólo posterior, a qual é mediada pela proteína motora miosina II (Chung *et al.*, 2001). Na sua forma molecular monomérica, a actina é solúvel, mas quando polimerizada produz filamentos insolúveis de considerável força mecânica. As miosinas interagem com filamentos de actina e convertem a energia química do ATP (adenosina trifosfato) em trabalho mecânico, resultando na tração e movimento celular.

Portanto, como resultado da ativação de receptores quimioatratores, os neutrófilos são estimulados a mover-se, rearranjar seu citoesqueleto e, por fim, fagocitar microorganismos. Além disso, freqüentemente ocorre degranulação e ativação da NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase, gerando metabólitos tóxicos do oxigênio (Bokoch, 1995).

As substâncias capazes de induzir quimiotaxia, denominadas quimioatratoras, não constituem uma classe específica de compostos e podem ter natureza exógena ou endógena. Dentre as substâncias exógenas que provocam alterações no comportamento locomotor dos leucócitos encontram-se alguns produtos de bactérias, como os peptídeos *N*-formilados (*f*-MLP) (Johansson *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 1995; Rabgaoui *et al.*, 1994); certos agentes opióides como a caseína (Lewis *et al.*, 1983; Rabgaoui *et al.*, 1994; Siddiqui *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Wilkinson, 1974; Wilkinson, 1988), alguns derivados de bactérias como os lipopolissacarídeos (LPS) (Qu *et al.*, 1995) e proteínas desnaturadas (Wilkinson, 1988). Dentre as substâncias endógenas, as mais conhecidas são as citocinas, que, de modo geral, são capazes de estimular todos os tipos de leucócitos do sangue. Destas, destacam-se a IL-8, o TNF- $\alpha$ , o interferon gama, além de componentes do sistema complemento, como as frações C3a e C5a, os produtos relacionados a lipoxigenação do ácido araquidônico (leucotrienos), particularmente o LTB<sub>4</sub>, e o fator de ativação

plaquetário (PAF) (Bokoch, 1995; Cotran *et al.*, 1994; Johansson *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 1983; Siddiqui *et al.*, 1999; Wilkinson *et al.*, 1988).

### 1.3.2. O SISTEMA IMUNITÁRIO

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

Outro fator que colabora para a ativação do sistema imunitário adaptativo é a reincidência da agressão pelo mesmo agente, pois uma característica específica deste sistema é a produção de uma memória imunológica a partir da primeira infecção (Parham, 2001).

#### 1.3.2.1. Células do sistema imunitário adaptativo

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

##### 1.3.2.1.1. Linfócitos

Principais células responsáveis pela resposta imunológica adaptativa, no ser humano, as células da linhagem linfóide, antes de se tornarem células maduras e capazes de exercer funções específicas, passam por processos sucessivos de aquisição de imunocompetência no timo ou na própria medula óssea, denominados órgãos linfóides primários. Aqueles que requerem um período de diferenciação no timo são denominados linfócitos T, enquanto os

que continuam a se 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. A fase de desenvolvimento dos timócitos envolve um exame crítico de receptores produzidos. Desta forma, a seleção positiva envolve células T que podem reconhecer peptídeos apresentados por moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (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.

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).

O encontro com um antígeno específico provoca a fase final do desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos T, onde as células T-CD8 tornam-se células T citotóxicas para as células que expressam esses antígenos protéicos, enquanto as células T-CD4, sob influência de citocinas, tornam-se células T auxiliares subtipos 1 ou 2 (Ta1 e Ta2, respectivamente), sendo que o tipo celular que predominará dependerá do patógeno e do tipo de resposta imunológica requerida (Parham, 2001).

Em contraste com os linfócitos T, os linfócitos B no sangue periférico, representam de 5 a 15% da população circulante. Sua ativação por antígenos protéicos requer a presença de linfócitos T, a qual é facilitada pela expressão de moléculas classe II do sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*); os antígenos de natureza lipídica, glicolipídica ou constituídos de proteínas polimerizadas ou carboidratos estimulam as células B diretamente, as quais sofrem transformação blástica, originando os plasmócitos, células responsáveis pela produção de diferentes classes de imunoglobulinas mediadoras da imunidade humoral.

### 1.3.2.1.2. Macrófagos

Os macrófagos fazem parte do sistema fagocitário mononuclear que se constitui de células de origem medular, incluindo os monócitos que trafegam no sangue periférico e os macrófagos tissulares. Dependendo do tecido ou órgão onde se encontram, recebem diferentes nomes, como as células de Kupffer do fígado, os histiócitos dos linfonodos, os macrófagos alveolares e os esplênicos, quando nos pulmões e no baço, respectivamente. Da circulação, os monócitos 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 *et al.*, 2000).

A ativação dos macrófagos é um processo que culmina com o aumento do seu tamanho, elevação dos níveis de enzimas lisossomais, metabolismo ativo e grande habilidade de fagocitar e matar microorganismos, sendo assim 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, os macrófagos passam a sintetizar e secretar várias moléculas biologicamente ativas, coletivamente chamadas citocinas, que são importantes mediadores das respostas inflamatórias e imunológicas (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 desenvolvimento de resistência.

Como célula apresentadora de antígeno, os macrófagos têm a capacidade de reconhecer e, subseqüentemente, 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 IL-1 e o TNF- $\alpha$ , capazes de amplificar as respostas inflamatória 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).

#### 1.3.2.2. *Interação de linfócitos e antígenos*

Os eventos celulares que decorrem da ativação de um linfócito são denominados coletivamente de transformação blástica 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 interleucinas. Os linfócitos T-CD8, após contato com o antígeno, ativam-se e proliferam, originando também células capazes de produzir grandes quantidades de citocinas, que são secretadas para a eliminação do agente agressor.

No caso de linfócitos B, após transformação, muitos proliferam, dando origem aos plasmócitos, células 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 resposta imunológica secundária rápida e vigorosa (Reeves *et al.*, 2000).

#### 1.3.2.3. *Ativação e proliferação de linfócitos*

A ativação de linfócitos decorre da interação entre um antígeno e o receptor presente na superfície celular com o qual ele pode interagir. Em células T-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 subseqüentes, que ocorrem em segundos ou minutos após a interação ligante-receptor, incluem mudanças no fluxo de cátions monovalentes ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) e a ativação de metiltransferases. Ao mesmo tempo, síntese e utilização de fosfolipídeos aumentam, envolvendo fosfatidil inositol, um constituinte dos fosfolipídeos de membrana.

O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é central na ativação de linfócitos e ocorre em menos de cinco minutos após interação com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA), por exemplo, com receptores presentes na superfície de linfócitos humanos. Algumas horas após a interação ligante-receptor, a síntese de proteínas aumenta, alcançando um pico entre 48 e 72 horas. Neste período, ocorre aumento da síntese de ácido ribonucléico (ARN), assim como há a síntese de várias proteínas (Cooper, 1972). O conteúdo de ARN em linfócitos dobra em 48 horas e reflete-se em alterações morfológicas distintas da célula. Finalmente, aumento da síntese de ácido desoxirribonucléico (ADN), a marca registrada da proliferação celular, inicia-se após cerca de 36 horas, atingindo níveis máximos entre 48 e 72 horas (Greaves *et al.*, 1972).

Para que a proliferação celular ocorra, fatores de transcrição, que são ativados simultaneamente à interação ligante-receptor, representam intermediários essenciais, os quais traduzem e direcionam sinais extracelulares em respostas transcricionais específicas. A regulação combinada da transcrição envolve complexos multiprotéicos que se ligam de forma cooperativa a regiões específicas do ADN alvo. Esta interação permite a convergência de diferentes sinais para uma região definida do ADN, 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 (fator nuclear de células T ativadas), por exemplo, junto com proteínas AP-1 (fator de ativação proteína 1) e ras, integram vias de sinalização dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , as quais regulam a expressão de genes que codificam proteínas imunomodulatórias como IL-2, IL-4, IL-3/GM-CSF, TNF- $\alpha$ , CD40 e Faz (Feske *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 1997; Trama *et al.*, 2000).

A replicação de linfócitos T é muito particular e é determinada pela interação de IL-2 com seus receptores (IL-2-R) em níveis significativos para desencadear esta ação. Entretanto, células T não expressam IL-2-R a menos

que sejam estimuladas por antígenos, anticorpos monoclonais específicos para células T, lectinas mitogênicas ou forbol éster, por exemplo. Além disso, uma vez exposta a esses agentes, cada célula T expressa IL-2-R de forma individual, entrando em fases proliferativas do ciclo celular de forma assíncrona. Se níveis de IL-2 não se mantiverem contínuos, a expressão de IL-2-R se mantém, mas a síntese de ADN não ocorre, uma vez que é a interação com IL-2-R o fenômeno crucial para que ocorra a replicação do ADN (Cantrell *et al.*, 1984).

Um outro ponto de relevância é que a expressão de IL-2-R é dependente da presença de antígeno e a retirada do estímulo do meio leva à 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 G<sub>0</sub> do ciclo celular, mesmo na presença de concentrações saturantes de IL-2 (Smith *et al.*, 1985).

#### 1.3.2.4. 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; Janossy *et al.*, 1972; Oppenheim *et al.*, 1976). A Tabela 1 mostra uma seleção dessas substâncias e sua especificidade com referência à população estimulada.

Enquanto a resposta dos linfócitos a antígenos *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 blástica e, posteriormente, proliferar.

Diferente do que acontece *in vivo*, esse estímulo à proliferação não depende de células apresentadoras de antígenos, embora os mesmos mecanismos bioquímicos estejam aparentemente envolvidos (Burgermeister *et al.*, 2003). Esta propriedade favorece estudos experimentais e, Fitohemaglutinina (PHA) e Concanavalina A (ConA), lectinas extraídas e purificadas de plantas 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).

**Tabela 1. Mitógenos: características e células alvo.**

Mitógeno	Fonte	Tamanho molecular (D)	Células Alvo	Espécie(s)
Concanavalina A (Con A)	<i>Canavalia ensiformis</i>	55.000	Linfócitos T	humana, camundongo
Fitohemaglutinina (PHA)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	140.000	Linfócitos T	humana, camundongo
Lipopolissacarídeo (LPS)	Bactérias gram negativas	1 – 24 x 10 <sup>6</sup>	Linfócitos B	roedores
Pokeweed mitogen (PWM)	<i>Phytolacca americana</i>	32.000	Linfócitos T e B	humana e camundongo
Dextran sulfato	-	500.000	Linfócitos B	-

Adaptado de 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 fosfolipases C<sub>γ</sub> e A<sub>2</sub>, proteína quinase C (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 pró-mitóticos. Estes, por sua vez, conduzem os eventos da proliferação e de síntese de IL-2, a qual é o principal mediador químico da amplificação da resposta imunológica (Cooper, 1972; Feske *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1985; Trama *et al.*, 2000).

São várias as metodologias *in vitro* utilizadas para quantificar a ativação e a proliferação celulares. Dentre elas destacam-se os ensaios tradicionais, que incluem a incorporação de nucleotídeos radioativos (Brunner *et al.*, 1968; Gillis *et al.*, 1978), a redução de sais tetrazólio (Mosmann, 1983), a incorporação de agentes fluorescentes (Lyons, 2000), a incorporação de análogos de pirimidina (Kubbies *et al.*, 1985) e a análise por citometria de fluxo (Shapiro, 1985).

Recentemente, a citometria de fluxo foi relatada como um instrumento útil na avaliação de efeitos imunomoduladores sobre linfócitos humanos de produtos naturais (Machado Jr. *et al.*, 2006), particularmente extratos de plantas medicinais. Os resultados emitidos por um citômetro de fluxo são 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 representará ou traduzirá os resultados obtidos.

#### 1.4. PLANTAS MEDICINAIS COMO AGENTES PROMOTORES DA SAÚDE

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 *et al.*, 2001).

Esta preocupação parece estar presente em nosso país, pois como fruto de deliberações ocorridas já na 10ª Conferência Nacional de Saúde realizada em Brasília em 1996, ressaltou-se, no parágrafo 286.12 do Relatório Final, ... “a incorporação no SUS, em todo o país, de práticas de saúde como a fitoterapia, a homeopatia e a acupuntura”..., deliberando-se também, no parágrafo 351.10, sobre ...“terapias alternativas e práticas populares, além do incentivo a fitoterapia e à 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 *et al.*, 2001), representando, no mundo, cerca de 30% das vendas de drogas (Grabley *et al.*, 1999).

#### 1.5. PLANTAS MEDICINAIS COMO AGENTES ANTIINFLAMATÓRIOS, IMUNOMODULADORES E ANTI-TUMORAIS

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 antiinflamatórias e imunomodulatórias, devido ao crescente número de espécies vegetais utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças que comprometem o sistema imunitário (Yamaguchi, 1992), aquelas associadas ao câncer (Mans *et al.*, 2000) e estados inflamatórios (Wagner, 1989).

Neste contexto, um número cada vez maior de plantas tem sido utilizado na medicina tradicional pela sua eficiência em atenuar ou mesmo eliminar os efeitos indesejáveis da resposta inflamatória e como moduladoras da resposta imunomodulatória. Estudos mais aprofundados, com o objetivo de descrever novos agentes terapêuticos, têm revelado diferentes grupos de metabólitos secundários de natureza química variada como alcalóides, flavonóides, saponinas, taninos e lectinas como agentes protagonistas de relevantes atividades biológicas (Balunas *et al.*, 2005; Buss *et al.*, 1995)

Paralelamente, a utilização de plantas medicinais para obtenção de drogas anti-tumorais tem sido um importante caminho para descoberta de novas aplicações clínicas baseadas nos estudos dos metabólitos secundários e seus derivados (Balunas *et al.*, 2005).

Para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade anti-tumoral é necessário um melhor entendimento da dinâmica do câncer, principalmente no que diz respeito à cinética de crescimento tumoral, à angiogênese, à heterogeneidade celular e aos mecanismos de invasão e metástase.

Dentro deste contexto, as plantas têm se mostrado como importante fonte de agentes anti-tumorais, onde atualmente 60% desses agentes foram obtidos de recursos naturais, incluindo plantas, organismos marinhos e microorganismos (Cragg *et al.*, 2005; Newman *et al.*, 2003). Interessante notar que as formas jovens do microcamarão *Artemia salina* têm sido utilizadas como organismos alvo para detectar compostos bioativos em extratos de plantas e a toxicidade deste crustáceo tem demonstrado correlação com atividades anti-tumoral (Colombo *et al.*, 2001; Garcez *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2002; Shiomi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 1999) e anti-plasmodial (Solis *et al.*, 1993).

*Artemia salina* é um micro-crustáceo marinho da subclasse dos Anostráceos, que apresenta de 8 a 13 mm de comprimento na forma adulta e, quando recém eclodido dos cistos, apenas uma fração de milímetros, sendo esta forma denominada náuplio. Por conta de suas reservas energéticas em meio adequado, ou seja, salinidade marinha correspondendo a 3,5 g% de NaCl à 28°C, possui intensa atividade natatória, que se estende por mais de uma semana.

O Teste de Letalidade para náuplios de *A. salina* (Michael *et al.*, 1956) é um teste universalmente aceito para detecção de toxinas em fungos, em plantas, em cianobactérias, além de metais pesados e pesticidas (Carballo *et al.*, 2002). Os valores de CL<sub>50</sub>, ou seja, a concentração da substância em estudo capaz de matar ou inviabilizar 50% da população inicial de náuplios, servem de guia para ensaios posteriores de maior sofisticação, como aqueles que utilizam linhagens celulares para avaliação de drogas anticâncer como acima referido.

O potencial biológico de extratos de plantas nativas e seus derivados identificados e isolados são de grande importância, principalmente para países como o Brasil, que têm despertado política e cientificamente para a exploração de suas potencialidades naturais, e ainda depende da indústria multinacional, muitas vezes, pagando um custo muito alto que poderia certamente ser minimizado através do uso de substâncias naturais nacionais.

Atualmente, as ciências médicas buscam vários tratamentos, drogas e meios de amenizar, controlar e curar as mais diversas desordens orgânicas, físicas e psíquicas do ser humano. Como as propriedades biológicas do extrato de *A. glabra*, assim como do ácido caurenóico dele purificado, sobre diferentes sistemas biológicos não são completamente conhecidas, almeja-se com este trabalho investigar seu potencial tóxico, antiinflamatório, imunomodulador e sobre a adesão de células tumorais, contribuindo para ampliar os conhecimentos farmacológicos sobre a planta e seus compostos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar as atividades biológicas *in vitro* do extrato de *Annona glabra* Linn. e do ácido caurenóico dele purificado em diferentes sistemas.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar:

- sua toxicidade sobre leucócitos humanos
- seus efeitos sobre a quimiotaxia de granulócitos
- sua capacidade de induzir resposta imunomoduladora sobre linfócitos em seu estado basal e estimulados por fitohemaglutinina
- seus efeitos sobre a viabilidade do microcrustáceo *Artemia salina*
- seus efeitos sobre a viabilidade, a adesão de células HEp-2 e a expressão das integrinas  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. SOLUÇÕES

Os sais e reagentes utilizados neste trabalho são de procedência Merck, Sigma ou Reagen, salvo indicação contrária. Para o preparo das soluções, utilizou-se água obtida pelo sistema Puritech / Permuton. As soluções foram preparadas e em seguida esterilizadas (1) por calor úmido (autoclavação a 121 °C, 30 min, 1 atm) ou (2) por filtração (0,22 µm – Acrodisc) e, posteriormente, armazenadas em temperaturas apropriadas para sua conservação (temperatura ambiente – T.A., 4 a 8 °C ou a –20 °C), ao abrigo de luz, conforme indicado. Os ensaios realizados em condições de esterilidade foram manipulados em câmara de fluxo laminar vertical TROX modelo FLVQ TAM 12.

##### 3.1.1. *Solução salina fisiológica*

Cloreto de sódio 150 mmol/l em água.

##### 3.1.2. *Solução salina tamponada com fosfatos (PBS)*

A solução tampão foi preparada dissolvendo-se  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (150 mmol/l),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (150 mmol/l) e NaCl (154 mmol/l) em água. Após ajuste do pH para 7,2–7,4 com solução de NaOH 1 N, procedeu-se a esterilização por autoclavação e armazenamento a 4 – 8 °C.

##### 3.1.3. *Solução de cristal violeta a 1,0% (p/v)*

Cristal violeta, na proporção de 1:100 em água.

##### 3.1.4. *Solução de azul de tripano a 0,4% (p/v)*

Azul de tripano em solução salina tamponada com fosfatos.

##### 3.1.5. *PBS suplementado (PBSS)*

PBS foi suplementado, em condições assépticas, na hora do uso, com soro albumina bovina (BSA) 0,25% (p/v), glucose 0,1% (p/v),  $\text{CaCl}_2$  (0,9 mmol/l) e  $\text{MgCl}_2$  (0,5 mmol/l).

### *3.1.6. Solução hemolisante de Gey*

Solução A:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (654,20 mmol/l),  $\text{KCl}$  (24,83 mmol/l),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (6,53 mmol/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,88 mmol/l), glucose (27,77 mmol/l), vermelho de fenol (0,05 g/l). Solução B:  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2,06 mmol/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,56 mmol/l),  $\text{CaCl}_2$  (3,42 mmol/l). Solução C:  $\text{NaHCO}_3$  (26,78 mmol/l). O pH de cada solução foi ajustado para 7,2 – 7,4 com solução de  $\text{NaOH}$  1 N e os reagentes foram conservados a 4 °C. No momento do uso, a solução hemolisante foi preparada na proporção de 4:1:1:14 para as soluções A, B, C e água, respectivamente.

### *3.1.7. Meio RPMI 1640*

RPMI 1640 (Gibco®) em pó foi dissolvido em água conforme instruções do fabricante e suplementado com 3 g/l de bicarbonato de sódio. O meio foi, então, esterilizado por filtração, usando-se o sistema a vácuo Sterifil, Millipore, com filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

### *3.1.8. Meio RPMI suplementado com 10% (v/v) de soro humano*

No momento 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.

### *3.1.9. Meio RPMI suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino*

No momento do uso, soro fetal bovino adquirido comercialmente, foi acrescentado ao meio RPMI 1640, na proporção de 1:10, em condições de esterilidade.

### *3.1.10. Meio com fitohemaglutinina (M-PHA)*

Meio para cariótipo comercial (Cultilab, Campinas/SP), contendo PHA em RPMI 1640, HEPES e soro fetal bovino foi conservado à temperatura de -20 °C e ao abrigo de luz, conforme instruções do fabricante e descongelado somente na hora do uso.

### *3.1.11. Solução de $\text{H}_2\text{SO}_4$ 1% (v/v)*

Ácido sulfúrico P.A., na proporção de 1:100 em água.

### 3.1.12. Solução de caseína a 5% (p/v)

Caseína em pó foi dissolvida em PBS (50mg/ml) e aquecida a 56 °C por 10 min. A solução foi resfriada rapidamente a 4 °C, centrifugada a 1300 x g por 5 min para remoção de partículas insolúveis, fracionada em alíquotas e armazenada à temperatura de -20 °C, sendo descongelada apenas na hora do uso.

### 3.1.13. Água do mar sintética (Fontana et al., 1998)

Solução contendo NaCl (26,30 g/l), KCl (0,75 g/l), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (1,47 g/l), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (5,10 g/l), NaBr (0,21 g/l), NaHCO<sub>3</sub> (0,21 g/l) e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (6,20 g/l), com pH 8,1, ajustado com solução de NaOH 1 N, e conservada à temperatura ambiente.

### 3.1.14. Solução de Tripsina a 0,25% (v/v)

Tripsina (Worthington Biochemical Corporation), 195 unidades/mg de proteína, foi dissolvida na proporção de 1:400 em PBS e esterilizada por filtração.

## 3.2. MATERIAL BOTÂNICO

As amostras de *Annona glabra* foram coletadas nas proximidades de Antonina, Paraná, durante o mês de abril de 1997, e identificadas pelo Professor Olavo Guimarães, Departamento de Botânica da UFPR. Uma exsicata, sob o número de identificação UPCB 40.105, encontra-se depositada no herbário da UFPR. Cascas do caule foram utilizadas para obtenção do extrato e para o isolamento do ácido caurenóico. O esteviol foi obtido através de hidrólise ácida de esteviosídeo extraído de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Todos os procedimentos de obtenção do extrato e isolamento do ácido caurenóico e esteviol foram realizados pelo Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFPR, e gentilmente cedidos para este estudo pelo Professor Dr. Brás Heleno de Oliveira.

## 3.3. OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS HUMANOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, sob registro CEP/SD 039.SI.003/04-01, em abril de 2004 (ANEXO A). Para obtenção de sangue periférico de voluntários sadios,

foi realizado punção venosa e as amostras foram acondicionadas em frascos estéreis contendo heparina sódica (Vacuette – Greiner Bio-one).

### 3.3.1. Separação das populações de leucócitos humanos

As células mononucleares (MNC: linfócitos e monócitos) foram separadas dos granulócitos (GNC: polimorfonucleares, eosinófilos e basófilos) por meio de centrifugação em condições de esterilidade, usando-se o gradiente de densidade *Ficoll-Paque™ PLUS* 1,077 g/cm<sup>3</sup> (Amersham, Biosciences). Após centrifugação a 200 x g por 10 min a T.A., o plasma rico em plaquetas foi retirado e o volume original reconstituído com PBS. Nova centrifugação a 800 x g por 25 min permitiu a separação do creme leucocitário, que foi submetido ao gradiente de densidade. Após centrifugação de 200 x g por 30 min à T.A., os MNC recuperados da interface do gradiente foram lavados duas vezes com PBS (800 x g por 5 min), ressuspensos em RPMI suplementado com 10% (v/v) de soro humano e a concentração ajustada para 10<sup>6</sup> células/ml, após contagem em hemocítmetro de Neubauer. Os granulócitos recuperados do sedimento, após lise dos eritrócitos com solução hemolisante de Gey, foram lavados duas vezes com PBS, ressuspensos em PBS suplementado, enumerados com o auxílio de um hemocítmetro e sua concentração igualmente ajustada para 10<sup>6</sup> células/ml.

### 3.4. VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE SOBRE LEUCÓCITOS HUMANOS

A viabilidade dos leucócitos foi avaliada após o processo de isolamento e durante todas as etapas dos procedimentos metodológicos. Para tanto, usou-se o teste com azul de tripano (Merchant *et al.*, 1964). Populações de leucócitos isoladas como descrito anteriormente foram diluídas apropriadamente em solução de azul de tripano 0,4% e sua viabilidade observada ao microscópio óptico (Olympus CH30). As células discriminadas como viáveis apresentaram-se íntegras, brilhantes, incolores e redondas, enquanto que as não viáveis mostraram-se coradas em azul, muitas com perda da definição de contorno. A toxicidade do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre leucócitos humanos foi avaliada usando-se concentrações crescentes de cada tratamento (0,01 a 100 µg/ml, de 0,01 a 100 µM e de 0,001 a 10 µM, respectivamente). Para MNC, as amostras foram

incubadas por 5 dias, a 37 °C, em atmosfera de 5-10% de CO<sub>2</sub>. Para GNC, as amostras foram incubadas a 37 °C, por 2 e 5 horas.

### 3.5. PREPARO DE CITOCENTRIFUGADOS

Para observação da composição das frações celulares ensaiadas, lâminas contendo  $8 \times 10^4$  células das suspensões leucocitárias foram preparadas por centrifugação a  $250 \times g$  por 5 min em T.A., sob baixa aceleração, em citocentrífuga Cytopro™ (Wescor). Em seguida, as lâminas secas ao ar e fixadas por 10 min em metanol foram coradas com May-Grünwald-Giemsa e finalmente diferenciadas e enumeradas com auxílio de um microscópio óptico. Fotografias foram obtidas usando-se o programa IMAGE PRO PLUS, versão 3.0.01.00 para Windows, acoplado ao microscópio.

### 3.6. COLORAÇÃO DE MAY-GRÜNWARD-GIEMSA

Citocentrifugados secos ao ar e fixados em metanol foram recobertos completamente com corante de May-Grünwald 0,3% em metanol por 3 min; posteriormente, foi adicionado água destilada tamponada (pH 6,8) sobre a lâmina por 1 min. Em seguida, as lâminas foram recobertas com corante de Giemsa diluído em água tamponada (1:20) por 15 min, lavadas em água corrente e secas ao ar.

### 3.7. ENSAIO DE QUIMIOTAXIA DE GRANULÓCITOS

A quimiotaxia dos granulócitos foi observada em câmaras de Boyden. Granulócitos humanos ( $2 \times 10^5$  células) separados por gradiente de densidade e ressuspensos em PBSS (200 µl) foram adicionados ao compartimento superior da câmara de Boyden e estimulados a migrar contra gradientes de concentrações crescentes do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol (0,01 a 100 µg/ml, de 0,001 a 1 µM e de 0,001 a 0,1 µM, respectivamente) depositado no compartimento inferior. Filtros de policarbonato isentos de polivinilpirrolidona (Nuclepore, Neuroprobe), com poros de 5 µm de diâmetro, foram usados para separar os compartimentos. As câmaras foram, então, incubadas a 37 °C por 90 min e o número de leucócitos que migraram ativamente para o compartimento inferior foram enumerados com o auxílio de um hemocitômetro. O monitoramento da migração espontânea dos leucócitos

(controle) foi realizado com adição de PBSS no compartimento inferior da câmara. Como controle positivo da migração celular usou-se caseína 5% (p/v). Os resultados estão expressos como a porcentagem média de células recuperadas do compartimento inferior das câmaras em relação aos resultados obtidos para a caseína (controle positivo).

### 3.8. ENSAIO DE IMUNOMODULAÇÃO

Para avaliar os efeitos imunomodulatórios, células MNC ( $10^6$  células/ml) foram incubadas em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro humano e na presença de concentrações crescentes de extrato de *A. glabra* (0,01 a 100 µg/ml), de ácido caurenóico e de esteviol (0,001 a 1 µM), em placas estéreis de 96 cavidades (TPP), a 37 °C, por 5 dias, em atmosfera de 5 a 10% de CO<sub>2</sub>. Em alguns experimentos, adicionou-se 10% (v/v) do Meio para Cariótipo enriquecido com fitohemaglutinina (Cultilab-Campinas/SP) à mistura. Cada ensaio foi realizado em triplicata e, como resultado de cada experimento, utilizou-se a média da triplicata.

#### 3.8.1. Ativação e proliferação de linfócitos avaliada por citometria de fluxo

Após incubação, as células MNC foram transferidas para tubos de ensaio apropriados e analisadas em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur, Becton & Dickinson, equipado com laser de Argônio (488 nm) e detectores de dispersão para tamanho e complexidade interna. Para cada análise, eventos foram adquiridos por 45 segundos, na velocidade média, em escala linear, e gráficos baseados no tamanho (FSC - *forward light scatter*) e na complexidade interna (SSC - *side light scatter*) das células foram construídos. Delineou-se regiões discriminatórias para as populações de linfócitos (R1) e de blastos (R2). Os dados foram analisados usando-se o programa WinMDI 2.8. O índice de transformação blástica (TB) foi avaliado usando-se a média aritmética das triplicatas (X) dos valores obtidos, como a seguir:

$$TB = \frac{(n^{\circ} \text{ de células presentes em R2} - n^{\circ} \text{ de células presentes em R1})}{n^{\circ} \text{ de células presentes em R2}}$$

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

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

### 3.8.2. Ativação de linfócitos avaliada morfológicamente

A morfologia das células após o período de incubação foi observada para os diferentes grupos em citocentrifugados corados com May-Grünwald-Giemsa usando-se microscopia óptica de imersão. Linfócitos foram reconhecidos por seu aspecto morfológico característico, apresentando-se como células arredondadas, pequenas, com elevada relação núcleo-citoplasmática, citoplasma geralmente escasso, de coloração azul, ausência de granulação específica, núcleo arredondado, com cromatina densa, com agregados irregulares e eventual presença de estruturas semelhantes a nucléolos, porém mal definidos. Linfócitos transformados pela ação da fitohemaglutinina foram considerados como blastos ou linfoblastos e identificados como células maiores do que linfócitos não-ativados, citoplasma azul intenso, geralmente vacuolizado, com complexo de Golgi desenvolvido, definido como uma área não corada ao redor do núcleo; cromatina delicada, presença de dois ou mais nucléolos visíveis, proeminentes e delineados (Lee *et al.*, 1999).

## 3.9. TESTE DE LETALIDADE PARA NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

### 3.9.1. Eclosão dos cistos de *Artemia salina*

Cistos de *Artemia salina*, armazenados em geladeira a 4 °C, foram transferidos para solução de água do mar sintética e mantidos em aeração contínua durante o período de eclosão (48 e 72 horas), com iluminação lateral constante, à temperatura de 28 °C. Os cistos viáveis liberam náuplios que possuem fototropismo positivo e intensa atividade natatória, acumulando-se nas margens mais iluminadas do recipiente.

### 3.9.2. Ensaio de letalidade dos náuplios

Em tubos de hemólise contendo concentrações crescentes de extrato de *A. glabra*, ácido caurenóico ou esteviol (20 a 100 µg/ml) em volume máximo de 2 ml de água do mar sintética, foram adicionados exatamente 10 náuplios por tubo, os quais foram transferidos para a superfície de um transiluminador de luz branca. Após 24 horas, com auxílio de lupa, os náuplios viáveis, ou seja, com movimento natatório, foram enumerados.

### 3.9.3. Concentração letal em 50% dos náuplios (CL<sub>50</sub>)

CL<sub>50</sub> é a concentração de uma substância capaz de matar ou inviabilizar 50% dos náuplios em solução. Para o cálculo da CL<sub>50</sub> foi utilizado o programa PROBIT a partir de cinco diferentes concentrações ensaiadas para o extrato de *A. glabra*, o ácido caurenóico e o esteviol. Cada ensaio foi realizado em triplicata e, como resultado de cada experimento, utilizou-se a média da triplicata.

## 3.10. ENSAIO COM CÉLULAS HEp-2

### 3.10.1. Manutenção de células HEp-2

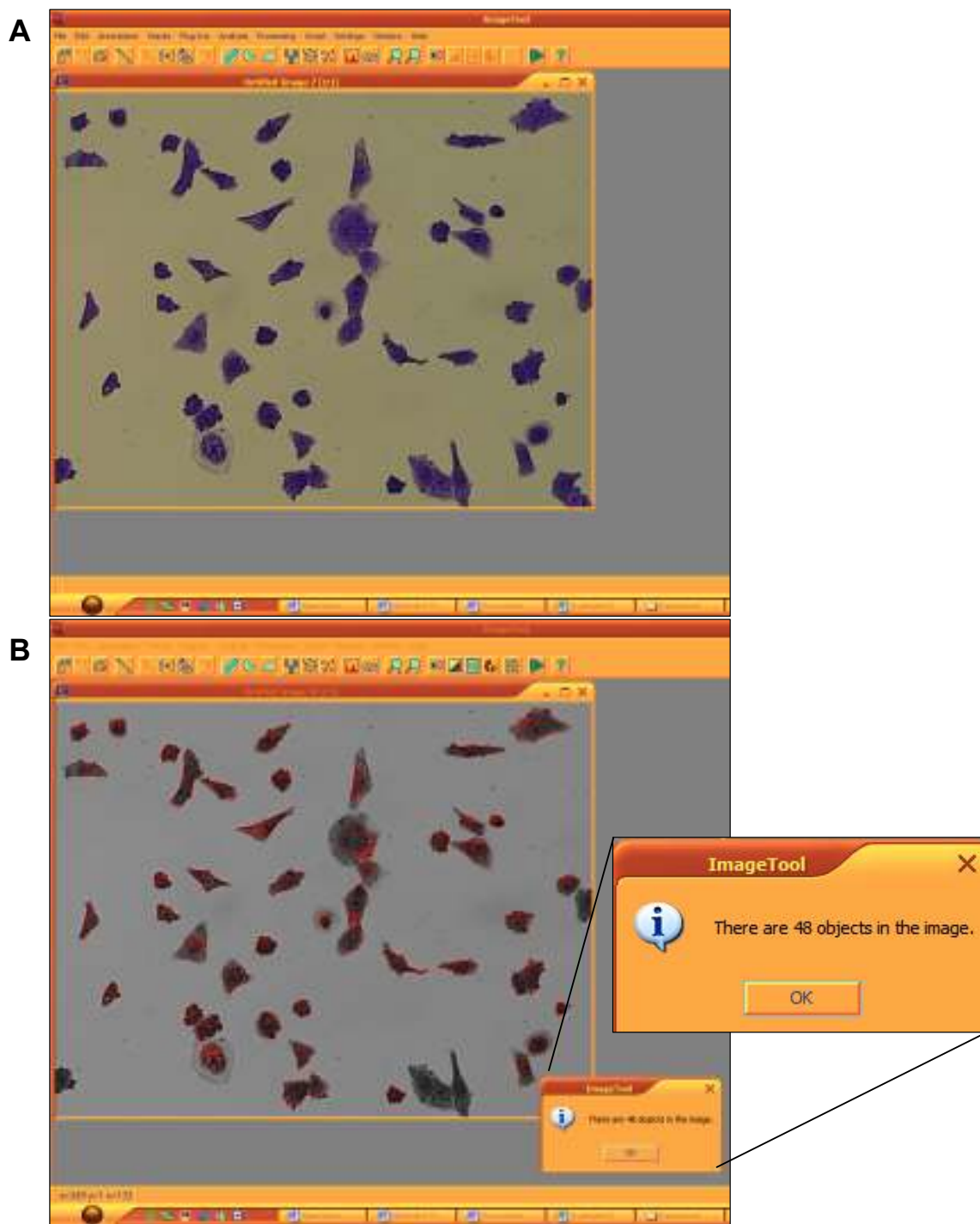
Células de carcinoma epidermóide de laringe humana, ou HEp-2 (ATCC CCL23), cedidas gentilmente pelo Setor de Virologia do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFPR, foram cultivadas em monocamada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino. A cada 4-6 dias, 10<sup>5</sup> células/ml foram subcultivadas em frascos estéreis de 25 cm<sup>2</sup> (TPP) após tripsinização, a 37 °C, em atmosfera de 5-10% de CO<sub>2</sub>.

### 3.10.2. Viabilidade e citotoxicidade

A viabilidade das células HEp-2 foi avaliada com azul de tripano usando-se o mesmo procedimento descrito para leucócitos humanos. Os efeitos tóxicos do extrato de *A. glabra* (0,01 a 10 µg/ml), do ácido caurenóico (0,0001 a 0,01 µM) e do esteviol (0,0001 a 0,01 µM), foram avaliados após incubação dessas células por 24 horas, a 37 °C, com concentrações crescentes usando-se o corante azul de tripano.

### 3.10.3. Ensaio de adesão

Células HEp-2 ( $5 \times 10^4$  células/ml) foram incubadas em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e na presença de concentrações crescentes de extrato (0,01 a 10  $\mu\text{g/ml}$ ), de ácido caurenóico ou de esteviol (0,0001 a 0,01  $\mu\text{M}$ ), a 37 °C, em placas de 96 poços (TPP). Após 24 horas, o sobrenadante foi desprezado e cada poço lavado 2 vezes com PBS. As células foram fixadas por 5 min com metanol e coradas com cristal violeta a 1,0% (p/v) por 3 min. Em seguida, os poços foram lavados com água e secos ao ambiente. O índice de células aderidas foi obtido com auxílio do Programa UTHSCSA *ImageToll for Windows*, versão 3.00, o qual faz a captura de imagens disponibilizadas como objetos em tonalidades de cinza sobre um fundo claro contrastante. Para tanto, após a incubação e eliminação das células não aderentes, as aderidas foram coradas e visualizadas em microscópio óptico invertido BIOVAL modelo XDS-1B. Vários campos foram fotografados com auxílio de uma câmara fotográfica digital SONY modelo DSC-W5, como ilustrado na Figura 5-A. As fotos digitalizadas foram, então, transferidas para um computador e submetidas a análise pelo programa como a seguir. Inicialmente as imagens foram transformadas para escala de cinza, cuja intensidade da cor foi subjetivamente escolhida para capturar a maioria das células presentes no campo. Neste contexto, o intervalo de escala de cinza escolhido para todas as leituras foi entre zero e 55. Cada célula assim capturada passou a ser reconhecida como “objeto” e, como tal, foi delineada em vermelho e submetida a escrutínio (Figura 5-B). Cada ensaio foi realizado em triplicata e, como resultado de cada experimento, utilizou-se a média da triplicata. Depois de normalizados, os resultados foram expressos como a quantidade de células aderidas em cada cavidade em relação aos resultados obtidos para o controle.



**Figura 5.** Aplicação do Programa UTHSCSA *ImageToll for Windows*, versão 3.00, para o estudo dos efeitos do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre a adesão de células HEp-2. Após exposição à concentrações crescentes do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol por 24 horas, a 37°C, células HEp-2 foram fixadas e coradas com solução de cristal violeta 1% e fotografadas com auxílio de câmara digital Sony DSC-W5 (A). As fotos foram transferidas para um computador e analisadas. As imagens foram transformadas para escala de cinza, cujo intervalo foi entre zero e 55. Ao se acionar essa função, cada célula que passou a ser reconhecida como “objeto” foi delimitada em vermelho (B) e submetida a escrutínio.

#### 3.10.4. Expressão de moléculas de adesão

Células HEp-2 ( $5 \times 10^4$  células/ml) foram incubadas em RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e na presença de concentrações crescentes de extrato (1 e 10  $\mu\text{g/ml}$ ), de ácido caurenóico (0,001 e 0,01  $\mu\text{M}$ ) e de esteviol (0,001 e 0,01  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas, a 37 °C. Em seguida, as células foram liberadas por tripsinização. Após lavagem com PBS, 5  $\mu\text{l}$  de solução de anticorpos monoclonais conjugados à ficoeritrina (PE) para  $\alpha_4\beta_1$  (Pharmingen/BD) e ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) para  $\alpha_5\beta_1$  (Immunotech) foram adicionados, e a mistura incubada ao abrigo da luz por 15 min, à TA. As células marcadas foram então, lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 0,5 ml de solução de paraformaldeído 1%. Os níveis de expressão de  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$  nas células HEp-2 foram analisados em um citômetro de fluxo Becton & Dickinson, modelo FACSCalibur, equipado com laser Argônio 488 nm. Em todas as determinações citométricas, um mínimo de  $10^4$  células foi analisado e a linha limite de detecção baseou-se na máxima coloração obtida com a mesma população, porém sem estar marcada com o anticorpo monoclonal.

#### 3.11. ESTUDOS ESTATÍSTICOS

Os resultados estão apresentados como a média  $\pm 1$  erro padrão da média (EPM) quando  $n \geq 3$ , e como a média  $\pm 1$  desvio padrão (DP), quando  $n = 2$ . Para análise estatística dos resultados, usou-se a Análise de Variância (ANOVA – *one way*); o teste *post hoc* empregado foi o teste de Tukey quando apropriado. Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa *Statística* e valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### 3.12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS - FORMATAÇÃO

As referências bibliográficas deste trabalho foram formatadas utilizando-se o programa *EndNote*, versão 9.0.0., tendo como padrão o periódico *The Journal of Cell Biology*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como já referido, a incorporação de plantas medicinais ao aparato terapêutico utilizado nas mais variadas doenças tem ganhado espaço cada vez maior, o que reforça a importância das plantas medicinais como fonte de substâncias que possuem atividade biológica.

Considerando o potencial biológico do extrato de *A. glabra* e do ácido caurenóico como descrito na introdução deste trabalho, investigou-se suas propriedades sobre leucócitos humanos, células tumorais e sobre o microcrustáceo *Artemia salina* usando ensaios *in vitro* clássicos, cujos resultados estão demonstrados e discutidos a seguir. Em paralelo, avaliou-se o comportamento do esteviol em ensaios similares, uma vez que este difere do ácido caurenóico apenas pela presença de uma hidroxila no carbono 13 do anel terpênico, como anteriormente citado.

### 4.1. ENSAIOS DE SOLUBILIZAÇÃO

Como as metodologias escolhidas para investigar as atividades biológicas do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol envolviam sistemas aquosos incompatíveis com sua natureza, utilizou-se o etanol como solvente com a finalidade de maximizar sua incorporação em PBSS, RPMI suplementado e água do mar sintética, uma vez que este solvente já se mostrou adequado nos modelos experimentais propostos (Florão, 2006). Entretanto, no momento da incorporação, precipitação ou turvação em concentrações superiores a 100 µg/ml para o extrato de *A. glabra*, a 100 µM para o ácido caurenóico e a 10 µM para o esteviol foram observadas. Dessa forma, para os estudos que compõem este trabalho, as concentrações utilizadas foram sempre inferiores àquelas cuja solubilidade se mostrou inadequada.

### 4.2. ENSAIOS COM LEUCÓCITOS HUMANOS

#### 4.2.1. Toxicidade

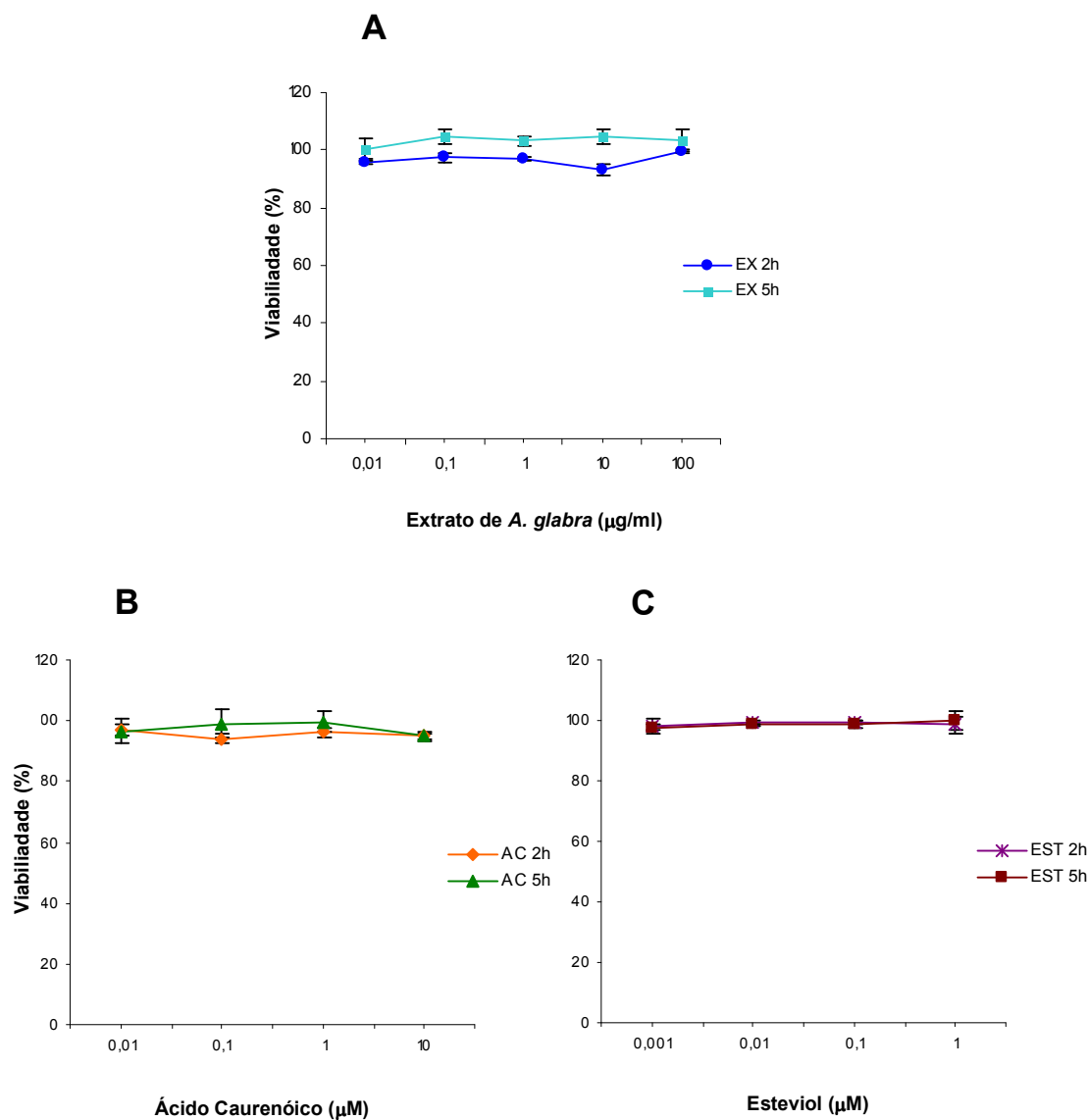
A realização de ensaios biológicos com células humanas exige, além de um solvente que permita a incorporação dos princípios ativos em meio aquoso, testes preliminares para avaliação de sua toxicidade. Neste contexto, o ensaio

que utiliza o corante azul de tripano é muito útil, pois permite observar este efeito sobre as células em estudo, as quais possuindo membrana citoplasmática íntegra, com preservação da sua permeabilidade seletiva, excluem o corante (Merchant *et al.*, 1964). Desta forma, células viáveis, após alguns minutos em contato com o corante, apresentam-se incolores, esféricas e refringentes, enquanto as células mortas ou inviáveis coram-se em azul. Neste trabalho, o corante azul de tripano foi utilizado para avaliar não só a toxicidade do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre leucócitos humanos, como também sobre células tumorais, como será mais adiante explorado.

Em um primeiro momento, para a realização dos ensaios de quimiotaxia e imunomodulação, os leucócitos obtidos de sangue periférico de voluntários sadios foram divididos em duas populações, granulócitos (GNC) e mononucleares (MNC), ambas obtidas após centrifugação com gradiente de densidade. Como esperado, citocentrifugados corados com May-Grünwald-Giemsa das duas populações demonstraram que linfócitos e monócitos predominaram entre os MNC (> 95%), enquanto neutrófilos e raros eosinófilos constituíram mais de 99% da fração dos GNC (n = 3). Além disso, somente amostras contendo  $\geq 90\%$  de células viáveis após o processo de isolamento, independente da fração em análise, foram utilizadas nos experimentos.

Com o objetivo de avaliar sua toxicidade, leucócitos GNC e MNC foram expostos a concentrações crescentes do extrato de *A. glabra* (0,01 a 100  $\mu\text{g/ml}$ ), de ácido caurenóico (0,01 a 100  $\mu\text{M}$ ) e de esteviol (0,001 a 10  $\mu\text{M}$ ) e seus efeitos investigados com azul de tripano sob microscopia de luz, após duas e cinco horas de incubação a 37°C para os GNC e, para a população de MNC, após cinco dias de cultivo, a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Esses períodos de incubação antes de se acessar a viabilidade celular, diferenciados entre as populações, correspondem àqueles necessários para a realização dos ensaios de quimiotaxia com GNC e àquele em que se pode observar alguma atividade imunomodulatória nas condições experimentais previamente estabelecidas em nosso laboratório (Machado Jr. *et al.*, 2006). Para os MNC, avaliou-se também a possibilidade de efeitos na presença de PHA, uma vez que essas células seriam ativadas por este mitógeno. Os resultados apresentados foram normalizados em relação aos controles, constituídos de

populações não expostas a nenhuma das substâncias em estudo, adotando-os como 100% de viabilidade celular e estão ilustrados na Figura 6.



**Figura 6. Efeito do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre a viabilidade de granulócitos humanos.** Granulócitos obtidos de sangue periférico de voluntários saudáveis, após isolamento em gradiente de densidade, foram expostos às concentrações indicadas do extrato de *A. glabra* (A), ácido caurenóico (B) e esteviol (C), e incubados por 2 e 5 horas, a 37°C. Os pontos representam a média  $\pm$  DP, em porcentagem, de células viáveis verificada pelo teste de azul de tripano após normalização dos dados em relação ao controle (n = 3).

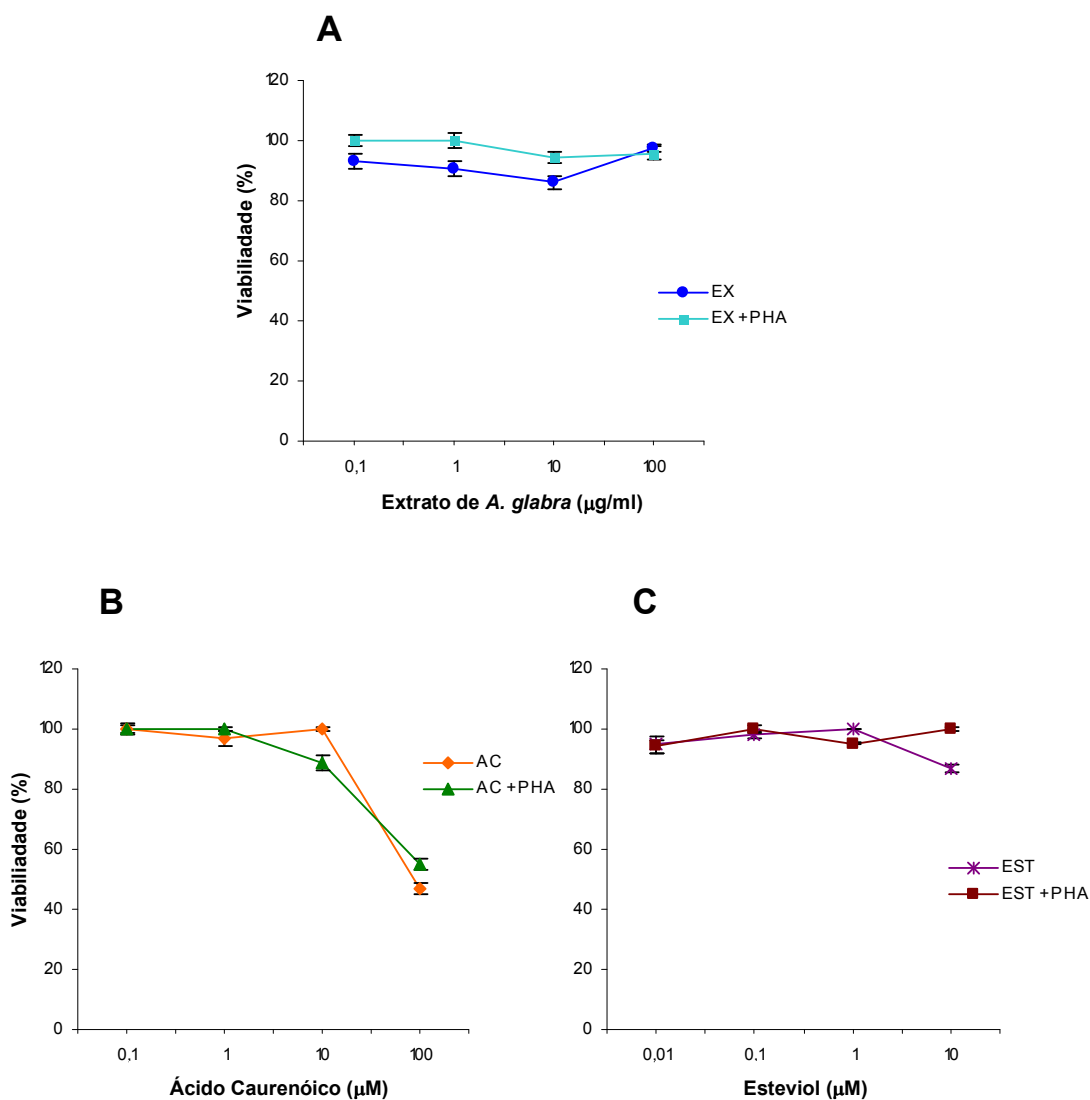
Para GNC, todas as concentrações utilizadas, independente do tratamento e do período de incubação, apresentaram comportamento semelhante, não sendo evidenciado nenhum efeito tóxico.

Assim, para o extrato de *A. glabra* (Figura 6-A), ácido caurenóico (Figura 6-B) e esteviol (Figura 6-C) observou-se, respectivamente, na maior concentração testada,  $96,6 \pm 0,8$ ,  $94,9 \pm 0,9$  e  $98,5 \pm 2,6\%$  ( $n = 3$ ) de viabilidade em relação ao grupo controle após duas horas de incubação. Da mesma forma, após cinco horas de cultivo, a viabilidade celular média manteve-se em  $103,3 \pm 3,8\%$  para as células expostas ao extrato de *A. glabra*, em  $95,0 \pm 1,7\%$  para aquelas incubadas com ácido caurenóico e em  $100,0 \pm 3,1\%$  para os ensaios com esteviol ( $n = 3$ ), todos em sua maior concentração ensaiada.

Quanto aos MNC (Figura 7), após cinco dias de incubação, evidenciou-se toxicidade somente para as células expostas ao ácido caurenóico na concentração de  $100 \mu\text{M}$  (Figura 7-B), com  $46,8 \pm 2,0$  e  $55,0 \pm 1,9\%$  somente de viabilidade em relação ao controle, respectivamente, para aquelas cultivadas na ausência e na presença de PHA. Também não foi evidenciado nenhum efeito tóxico para o extrato de *A. glabra* (Figura 7-A) e esteviol (Figura 7-C) sendo observado, respectivamente, na maior concentração testada sem PHA,  $97,6 \pm 1,2$  e  $87,0 \pm 1,3\%$ , e com PHA,  $95,9 \pm 1,9$  e  $100,0 \pm 0,5\%$  ( $n = 3$ ) de viabilidade em relação ao grupo controle. Com esses estudos foi possível estabelecer as concentrações que seriam utilizadas para os ensaios propostos utilizando leucócitos humanos e que foram coincidentes com aquelas obtidas com os ensaios de solubilidade.

A literatura relata estudos de citotoxicidade tanto para o extrato de *A. glabra*, para o ácido caurenóico como para o esteviol, mas principalmente sobre linhagens de células tumorais, como será explorado mais adiante neste trabalho. Entretanto, atividades citotóxicas do extrato de *A. glabra* e do ácido caurenóico já foram relatadas também para o *Trypanosoma cruzi* (Vieira *et al.*, 2002) e, à semelhança de *A. muricata* (Jaramillo *et al.*, 2000), para espécies de *Leishmania* (Carvalho *et al.*, 2001). O efeito do ácido caurenóico isolado de *Xylopiya sp.* e das partes aéreas de *Wedelia paludosa* também foi investigado sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, apresentando uma  $\text{CL}_{50}$  de  $0,57 \text{ mM}$  (Vieira *et al.*, 2002). Ainda, hemólise de eritrócitos humanos e

de camundongos, a 74,0 e 56,4  $\mu\text{M}$  para o ácido caurenóico (Costa-Lotufu *et al.*, 2002), respectivamente, e atividade contra dermatófitos (Boeck *et al.*, 2005) foram recentemente descritas.



**Figura 7. Efeito do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre a viabilidade de leucócitos mononucleares humanos.** Mononucleares obtidos de sangue periférico de voluntários saudáveis, após isolamento em gradiente de densidade, foram tratados com as concentrações indicadas de extrato de *A. glabra* (A), ácido caurenóico (B) e esteviol (C) e incubados por 5 dias em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , a 37 °C. Os pontos representam a média  $\pm$  DP, em porcentagem, de células viáveis verificada pelo teste de azul de tripano, normalizados em relação ao controle (n = 3).

Entretanto, modificações estruturais no C-16 ou no C-19 do ácido caurenóico não foram eficientes em aumentar a atividade trypanosomicida deste composto, assim como contribuíram muito pouco para evitar sua ação lítica sobre eritrócitos (Vieira *et al.*, 2002). Da mesma forma, somente derivados contendo grupos carboxilatos livres apresentaram atividade contra dermatófitos (Boeck *et al.*, 2005), porém este efeito foi inferior ao observado para o ácido caurenóico.

Por outro lado, glicosilação do C-17 intensificou a atividade trypanosomicida (Batista *et al.*, 2007), sugerindo que o acréscimo de um açúcar na molécula possa facilitar o transporte do ácido caurenóico através da membrana do parasita.

Como nenhum trabalho que avaliasse a toxicidade sobre leucócitos humanos foi encontrado, os resultados aqui descritos colaboram com os estudos já existentes sobre a toxicidade dessas substâncias sobre células normais. Como eles favorecem o uso do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol para estudos biológicos com células humanas, é preciso ressaltar que resultados de experimentação *in vitro* não devem ser comparados com a dinâmica de um organismo vivo, pois neles tem-se um acúmulo de metabólitos no meio de cultura, os quais, devido à ausência das vias de biotransformação e excreção como normalmente ocorre *in vivo*, não podem ser eliminados do sistema, causando efeito nocivo que pode superestimar a toxicidade de substâncias (Hayes *et al.*, 2002).

#### 4.2.2. Quimiotaxia

Dentro do processo inflamatório, os leucócitos circulantes aderem-se ao endotélio capilar e, após diapedese, ganham a MEC e direcionam-se para o local da lesão através de um gradiente de concentração químico, aproximando-se do agente causal. Aí, utilizam-se de armas para a eliminação do mesmo, com concomitante reparo do tecido.

Todo esse processo é acionado quando agentes físicos, químicos ou biológicos, como bactérias e vírus, conseguem, de algum modo, ultrapassar as barreiras naturais dos organismos vivos, representadas principalmente pela pele e mucosas no homem, favorecendo o recrutamento de populações celulares distintas com vistas à sua eliminação. Quando este processo torna-se

exacerbado, ultrapassando os efeitos salutares, há a necessidade de se usar agentes que interfiram em uma ou mais das etapas que compõem a resposta inflamatória.

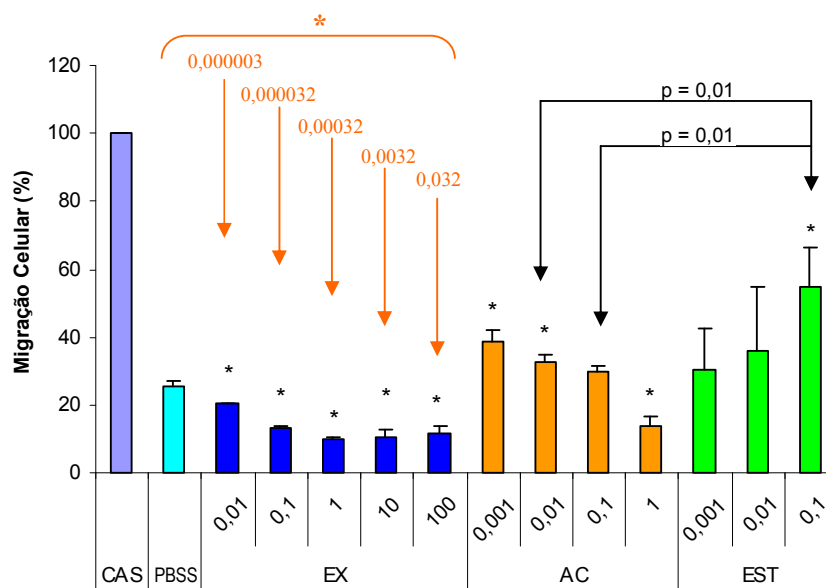
O ensaio de quimiotaxia como proposto por Boyden no início dos anos 60 (Boyden, 1962) e suas variações têm se mostrado úteis como uma metodologia *in vitro* para se investigar o efeito de substâncias extraídas de plantas sobre a quimiotaxia de leucócitos (Chen *et al.*, 2001; Hofbauer *et al.*, 1999; Hofbauer *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2001). Neste trabalho, investigou-se o potencial do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol no recrutamento de fagócitos de sangue periférico, em particular granulócitos, utilizando-se câmaras de Boyden. Para tanto, essas substâncias foram adicionadas ao compartimento inferior das câmaras, separado do superior por filtros de policarbonato contendo poros de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Para fins de comparação de efeito, utilizou-se a caseína, uma proteína reconhecidamente dotada de potente atividade quimiotática sobre GNC humanos (McCutcheon, 1955; Solymossy *et al.*, 1986), para a qual os dados foram normalizados em 100%. Os resultados estão ilustrados na Figura 8.

A percentagem média de células que migraram para o compartimento inferior das câmaras de Boyden, após exposição às concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10 e 100  $\mu\text{g/ml}$  do extrato de *A. glabra*, foi dependente da concentração e significativamente menor ( $n = 4$ ;  $p < 0,0001$  para todas as concentrações) do que a observada para a população controle ( $25,3 \pm 1,9\%$ ), exposta somente ao PBSS, com valores de  $22,4 \pm 0,0\%$ ,  $13,0 \pm 1,0\%$ ,  $9,9 \pm 0,7\%$ ,  $10,3 \pm 2,1\%$  e  $11,4 \pm 2,2\%$ , respectivamente.

Em contraste, observou-se um aumento significativo de células recrutadas tanto pelo gradiente de ácido caurenóico, com  $38,9 \pm 2,8\%$ ,  $32,5 \pm 2,4\%$ ,  $29,6 \pm 1,7\%$ ,  $13,7 \pm 2,9\%$  para as concentrações respectivas de 0,001, 0,01, 0,1 e 1  $\mu\text{M}$  ( $n = 4$ ;  $p < 0,0001$  para todos), como para o de esteviol, com  $30,6 \pm 4,7\%$ ,  $35,8 \pm 13,2\%$ ,  $54,9 \pm 10,2\%$  ( $n = 4$ ;  $p < 0,0001$  para todos) para as concentrações de 0,001, 0,01 e 0,1  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Nesta série de experimentos, observou-se que o ácido caurenóico estimulou significativamente a quimiotaxia de GNC humanos a favor do seu gradiente em concentrações baixas e inibiu-a na concentração mais elevada

ensaiada (1,0  $\mu\text{M}$ ). Já o esteviol demonstrou padrão de efeito quimiotático atraente similar ao do ácido caurenóico e, na concentração de 0,1  $\mu\text{M}$ , este efeito foi, inclusive, significativo tanto em relação ao controle como em relação ao efeito observado para o ácido caurenóico nas concentrações de 0,1 e 0,01  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,01$ ). Entretanto, quando comparados, o melhor efeito do ácido caurenóico na estimulação da migração de granulócitos humanos foi em uma concentração pelo menos 100 vezes inferior à do esteviol, demonstrando um aspecto importante do ponto de vista de ação farmacológica desses compostos com relação ao binômio dose-efeito. Relevante é o fato de que não se deve excluir que um número maior de experimentos com o esteviol poderia modificar a interpretação desses resultados, uma vez que essas diferenças estatísticas talvez fossem minimizadas ou mesmo desapareceriam.



**Figura 8. Avaliação dos efeitos do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre a quimiotaxia de granulócitos humanos.** Granulócitos (GNC) obtidos de sangue periférico de doadores saudáveis foram expostos às concentrações indicadas do extrato de *A. glabra* (EX -  $\mu\text{g/ml}$ ), de ácido caurenóico (AC -  $\mu\text{M}$ ), de esteviol (EST -  $\mu\text{M}$ ) e de caseína (CAS), adicionadas ao compartimento inferior de câmaras de Boyden, e estimulados a migrar por noventa minutos, a 37 °C. As colunas representam a porcentagem média  $\pm$  EPM de GNC recuperados do compartimento inferior da câmara de Boyden em relação à população controle exposta ao PBSS ( $n = 4$ ); [\*]  $p < 0,0001$  em relação ao controle (ANOVA, seguida do teste de Tukey). [\*] Concentração de ácido caurenóico ( $\mu\text{M}$ ) no extrato.

Mesmo que o efeito quimiotático apresentado por ambos tenha sido significativo em relação à população controle, é preciso notar que nenhum deles se mostrou superior ao efeito demonstrado pela caseína. Neste contexto, a presença de receptores para a caseína já foi descrita na superfície tanto de granulócitos como de monócitos (Lewis *et al.*, 1983). Além disso, a caseína é uma proteína do leite com ação opióide (Goody *et al.*, 2001), com efeitos inibitórios descritos sobre as respostas imunes celular e mediada por anticorpos, na atividade de células NK, na expressão de citocinas e na atividade fagocítica, como revisado pelo grupo de Szabo (Szabo *et al.*, 2002), decorrentes de sua interação com diferentes receptores opióides. Investigar os tipos de receptores presentes nos granulócitos que interagem com o ácido caurenóico e o esteviol poderia esclarecer o mecanismo de ação dessas substâncias na modulação do efeito observado.

Outro aspecto interessante que deve ser destacado nesse estudo é que, segundo Oliveira e colaboradores (2002), o ácido caurenóico constitui cerca de 10%, em peso, do extrato de *A. glabra* utilizado, implicando que, nas concentrações de 10 e 100 µg/ml desse extrato, cerca de 1 e 10 µg/ml, respectivamente, corresponderiam ao seu conteúdo em ácido caurenóico, ou seja, corresponderiam a 0,0032 e 0,032 µM em ácido caurenóico, respectivamente, visto que, o extrato de *A. glabra* e o ácido caurenóico utilizados neste trabalho foram os mesmos utilizados por Oliveira e colaboradores. Assim, seria de se esperar que o extrato promovesse uma ação de recrutamento celular em favor de seu gradiente como o observado para as concentrações de 10 e 100 µg/ml, e não um efeito contra o gradiente como o obtido. Entretanto, à medida que se aumentou a concentração de ácido caurenóico no sistema, observou-se diminuição proporcional da migração celular.

Uma pergunta que, então, se tornou pertinente foi com referência aos eventos que aconteceriam caso concentrações superiores a 100 µM de ácido caurenóico pudessem ser avaliadas. Neste contexto, seria interessante repetir este ensaio utilizando um outro solvente, atóxico para GNC humanos, que levasse a uma maior e melhor solubilização do ácido caurenóico no PBSS.

Conseqüentemente, maiores concentrações poderiam ser incorporadas ao sistema, permitindo investigar com mais detalhes esta atividade.

Por outro lado, vários estudos têm demonstrado que leucócitos respondem de formas diferentes a estímulos quimiotáticos, dependendo de estarem ou não sensibilizados e/ou ativados pela presença de citocinas inflamatórias (Ozaki *et al.*, 1987; Shalaby *et al.*, 1985). A resposta das células na presença de ácido caurenóico, nas condições experimentais propostas, foi evidente, tanto que as mesmas ativaram-se e, conseqüentemente, migraram em favor de seu gradiente. Além disso, este efeito pareceu estar associado a um nível mínimo de concentração do ácido caurenóico, pois à medida que sua concentração aumentava, a intensidade do efeito reduzia-se. Avaliar, portanto, o efeito de concentrações ainda menores do ácido caurenóico constitui-se um ponto necessário e esclarecedor deste particular.

Já para o grupo tratado com extrato, observou-se uma resposta negativa em relação ao gradiente, porém a amplitude desse efeito foi muito semelhante para as concentrações entre 0,1 e 100 µg/ml. Nesta última concentração, o efeito foi, inclusive, muito próximo daquele causado pelo ácido caurenóico a 1,0 µM. Assim, é possível que concentrações mais elevadas de ácido caurenóico no extrato possam contribuir para um efeito inibitório. Mas, com certeza há neste extrato substâncias outras promotoras do efeito inibidor da quimiotaxia observado, cuja potência é superior àquela promovida pelo ácido caurenóico ali presente, e que devem ser investigadas.

Relatos sobre a interferência de extratos preparados de plantas medicinais ou de compostos deles purificados sobre a inibição da quimiotaxia de leucócitos humanos como o aqui demonstrado para o de *A. glabra* são particularmente frequentes na literatura (Hofbauer *et al.*, 1999; Hofbauer *et al.*, 2001; Ihtola-Vormisto *et al.*, 1997), inclusive em trabalhos recentes divulgados por nosso grupo (Presibella *et al.*, 2006). Entretanto, foi intrigante o fato de o extrato da *A. glabra*, o qual tem ácido caurenóico em concentração relativamente elevada, demonstrar comportamento inibitório.

Mas, por outro lado, os resultados obtidos com o ácido caurenóico purificado vêm de encontro ao relato recente de que ratos portadores de colite induzida por ácido acético, previamente tratados com ácido caurenóico purificado da leguminosa *Copaifera langsdorffii*, demonstraram redução da

inflamação associada a um aumento da atividade da mieloperoxidase, uma enzima considerada marcadora de infiltração neutrofílica (Paiva *et al.*, 2002), corroborando com a indicação de uma atividade pró-migratória para este composto.

O movimento celular direcional, ou a quimiotaxia, constitui-se de uma etapa fundamental dos processos que regulam e medeiam sincronicamente as respostas imune e inflamatória, e depende de um grupo de substâncias definidas genericamente como *fatores quimiotáticos* (FQ), ou ligantes capazes de induzir uma locomoção direcional a favor ou contra um gradiente de concentração (Wilkinson *et al.*, 1988).

Se há um ligante, é necessário que a célula em questão apresente um ou mais receptores que permitam o acoplamento deste ligante. Dessa forma, tanto o ácido caurenóico como o esteviol demonstraram comportamento de FQ, pois os resultados mostraram que ambos foram capazes de promover a quimiotaxia de GNC humanos a favor de seus gradientes, implicando que essas células são dotadas de um ou mais receptores que permitem sua interação.

A quimiotaxia de granulócitos especificamente compreende um processo complexo, constituído por uma infinidade de ligantes e seus receptores. Há um certo grau de especificidade da substância quimiotática em relação à célula-alvo, assim como uma relação dose-dependente. Por exemplo, algumas substâncias como a caseína, que são muito potentes em ativar a quimiotaxia de neutrófilos, podem provocar moderada resposta em monócitos e ser inativa para linfócitos. Outras estimulam vários tipos celulares, mas em concentrações diferentes, como é o caso do *f*-MLP, o qual é ativo a  $10^{-9}$  M para neutrófilos, e a  $5 \times 10^{-9}$  M para monócitos (Wilkinson *et al.*, 1988). Ainda, há substâncias que podem, eventualmente, ligar-se a diferentes tipos de receptores com diferentes intensidades de ligação, assim como um receptor pode acoplar-se a ligantes diferentes. Esta situação é referida na literatura como *promiscuidade receptor-ligante* (Broxmeyer *et al.*, 1999).

A maioria dos receptores protéicos envolvidos na migração celular pertence à família de receptores associados ao complexo heterotrimérico da proteína G (Rang *et al.*, 2001), os quais respondem através de uma sucessão de interações e desacoplamentos das subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  até a associação final com uma enzima-alvo, a qual ativa uma ou mais moléculas sinalizadoras,

também denominadas mensageiros secundários (Alberts *et al.*, 1994). Em regra, a transdução de sinal desses receptores se dá pela hidrólise do fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em seus mensageiros intermediários, o inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e o diacilglicerol (DG). O IP<sub>3</sub> mobiliza as reservas intracelulares de Ca<sup>2+</sup>, levando a um aumento transitório de Ca<sup>2+</sup> intracelular, enquanto o DG estimula a fosfoquinase C, que através da fosforilação de uma infinidade de moléculas efetoras promove uma variedade de respostas celulares (Ben-Baruch *et al.*, 1995).

Ou seja, a ativação de um receptor e/ou o mecanismo de transdução por ele desencadeado direciona o comportamento celular e culmina no desencadeamento de uma ou mais atividades celulares, incluindo os mecanismos observados nas respostas inflamatórias como a mobilização de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Hallet *et al.*, 1990), rearranjo do citoesqueleto, exocitose, indução da expressão de receptores de superfície, mudanças na adesão e agregação (Smith *et al.*, 1979), produção de superóxidos (Thelen *et al.*, 1993), aumento da atividade metabólica (Bokoch, 1995), quimiotaxia (Zigmond, 1977), dentre outras, como revisado por Dudez e colaboradores (2002).

Portanto, é possível que os efeitos observados tanto para o extrato de *A. glabra* como para o ácido caurenóico e o esteviol sobre a mobilização de GNC humanos envolvam mecanismos relacionados à cascata complexa da quimiotaxia, a qual depende do tipo celular envolvido, do ligante, da estrutura e configuração dos receptores, da proteína G envolvida e das diferentes enzimas-alvo que são ativadas no processo, além da possibilidade de, para o extrato de *A. glabra* em particular, devido à sua complexidade em termos de composição, serem resultantes da somatória de respostas moleculares causadas por cada um de seus constituintes isoladamente.

Já para o ácido caurenóico, estudos recentes apontam para uma ação tanto em nível de membrana celular via proteína G (Tirapelli *et al.*, 2004), quanto de núcleo (Zhang *et al.*, 2004), sugerindo que o mecanismo quimiotático observado neste estudo possa estar envolvido diretamente com a ativação de receptores associados à proteína G ou, indiretamente, com a indução da produção de alguma quimiocina por regulação da expressão de seus genes, como já sugerido para a IL-8 (Taub *et al.*, 1994).

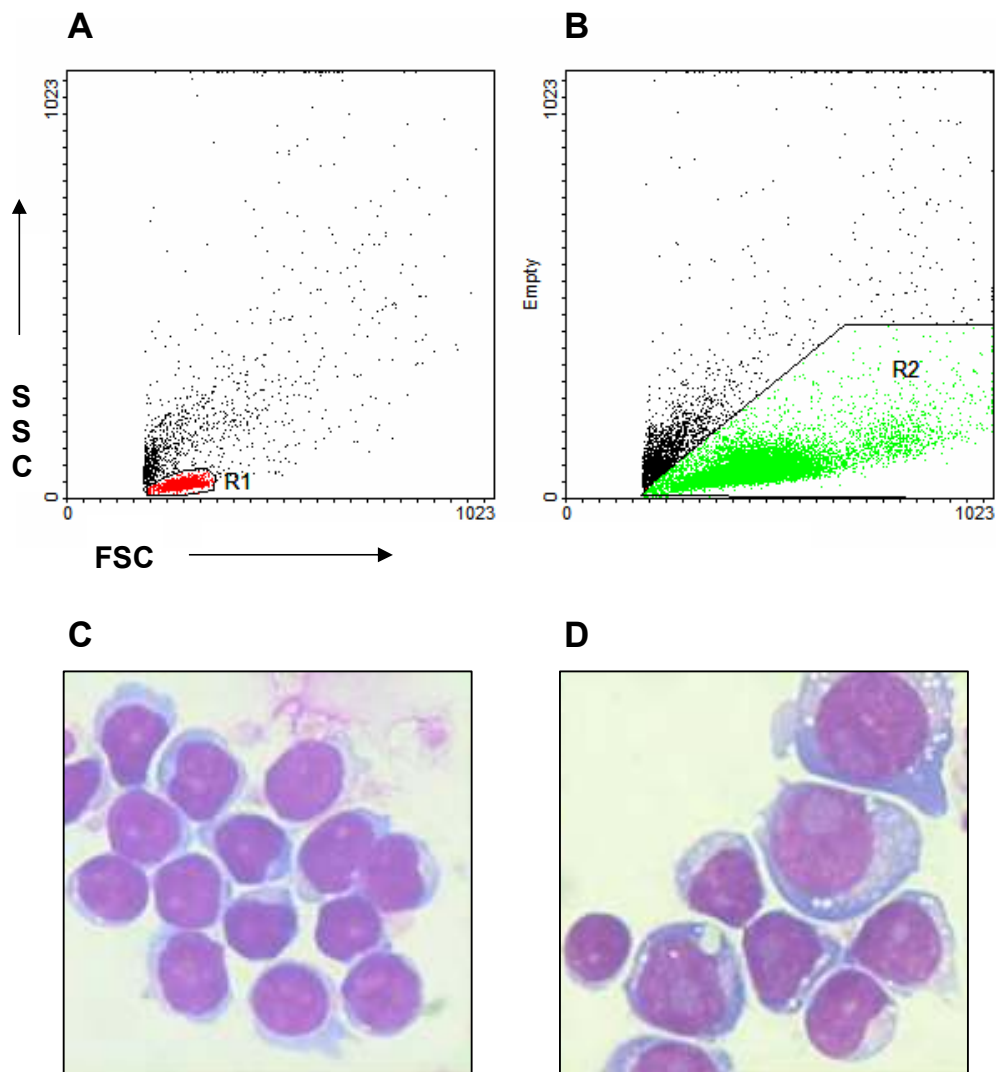
Devido às semelhanças estruturais, o esteviol pode também estar atuando por mecanismos semelhantes aos do ácido caurenóico, porém com intensidades diferentes. Estudos mais aprofundados, incluindo definição de receptores, devem ser realizados por meio de ensaios experimentais mais específicos, que possam esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos, dos quais aplicações terapêuticas possam ser exploradas.

#### 4.2.3. *Imunomodulação*

Um dos objetivos deste trabalho foi o de se avaliar a ação do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre o potencial imunomodulatório de linfócitos humanos em seu estado basal e quando estimulados por fitohemaglutinina, uma vez que, 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. Para tanto, observou-se seus efeitos sobre a capacidade de ativação de células MNC obtidas de sangue periférico de indivíduos saudáveis, avaliada pela transformação blástica, e sobre sua capacidade proliferativa.

A estratégia utilizada para avaliar esses parâmetros por citometria de fluxo, ilustrada com detalhes na Figura 9, baseou-se essencialmente no trabalho recente de Machado Jr. e colaboradores (2006). Brevemente, gráficos obtidos após análise das amostras por citometria de fluxo correlacionando o tamanho celular *versus* a complexidade interna, serviram de base para delimitar subjetivamente duas regiões. A primeira, R1, contendo células de pequeno tamanho e de menor complexidade interna, como é o caso dos linfócitos em seu estado basal (Figura 9-A). E a região R2, compreendendo células ativadas (denominadas linfoblastos), ou seja, que sofreram alteração morfológica, também conhecida como transformação blástica, e que se caracterizam por tamanho e complexidade interna maiores em relação a linfócitos basais (Figura 9-B).

É preciso esclarecer que nem todos os linfócitos de uma população de sangue periférico sofrem ativação quando simultaneamente estimulados, permanecendo na região R1. Assim sendo, a região R2 inclui células da região R1 quando se está analisando um efeito de ativação.



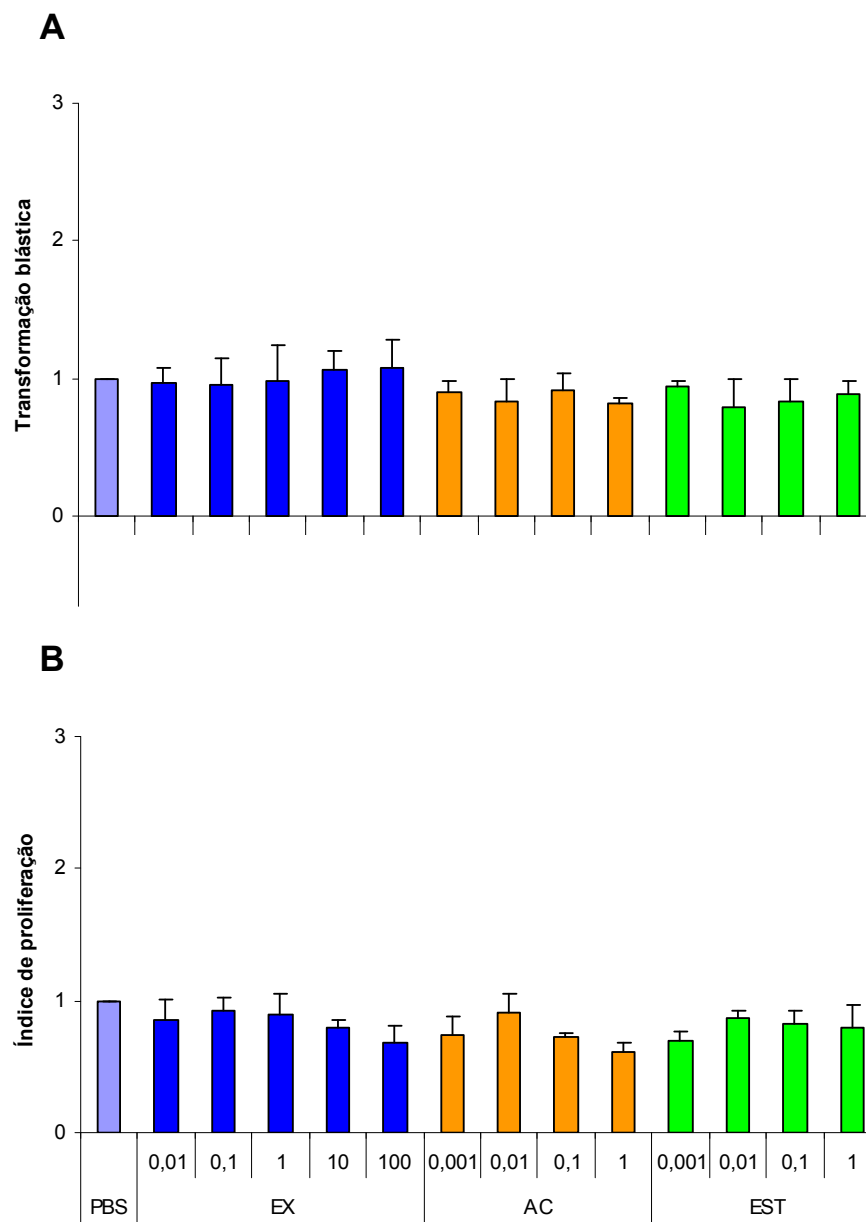
**Figura 9. Representação gráfica em pontos para análise da atividade imunomodulatória de linfócitos por citometria de fluxo.** Os gráficos representam populações de mononucleares, em que as características de tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC) foram utilizadas para distinguir cada população e definir as regiões para avaliação da proliferação de linfócitos do grupo controle (A) e do grupo tratado, neste caso com fitohemaglutinina (B). A região delimitada por R1 corresponde à população de linfócitos normais não ativados; R2 corresponde a população de linfócitos ativados, os quais se transformam em linfoblastos, e as regiões não delimitadas compreendem outras células e debris. Citocentrifugados preparados dessas populações e corados com May-Grünwald-Giemsa demonstram, respectivamente, predominância de linfócitos (C) e de blastos (D). (1000x).

Além da citometria de fluxo e como bem caracterizado no trabalho de Machado Jr. (2006), a ativação de linfócitos também pode ser acompanhada morfológicamente, examinando-se preparações citológicas coradas com May-Grünwald-Giemsa. Neste estudo, análise de citocentrifugados das populações de MNC incubadas por cinco dias somente em meio de cultura convencional demonstrou que, em média,  $90,2 \pm 4,9\%$  dessas células permaneceram com morfologia de linfócitos (Figura 9-C), confirmando dados da literatura e sugerindo que essas células por si só, não têm a habilidade de se ativar. Entretanto, quando expostas a fitohemaglutinina, somente  $5,1 \pm 3,5\%$  das células permaneceram com morfologia característica de linfócitos, sendo o restante representado por linfoblastos, ilustrados na Figura 9-D.

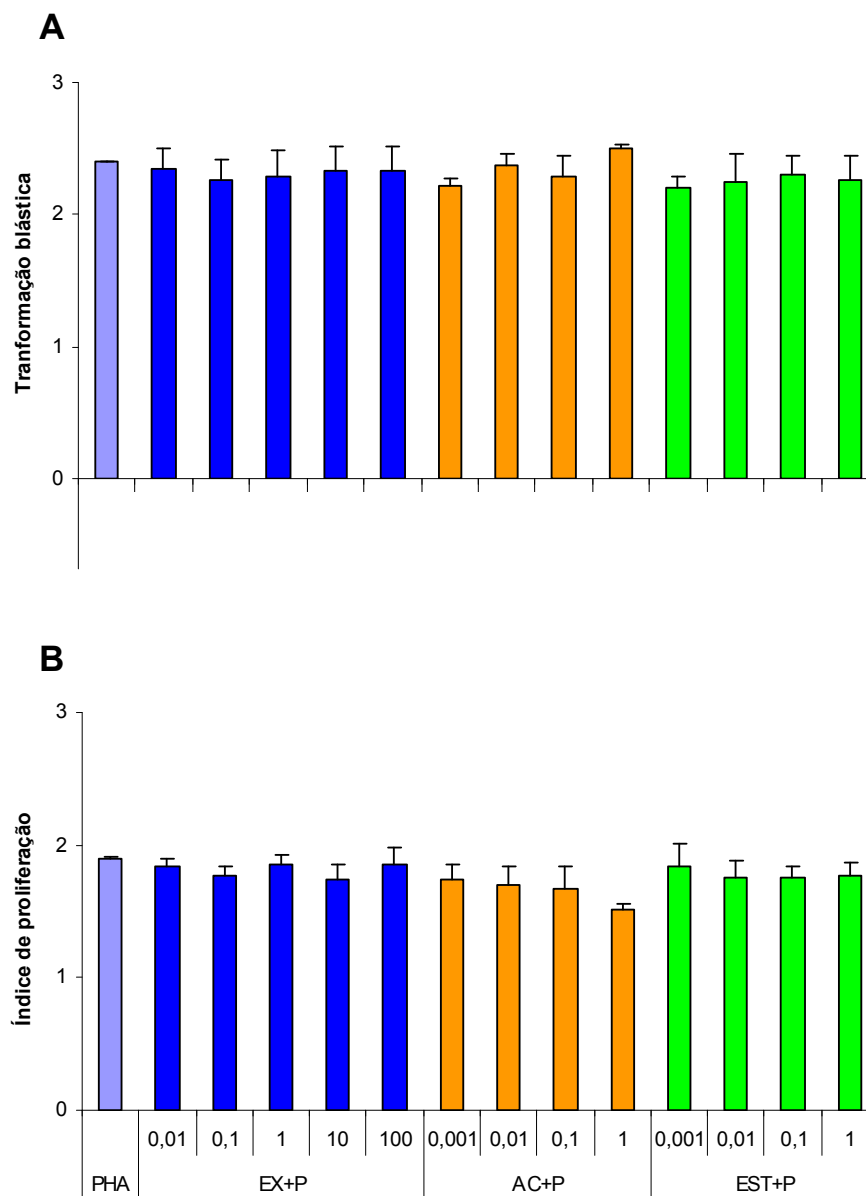
Assim, avaliou-se a capacidade do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol de interferirem na ativação e na proliferação de linfócitos humanos em seu estado basal, presentes na fração de MNC obtidos de indivíduos saudáveis. Com os resultados apresentados na Figura 10, foi possível constatar que nenhuma das concentrações ensaiadas dessas substâncias interferiu na transformação blástica ou na proliferação de linfócitos, indicando que essas substâncias são desprovidas da capacidade de ativar linfócitos humanos e, como consequência, promover sua proliferação.

Como visto anteriormente, a resposta dos linfócitos a antígenos *in vivo* é específica, gerando amplificação clonal; e sua resposta a mitógenos *in vitro* é inespecífica e influencia, simultaneamente, um grande número de células, levando-as a sofrer transformação blástica e proliferação. Esta propriedade favorece estudos experimentais com a fitohemaglutinina, uma lectina extraída e purificada de *Phaseolus vulgaris* que tem a habilidade de estimular *in vitro* sub-populações de células T humanas levando-as a proliferar (Myers, 1995).

Como a fitohemaglutinina já havia demonstrado competência para estimular a proliferação de linfócitos humanos na metodologia proposta (Florão, 2006; Machado Jr. *et al.*, 2006), avaliou-se se o extrato de *A. glabra*, o ácido caurenóico e o esteviol poderiam interferir na ativação dessas células quando simultaneamente expostas ao mitógeno. Os resultados desta avaliação estão demonstrados na Figura 11. Da mesma forma, observou-se que em nenhuma das concentrações ensaiadas dessas substâncias houve interferência na transformação blástica ou na



**Figura 10. Efeitos do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre a transformação blástica e a proliferação de linfócitos humanos.** Mononucleares obtidos de sangue periférico foram cultivados por 5 dias, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com as concentrações indicadas do extrato de *A. glabra* (EX - µg/ml), ácido caurenóico (AC - µM) e esteviol (EST - µM). Cada coluna em (A) representa a média ± EPM de linfócitos que sofreram transformação blástica, obtida da relação entre a diferença do número de eventos detectados por citometria de fluxo nas regiões R1 e R2 de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata. Em (B), cada coluna representa a média ± EPM do índice de proliferação, obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 e o controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata.



**Figura 11. Efeitos do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre a transformação blástica e a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina.** Mononucleares obtidos de sangue periférico foram cultivados por 5 dias, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com as concentrações indicadas do extrato de *A. glabra* (EX - µg/ml), ácido caurenóico (AC - µM) e esteviol (EST - µM) na presença de fitohemaglutinina (PHA). Cada coluna em (A) representa a média ± EPM de linfócitos que sofreram transformação blástica, obtida da relação entre a diferença do número de eventos detectados por citometria de fluxo nas regiões R1 e R2 de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata. Em (B), cada coluna representa a média ± EPM do índice de proliferação, obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 e o controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata.

proliferação de linfócitos induzida por fitohemaglutinina, indicando que essas substâncias são também desprovidas da capacidade de atuar sobre linfócitos humanos ativados.

Como visto na introdução deste trabalho, a interação de um mitógeno como a fitohemaglutinina com o receptor das células T (TcR), por exemplo, inicia, na célula, eventos que envolvem o recrutamento de íons cálcio e a ativação simultânea de várias enzimas. Neste contexto e devido aos efeitos observados com essas substâncias sobre a quimiotaxia de granulócitos, a qual também envolve  $\text{Ca}^{2+}$ , a ausência de atividade foi causa de surpresa.

Entretanto, na literatura não há estudos relacionados à atividade imunomodulatória sobre MNC humanos do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico ou do esteviol. Digno de nota, porém, é o relato recente de Ohkoshi e colaboradores (2004), os quais, investigando as atividades biológicas de derivados do ácido caurenóico obtido do extrato de *Mikania hirsutissima* (Compositae), sobre linfócitos de sangue periférico humano, observaram que seus derivados hidroxilados nos carbonos 2, 3, 16 e 17, os ácidos  $2\beta$ ,  $16\alpha$ , 17-trihidroxi-ent-caurano-19-oico e  $3\beta$ ,  $16\alpha$ , 17-trihidroxi-ent-caurano-19-oico apresentaram significativa atividade imunomodulatória. Assim, é possível que a ausência de efeito observada neste estudo possa estar relacionada à estrutura química desses compostos, onde ambos apresentam-se insaturados entre os carbonos 16 e 17.

Nesse contexto, a presença de oligossacarídeos em moléculas ou a formação de glicoconjugados promovem respostas melhores em estudos imunomoduladores por aumentarem a afinidade entre receptores e ligantes (Brandley *et al.*, 1990). Interessante seria, então observar se os derivados do ácido caurenóico que apresentaram atividade trypanosomicida após glicosilação do C-17 não seriam também dotados de atividade imunomoduladora.

#### 4.3. TESTE DE LETALIDADE PARA NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

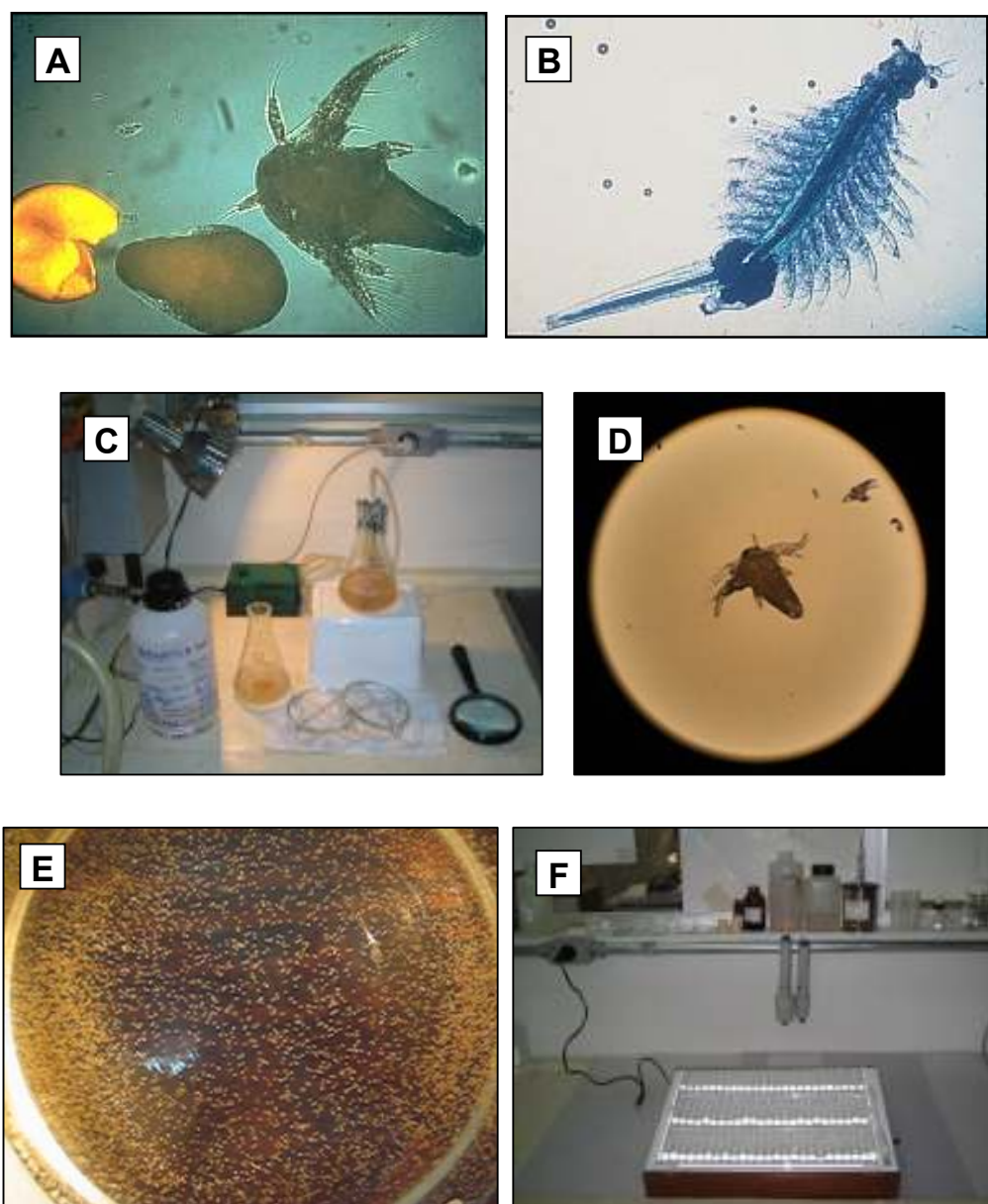
Este ensaio foi utilizado neste trabalho como modelo para se observar os efeitos do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre o comportamento de náuplios de *Artemia salina* (Figura 12, A e B) e os ensaios foram executados de acordo com a metodologia descrita por Meyer (1982) e modificada por Fontana e colaboradores (1998), ilustrada na Figura 12 (C a F). Brevemente, diluições seriadas (20 a 100 µg/ml) dessas substâncias incorporadas em etanol e diluições com etanol (1 a 3,5% v/v), isoladamente, foram preparadas com solução aquosa de sal marinho sintético e incubadas com náuplios recém eclodidos, como descrito em detalhes na seção de Material e Métodos. Os resultados estão apresentados na Tabela 2 como CL<sub>50</sub>, obtida com auxílio do *software* PROBIT.

Dentro da faixa de concentração testada, somente o ácido caurenóico apresentou atividade tóxica para os náuplios, com uma CL<sub>50</sub> de 54,4 µM, corroborando em parte, com os estudos de Zani e colaboradores (1995), os quais demonstraram resultados para esta substância com relação a *A. salina* e, também, para *T. cruzi* em concentrações superiores.

**Tabela 2. Efeito do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre a viabilidade de náuplios de *Artemia salina*.**

Tratamento	CL <sub>50</sub>	Intervalo de confiança de 95%
Extrato de <i>A. glabra</i> (µg/ml)	> 100	-
Ácido caurenóico (µM)	54,4	47,3 – 74,7
Esteviol (µM)	> 100	-

Náuplios viáveis de *A. salina* foram transferidos para tubos contendo concentrações crescentes de extrato de *A. glabra*, ácido caurenóico ou esteviol (20 a 100 µg/ml) em volume máximo de 2 ml de água do mar sintética. Após 24 horas, náuplios viáveis foram enumerados e usados para calcular a CL<sub>50</sub> com auxílio do Programa PROBIT. Os resultados foram obtidos de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata.



**Figura 12. *Artemia salina*, suas formas de vida e ensaio de letalidade.** Náuplio eclodindo do cisto (A). Forma adulta (B). Cistos de *A. salina* mantidos a 8°C foram transferidos para água do mar sintética e mantidos em temperatura ambiente por 48 a 72 horas, sob iluminação e aeração constantes (C) até eclosão dos náuplios (D, 400x), caracterizada pelo movimento natatório intenso e fototropismo positivo dos microcrustáceos (E). Em seguida, são co-incubados com a(s) substância(s) em estudo por 24 horas sob iluminação constante (F). A e B, fonte: Centro de referência de *Artemia*, Universidade de Ghent – Bélgica.

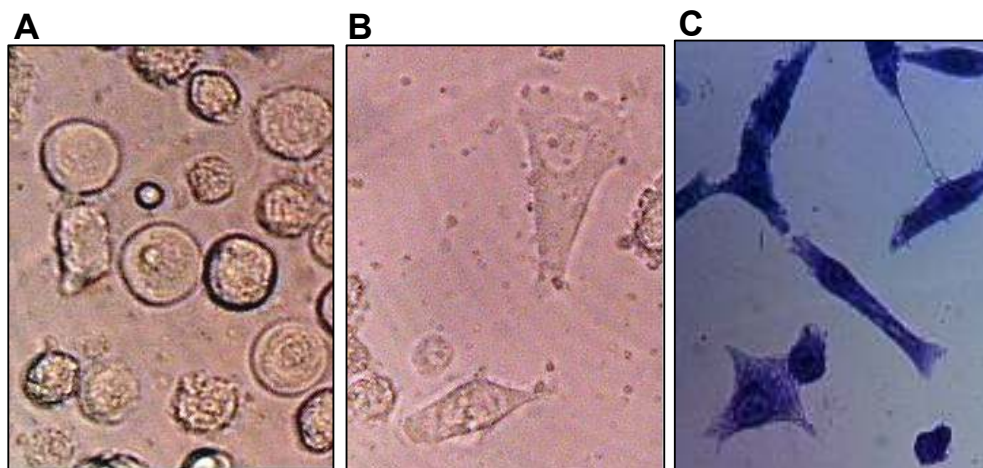
A literatura não relata estudos semelhantes para o extrato de *A. glabra* ou para o esteviol. No entanto, em ensaios com larvas de *Aedes aegypti*, o extrato apresentou CL<sub>50</sub> de 27 µg/l (Mendonca *et al.*, 2005), enquanto uma CL<sub>50</sub> de 84,2 µM foi descrita para embriões de ouriço-do-mar (Costa-Lotufo *et al.*, 2002), implicando que diferenças biológicas entre insetos e animais marinhos podem ser as responsáveis pelas respostas distintas observadas para o extrato de *A. glabra*.

#### 4.4. ENSAIOS COM CÉLULAS HEP-2

Linhas celulares em geral, e de células tumorais em particular, constituem modelos experimentais *in vitro* apropriados para se avaliar o potencial biológico de extratos de plantas e substâncias puras, pois proliferam de forma contínua, dentro de um ambiente controlado física e quimicamente, minimizando interferências comuns nos organismos vivos. Nesse sentido, cria-se um ambiente que favorece o estudo de substâncias ou de misturas de substâncias, como é o caso de extratos preparados de plantas medicinais, relacionado à toxicidade, à proliferação, migração, adesão, espalhamento, interações celulares, diferenciação *etc*, desvendando possibilidades e oferecendo direcionamento para estudos mais aprofundados, usando inclusive modelos vivos.

Com o objetivo de se avaliar os efeitos do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre a adesão de células tumorais, utilizou-se células HEP-2 como modelo, ilustradas na Figura 13, estabelecidas de carcinoma epidermóide de laringe humana implantado em camundongos (Moore *et al.*, 1955). São células muito resistentes a variações ambientais, como temperatura, nutrientes e radiação ultravioleta; multiplicam-se avidamente aderindo-se, simultânea e espontaneamente, a superfícies inertes, como o vidro ou a base de frascos de cultura, sendo apropriadas e convenientes para estudos de adesão celular. Estudos relatam que a confluência entre as células parece ser mediada pela adesão célula-célula, o que favorece a sua resistência às variações ambientais (Mazurov *et al.*, 2003).

Há uma observação clínica comum com relação aos carcinomas, os quais são de origem epitelial como as células HEp-2 deste estudo, de que seu espalhamento, ou disseminação metastásica, se faz pelos vasos linfáticos e sanguíneos, em contraste com os sarcomas, que se espalham geralmente via hematogênica. Sabe-se que há conexões entre os vasos linfáticos e sanguíneos e que células tumorais são capazes de se mover entre esses sistemas pelas anastomoses hematolinfáticas (Franks *et al.*, 1997).



**Figura 13. Cultura de células HEp-2.** Células HEp-2 (A, contraste de fase) foram estabelecidas de carcinoma epidermóide de laringe humana e podem ser mantidas proliferando *in vitro* em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal. Têm a propriedade de se aderir naturalmente à superfícies sólidas, como a base do frasco de cultura, espalhando-se para se aderirem mais firmemente à matriz (B, contraste de fase), cuja morfologia pode ser melhor observada após coloração com solução de cristal violeta 1% (C).

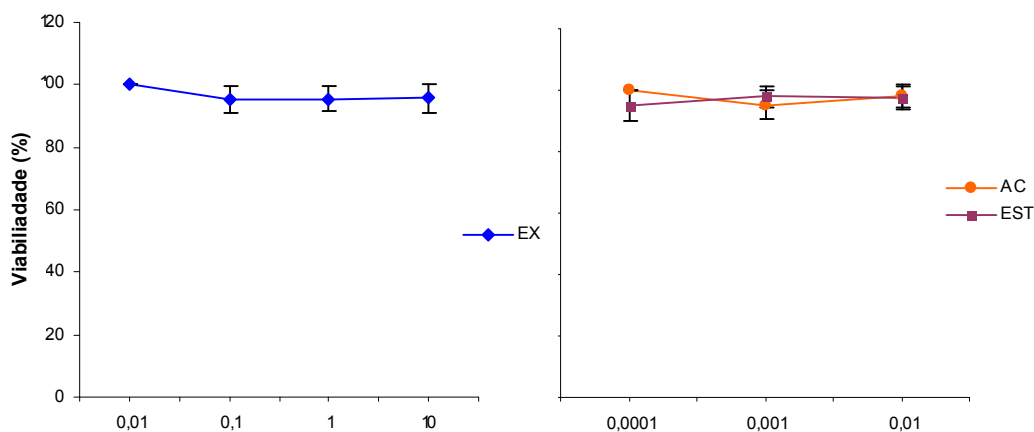
A liberação de células tumorais individuais ou em pequenos aglomerados parece estar relacionada ao fato de que tumores malignos têm suas células mais frouxamente aderidas umas às outras do que aquelas provenientes de tumores benignos, sendo, portanto, mais facilmente destacáveis. A base molecular desta redução de capacidade adesiva tem sido relacionada à diminuição da expressão de moléculas de adesão,

freqüentemente observada em células metastásicas (Reeves *et al.*, 2000) ou de seus receptores. Neste contexto, os efeitos do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre as propriedades de adesão de células HEP-2 quando mantidas em cultura tornaram-se relevantes como um modelo experimental preliminar.

#### 4.4.1. Toxicidade

Prioritariamente a realização dos ensaios de adesão e à semelhança dos leucócitos, excluiu-se a possibilidade dessas substâncias serem tóxicas para essas células, tratando-as com concentrações crescentes do extrato de *A. glabra* (0,01 a 10  $\mu\text{g/ml}$ ), de ácido caurenóico (0,0001 a 0,01  $\mu\text{M}$ ) e de esteviol (0,0001 a 0,01  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas, a 37°C. Em seguida, sua viabilidade foi observada com auxílio do corante azul de tripano.

Como ilustrado na Figura 14, nenhum dos tratamentos se mostrou tóxico nas condições experimentais utilizadas, mantendo a viabilidade, em média, superior a 95% quando comparada à população não-tratada (controle), normalizada em 100% (n = 3).



**Figura 14. Efeito do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre a viabilidade de células HEP-2.** Células HEP-2 foram tratadas com extrato de *A. glabra* (EX), ácido caurenóico (AC) e esteviol (EST) como indicado por 24 horas, a 37°C, em meio RPMI 1640, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino. Os pontos representam a porcentagem média  $\pm$  DP de células viáveis, verificada pelo teste de azul de tripano em relação ao controle, cuja viabilidade foi normalizada em 100% (n = 3).

Em contraste com nossos resultados e como já referido anteriormente, o efeito tóxico de algumas espécies da família Annonaceae já foram estudados, incluindo a *A. glabra* e o ácido caurenóico, que demonstraram atividade tóxica principalmente sobre linhagens de células de carcinoma. Neste contexto, potencial citotóxico de *A. purpurea* sobre células KB de nasofaringe (Camacho *et al.*, 2003) e de *A. muricata* sobre células U-937 (Jaramillo *et al.*, 2000) já foi descrito.

Estudos fitoquímicos demonstraram que esta família apresenta, em seus extratos, polifenóis, quercetina, alcalóides (Leboeuf *et al.*, 1975), flavonóides (Santos *et al.*, 2000), acetogeninas e diterpenos. As acetogeninas annoglaxina e 27-hidroxibullatacina, isoladas de *A. glabra*, demonstraram atividade tóxica sobre células tumorais de mama, rim, próstata e pâncreas (Liu *et al.*, 1999) e sobre linhagem celular de hepatoma humano, sendo esta ação causada pela diminuição do potencial transmembrânico de mitocôndrias, induzindo a uma apoptose prematura (Chen *et al.*, 2004).

Um grande número de diterpenos já foi caracterizado em relação ao potencial antitumoral, sendo o paclitaxel, extraído de *Taxus brevifolia*, um exemplo dessa classe de compostos, atualmente uma das principais armas no tratamento contra o câncer (Kumar *et al.*, 2004). De forma mais restrita, poucos são os estudos que relatam atividade antitumoral do ácido caurenóico. Neste sentido, quando extraído de *A. glabra*, demonstrou inibição da proliferação de células de câncer de fígado por aumento do índice de apoptose na concentração de 25  $\mu$ M, com inibição da expressão do gene *bcl-2* e aumento da expressão do gene *bax* (Zhang *et al.*, 2004). Sua atividade genotóxica sobre fibroblastos de pulmão de hamster chinês (Cavalcanti *et al.*, 2006) também foi recentemente descrita.

Para o esteviol, a literatura relata estudos particularmente controversos sobre o seu potencial mutagênico. Por exemplo, Pezzuto e colaboradores apontaram uma atividade mutagênica sobre linhagens de *Salmonella typhimurium* TM677, sendo este resultado favorecido pela presença de uma hidroxila no carbono 13 e de uma ligação insaturada entre os carbonos 16 e 17 na estrutura química da molécula (Pezzuto *et al.*, 1985). Terai e colaboradores (2002) confirmaram o efeito mutagênico do esteviol e apontaram o 15-oxo-esteviol como o metabólito responsável por esta ação. Efeitos tóxicos e

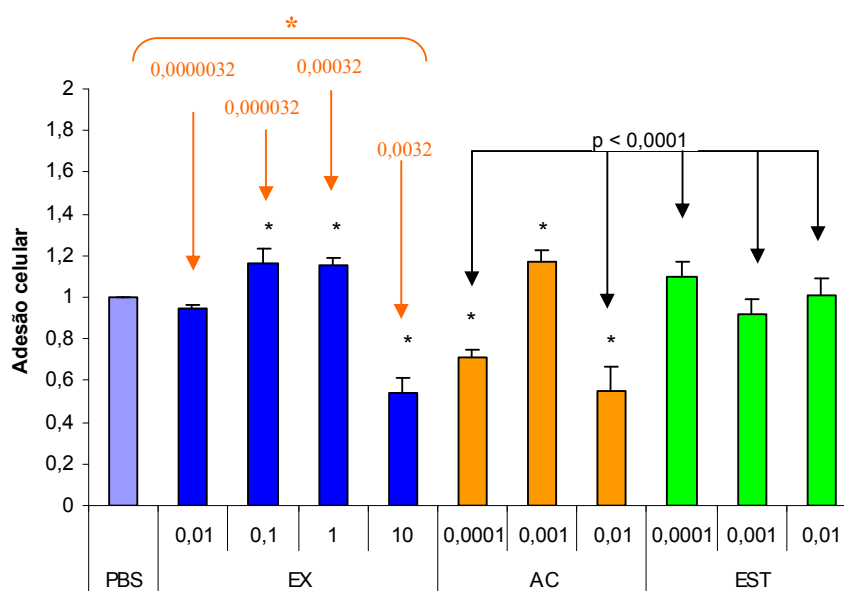
teratogênicos em hamsters também já foram relatados (Wasuntarawat *et al.*, 1998). Em contraste, o grupo de Suttajit (1993), usando *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 e cultura de linfócitos humanos, não demonstrou atividade mutagênica para o esteviol (Suttajit *et al.*, 1993). Sekihashi e colaboradores (2002), usando o teste do cometa para avaliar o potencial genotóxico do esteviol sobre células TK6 e WTK1, também não evidenciaram nenhuma atividade de dano ao ADN. Da mesma forma, não foram observados danos ao ADN sobre órgãos de camundongos após administração de várias concentrações de esteviol (Sekihashi *et al.*, 2002).

O fato de nenhuma dessas substâncias afetar a viabilidade das células HEp-2 nas condições experimentais empregadas neste estudo, primeiro, confirma sua característica de robustez *in vitro* já descrita, o que pode não ser o perfil das linhagens celulares utilizadas nos outros estudos. É interessante notar que as células HEp-2 proliferam abundantemente *in vitro* na ausência de CO<sub>2</sub>, qualidade esta não apreciada pela maioria das linhagens celulares acima citadas, as quais, se para sobreviver em condições artificiais são totalmente dependentes de uma tensão relativamente baixa de CO<sub>2</sub>, quanto mais para proliferar indefinidamente. Além disso, e certamente o ponto mais importante para as discrepâncias entre os resultados desse estudo com os citados na literatura, seja o fato de que, para esses, o tempo de exposição dessas células aos agentes seja superior ao utilizado neste trabalho, o qual se limitou a 24 horas, em contraste com o período de 48 ou 72 horas geralmente adotado para estudos de citotoxicidade. De qualquer forma, a ausência de efeitos tóxicos permitiu seu uso como modelo, com a finalidade de se investigar a ação dessas substâncias sobre suas propriedades de aderência.

#### 4.4.2. Adesão celular

Os efeitos dessas substâncias sobre a interação de células HEp-2 com a base do frasco de cultura foram avaliados logo após seu sub-cultivo, onde 10<sup>5</sup> células foram expostas a concentrações crescentes do extrato de *A. glabra* (0,01 a 10 µg/ml), de ácido caurenóico (0,0001 a 0,01 µM) e de esteviol (0,0001 a 0,01 µM) por 24 horas, tempo este suficiente para que essas células tornem-se aderidas à base do frasco.

Conforme ilustrado na Figura 15, o extrato de *A. glabra* e o ácido caurenóico demonstraram interferir de forma significativa na adesão espontânea de células HEp-2 a superfícies sólidas na maioria das concentrações testadas, em contraste com o esteviol, cuja população permaneceu inalterada.



**Figura 15. Efeito do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre a adesão de células HEp-2 à base dos frascos de cultura.** Células HEp-2 foram tratadas com as concentrações indicadas do extrato de *A. glabra* (EX -  $\mu\text{g/ml}$ ), ácido caurenóico (AC -  $\mu\text{M}$ ) e esteviol (EST -  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas a 37°C. Cada coluna representa o índice médio de adesão celular  $\pm$  EPM em relação ao controle (PBS) de, pelo menos, quatro experimentos independentes, realizados em triplicata, obtida após fotomicrografia e análise de imagem pelo programa UTHSCSA *ImageToll for Windows*, versão 3.00. \* $p \leq 0,05$  em relação controle (ANOVA, seguida do teste de Tukey). [\*] Concentração de ácido caurenóico ( $\mu\text{M}$ ) no extrato.

Nas concentrações de 0,1 e 1 µg/ml do extrato e de 0,001 µM do ácido caurenóico, observou-se o máximo de estímulo, com índices de adesão de  $1,16 \pm 0,08$ ,  $1,15 \pm 0,03$  e  $1,18 \pm 0,05$  em relação ao controle, respectivamente ( $n = 4$ ;  $p \leq 0,05$ ). Já a 10 µg/ml de extrato e a 0,0001 e 0,01 µM de ácido caurenóico, os efeitos na adesão foram significativamente inibitórios ( $n = 4$ ;  $p \leq 0,05$ ), com somente cerca da metade da população mantendo-se aderida ( $0,54 \pm 0,07$ ;  $0,71 \pm 0,04$  e  $0,55 \pm 0,11$ , respectivamente) quando comparada à população não tratada.

A interação de células com substratos sólidos é fundamental para que ocorra uma série de funções vitais como adesão, proliferação, migração e diferenciação. Estes substratos são representados pela MEC, composta por uma variedade de macromoléculas secretadas localmente, incluindo fibronectina e vitronectina, dentre outras, formando uma rede organizada, em estreita associação com a superfície celular que a produz, a qual, além de servir como suporte, possui múltiplas funções biológicas.

Neste contexto, a adesão de células normais de uma forma geral, e de células tumorais em particular, entre si e entre elas e a matriz que as suporta é decorrente da sua interação com moléculas de adesão por meio de receptores apropriados (Akiyama *et al.*, 1990), expressos tanto nas células, como nas paredes dos vasos e na MEC.

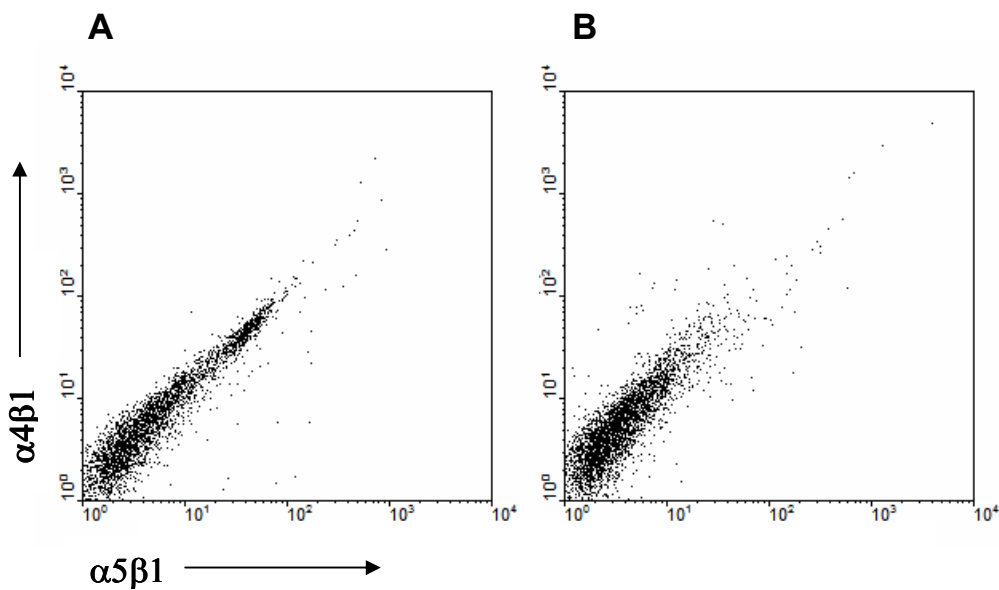
Como os resultados demonstraram que tanto o extrato de *A. glabra* como o ácido caurenóico colaboraram significativamente para aumentar a aderência de células HEp-2 à base do frasco de cultura, formulou-se a hipótese de que essas substâncias pudessem aumentar a adesão de células tumorais ao substrato de tal forma que minimizaria, ou mesmo impediria, seu desligamento, com conseqüente inibição da formação de metástases, por meio da modulação da expressão de receptores de integrinas. Assim, investigou-se nessas células a expressão de  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$ , dois receptores que medeiam não só a interação intercelular, mas também entre as células e algumas proteínas abundantes não só na MEC como também na superfície de células HEp-2 (Cotter *et al.*, 1998), como a fibronectina e o colágeno.

#### 4.4.3. Expressão de moléculas de adesão

A citometria de fluxo é um método bastante utilizado para se investigar a presença de moléculas sobre a superfície celular. Neste trabalho, foi usada para se observar os efeitos do extrato de *A. glabra*, do ácido caurenóico e do esteviol sobre a atividade imunomoduladora de linfócitos humanos como anteriormente visto, e também para investigar a expressão de  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$ . Para tanto, células HEp-2 foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para esses antígenos após serem expostas, por 24 horas, a 37 °C, a 1 e 10  $\mu\text{g/ml}$  do extrato de *A. glabra*, 0,001 a 0,01  $\mu\text{M}$  de ácido caurenóico e 0,001 a 0,01  $\mu\text{M}$  de esteviol. Como ilustrado na Figura 16, células HEp-2 não expressam as proteínas  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$  em sua superfície e nenhum dos tratamentos efetuados alterou esta condição.

Com esta série de experimentos não foi possível esclarecer quais os mecanismos responsáveis pelo aumento significativo da adesão de células HEp-2 à base do frasco de cultura. É possível que a aderência espontânea dessas células em cultura se dê pela própria secreção de moléculas adesivas, como a fibronectina, por exemplo, e que ambos os tratamentos com o extrato de *A. glabra* e com o ácido caurenóico tenham favorecido a síntese dessas ou outras moléculas.

Muitas células tumorais expressam, de fato, receptores da família das integrinas em sua superfície e uma boa fração das interações entre células tumorais e a membrana basal é mediada por essas moléculas. Entretanto, estudos utilizando anticorpos monoclonais demonstraram que colágenos tipo I e IV, laminina e fibronectina estão presentes na superfície de células HEp-2 (Cotter *et al.*, 1998) como já citado. Interessante neste caso seria comparar a expressão de algumas proteínas adesivas em células HEp-2 antes e após tratamento com essas substâncias. Além disso, investigar o comportamento adesivo dessas células usando fibronectina, colágeno e vitronectina, por exemplo, imobilizadas previamente na base do frasco de cultura poderia esclarecer se há a colaboração do extrato de *A. glabra* e do ácido caurenóico nesta atividade, uma vez que essas proteínas são capazes de ativar células com respeito à modulação de sua secreção, como também na expressão de receptores para interação.



**Figura 16. Expressão de moléculas de adesão em células HEP-2.** Células HEP-2 foram tratadas por 24 horas, a 37 °C, com extrato de *A. glabra* (1 e 10 µg/ml), ácido caurenóico (0,001 e 0,01 µM) ou esteviol (0,001 e 0,01 µM). Em seguida, foram marcadas com anticorpos monoclonais anti- $\alpha_4\beta_1$ -PE e anti- $\alpha_5\beta_1$ -FITC e a expressão avaliada por citometria de fluxo. **(A)** população não-tratada (controle); **(B)** população tratada com 0,001 µM de ácido caurenóico.

#### 4.5. ÁCIDO CAURENÓICO E ESTEVIOL: ESTRUTURA QUÍMICA X ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A Tabela 3 resume as atividades biológicas avaliadas neste trabalho através de diferentes sistemas e os efeitos decorrentes do tratamento com ácido caurenóico e esteviol, os quais diferem entre si estruturalmente por uma hidroxila no carbono 13 do anel terpênico.

A primeira diferença interessante refere-se ao perfil de toxicidade com relação às populações ensaiadas, apresentando-se o ácido caurenóico inócuo tanto para GNC humanos como para a linhagem HEP-2 até a concentração de 100 µM, em contraste com os MNC, que se tornaram inviáveis nesta concentração. Para os náuplios de *A. salina*, observou-se que, dentro do intervalo de concentração ensaiado, o ácido caurenóico apresentou CL<sub>50</sub> de 54,4µM, enquanto a CL<sub>50</sub> para o esteviol encontra-se em concentrações superiores a 100µM. Os efeitos sobre a quimiotaxia de GNC, a 1,0 µM, foram antagonísticos e somente o ácido caurenóico interferiu na adesão natural de células HEP-2 ao plástico.

**Tabela 3. Atividades biológicas do ácido caurenóico e do esteviol.**

Ensaio		Ácido caurenóico ( $\mu\text{M}$ )	Esteviol ( $\mu\text{M}$ )
Toxicidade	MNC	$\geq 100$	-
	GNC	-	-
	HEp-2	-	-
	<i>A. salina</i> *	54,4	> 100
Imunomodulação		-	-
Quimiotaxia de GNC		$\uparrow 0,001$ e $0,01$ $\downarrow 1,0$	$\uparrow 1,0$
Adesão de HEp-2		$\uparrow 0,001$ $\downarrow 0,0001$ e $0,01$	-

( $\uparrow$ ) estímulo; ( $\downarrow$ ) inibição e (-) ausência de atividade; \*  $\text{CL}_{50}$ .

O conceito de similaridade, onde substâncias são agrupadas de acordo com seus efeitos biológicos ou propriedades físico-químicas, tem sido extensivamente aplicado, particularmente no que se refere à busca de substâncias farmacologicamente ativas. Além disso, o estudo da relação estrutura-atividade e dos mecanismos moleculares de ação é de fundamental importância para um melhor entendimento dos variados efeitos de um composto químico no ambiente e seus efeitos diretos na saúde humana (Bender *et al.*, 2004).

Uma das principais metas concernente ao desenvolvimento de novos fármacos é identificar substâncias químicas que possam ter a habilidade de se ligar a uma molécula alvo e desencadear uma resposta biológica específica. Neste aspecto, as interações de uma célula com outras células ou com o ambiente à sua volta, bem como os mecanismos envolvidos nesses fenômenos, são complexos e, de um modo geral ocorrem através de interações ligante-receptor.

A informática molecular, como um paradigma, associa vários conceitos, informações e suposições para predizer a interação de moléculas com receptores biológicos e a eficácia dessa relação (Bender *et al.*, 2004). Em adição, a relação entre estrutura e atividade tem sido utilizada para predizer se

uma substância é dotada de uma ou mais atividades biológicas, determinando seu potencial farmacológico (Arena *et al.*, 2004).

A atividade biológica de um composto reside nas características químicas estruturais da molécula. Alguns dos fatores que determinam, por exemplo, os efeitos tóxicos de compostos químicos estranhos em sistemas biológicos são: (1) suas características moleculares relacionadas ao tamanho, simetria, forma e outras propriedades relacionadas à sua estrutura; (2) características da estrutura eletrônica isoladamente ou em combinação com outras moléculas; (3) propriedades físico-químicas, especialmente relacionadas à solubilidade; e (4) propriedade de interferir nos processos normais e atividade em nível molecular (mecanismo de ação) (McKinney, 1985).

O ácido caurenóico e o esteviol, por pertencerem a uma classe de compostos que vêm, ao longo da última década, demonstrando diversidade de efeitos biológicos, têm sido alvo de várias modificações estruturais, com o objetivo de, por um lado, potencializar alguns dos efeitos descritos ou, por outro, torná-los menos tóxicos ou, ainda, como protótipos para desenvolvimento de novas moléculas bioativas (Rates, 2001), aspectos esses amplamente explorados na revisão recentemente publicada por García e colaboradores (2007).

Ensaio biológicos rápidos, como aqueles que avaliam a inibição das comunicações intercelulares ou da polimerização da tubulina, que observam a modulação da apoptose ou indução da proliferação, como os descritos neste trabalho, têm sido utilizados com o objetivo de se avaliar, de forma preliminar, o potencial farmacológico de substâncias puras ou misturas. A associação de alguns desses ensaios é amplamente utilizada como *screening*, no sentido de selecionar bioativos, ou moléculas associadas com toxicidade, que possam ser usados como alvos farmacologicamente estratégicos (Combes, 2000).

Neste trabalho, modelos clássicos foram empregados para avaliar algumas atividades biológicas do extrato de *Annona glabra* Linn, do ácido caurenóico dele purificado e do esteviol, obtido de *S. rebaudiana*. Entretanto, em nenhum dos ensaios realizados foi possível estabelecer os mecanismos que levaram às diferenças de comportamento observadas. Mas, se de um lado, esta lacuna ficou por ser preenchida, por outro lado, algumas das ações observadas ainda não foram relatadas e, dessa forma, associadas a outras informações já

descritas, reúnem uma base rica de dados científicos importantes que estimulam investigações futuras, não só para esclarecer os mecanismos de ação envolvidos, mas também para contribuir na busca de drogas com valor terapêutico.

No Brasil, há cerca de cem mil espécies vegetais catalogadas, mas somente cerca de 8% foram estudadas quanto a sua composição química, e estima-se que pouco mais de mil espécies tenham sido avaliadas quanto às propriedades terapêuticas (Varanda, 2006). Dessa forma, grande parte de fitoderivados, em especial aqueles provenientes de plantas nativas, não foi analisado cientificamente quanto aos seus efeitos, sua eficácia e à segurança de sua utilização. Portanto, é importante que estudos como o aqui relatado sejam realizados, não só pelo esclarecimento que eles podem trazer à população que os utiliza, mas também porque se tem no Brasil uma riqueza natural de difícil medida, que certamente nos trará, não só divisas científicas quando estudada, mas certamente nos levará a superar a vigente dependência externa por parte da indústria farmacêutica brasileira.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho e as considerações que deles puderam ser derivadas permitem concluir que:

- o extrato de *A. glabra* e o esteviol não apresentam toxicidade para leucócitos humanos e células HEp-2 até a concentração de 100  $\mu\text{M}$ , enquanto o ácido caurenóico, nessa mesma concentração, compromete significativamente a viabilidade de MNC;
- o extrato de *A. glabra* inibe a quimiotaxia natural de granulócitos, de acordo com a dose, sugerindo potencial antiinflamatório;
- o ácido caurenóico (0,001 a 0,01  $\mu\text{M}$ ) e o esteviol (0,1  $\mu\text{M}$ ) apresentam atividade indutora da migração de granulócitos, sendo a atividade do esteviol, pelo menos, 100 vezes inferior à do ácido caurenóico;
- o extrato de *A. glabra*, o ácido caurenóico e o esteviol não apresentam atividade imunomodulatória, avaliada sobre a transformação blástica e a proliferação de linfócitos humanos, basal e estimulada por fitohemaglutinina;
- o ácido caurenóico apresenta atividade tóxica sobre náuplios de *Artemia salina*, com  $\text{CL}_{50}$  de 54,4  $\mu\text{M}$ ;
- o extrato de *A. glabra* e o ácido caurenóico interferem na adesão de células de carcinoma epidermóide de laringe humana sobre matriz plástica, de forma dependente da dose, mas esta ação não é resultante da expressão das integrinas  $\alpha_4\beta_1$  e  $\alpha_5\beta_1$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akiyama, S.K., K. Nagata, e K.M. Yamada. 1990. Cell surface receptors for extracellular matrix components. *Biochem Biophys Acta*. 1031:91-110.
- Alali, F.Q., X.X. Liu, e J.L. McLaughlin. 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J Nat Prod*. 62:504-40.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, e J.D. Watson. 1994. Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc., New York.
- Alves, T.M., P.P. Chaves, L.M. Santos, T.J. Nagem, S.M. Murta, I.P. Ceravolo, A.J. Romanha, e C.L. Zani. 1995. A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med*. 61:85-7.
- Arena, V.C., N.B. Sussman, S. Mazumdar, S. Yu, e O.T. Macina. 2004. The utility of structure-activity relationship (SAR) models for prediction and covariate selection in developmental toxicity: comparative analysis of logistic regression and decision tree models. *SAR QSAR Environ Res*. 15:1-18.
- Arnaout, M.A. 1990. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules (CD18/CD11). *Blood*. 75:1037-1050.
- Balunas, M.J., e A.D. Kinghorn. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci*. 78:431-41.
- Barroso, G.M., E.F. Guimarães, C.L.F. Ichaso, C.G. Costa, e A.L. Peixoto. 1978. Annonaceae. LTC/EDUSP, São Paulo. p 29-33.
- Batista, R., J.L. Humberto, E. Chiari, e A.B. Oliveira. 2007. Synthesis and trypanocidal activity of ent-kaurane glycosides. *Bioorg Med Chem*. 15:381-91.
- Ben-Baruch, A., D.F. Michiel, e J.J. Oppenheim. 1995. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem*. 270:11703-6.
- Bender, A., e R.C. Glen. 2004. Molecular similarity: a key technique in molecular informatics. *Org Biomol Chem*. 2:3204-18.
- Block, L.C., A.R.S. Santos, M.M. Souza, C. Scheidt, R.A. Yunes, M.A. Santos, F. Monache, e V. Cechinel. 1998. Chemical and pharmacological examination of anti-conceptive constituents of *Wedelia paludosa*. *J Ethnopharmac*. 61:85-89.
- Boeck, P., M.M. Sa, B.S. Souza, R. Cercená, A.M. Escalante, S.A. Zacchino, V.C. Filho, e R.A. Yunes. 2005. A simple synthesis of kaurenoic esters and other derivatives and evaluation of their antifungal activity. *J. Braz. Chem. Soc.* . 16:1360-1366.
- Bokoch, G.M. 1995. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*. 86:1648-1660.
- Boyden, S. 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*. 115:453-66.
- Brandley, B.K., S.J. Swiedler, e P.W. Robbins. 1990. Carbohydrate ligands of the LEC cell adhesion molecules. *Cell*. 63:861-3.
- Broxmeyer, H.E., e C.H. Kim. 1999. Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. *Exp Hematol*. 27:1113-23.
- Brunner, K.T., J. Mauel, J.C. Cerottini, e B. Chapuis. 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*. 14:181-196.

- Burgermeister, E., J. Endl, e W.V. Scheuer. 2003. Activation of cytosolic phospholipase A2 in human T-lymphocytes involves inhibitor-kappaB and mitogen-activated protein kinases. *Eur J Pharmacol.* 466:169-180.
- Burridge, K., K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls, e C. Turner. 1988. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol.* 4:487-525.
- Buss, A.D., e R.D. Waigh. 1995. Burger's medical chemistry and drug discovery. *In* Natural compounds as leads for new pharmaceuticals. John Wiley & Sons, Oxford. 983-1033.
- Calixto, J.B. 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res.* 33:179-189.
- Camacho, M.R., J.D. Phillipson, S.L. Croft, P.N. Solis, S.J. Marshall, e S.A. Ghazanfar. 2003. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *J Ethnopharmacol.* 89:185-91.
- Cantrell, D.A., e K.A. Smith. 1984. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science.* 224:1312-1316.
- Carballo, J.L., Z.L. Hernandez-Inda, P. Perez, e M.D. Garcia-Gravalos. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* 2:17.
- Cassatella, M.A. 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today.* 16:21-6.
- Cavalcanti, B.C., L.V. Costa-Lotufo, M.O. Moraes, R.R. Burbano, E.R. Silveira, K.M. Cunha, V.S. Rao, D.J. Moura, R.M. Rosa, J.A. Henriques, e C. Pessoa. 2006. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food Chem Toxicol.* 44:388-392.
- Carvalho, P.B., e E.I. Ferreira. 2001. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia.* 72:599-618.
- Chang, F.R., P.Y. Yang, J.Y. Lin, K.H. Lee, e Y.C. Wu. 1998. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. *J Nat Prod.* 61:437-9.
- Chavez, P.I., L.A. Sánchez, F.A. Gonzáles, J.L. Rodríguez, e F. Axelrod. 1997. Cytotoxicity correlations of Puerto Rican plants using a simplified brine shrimp lethality screening procedure. *Int J Pharmacogn.* 35:222-226.
- Chen, C.H., T.J. Hsieh, T.Z. Liu, C.L. Chern, P.Y. Hsieh, e C.Y. Chen. 2004. Annoglabayin, a novel dimeric kaurane diterpenoid, and apoptosis in Hep G2 cells of annomontacin from the fruits of *Annona glabra*. *J Nat Prod.* 67:1942-6.
- Chen, C.Y., F.R. Chang, C.P. Cho, e Y.C. Wu. 2000. ent-Kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. *J Nat Prod.* 63:1000-3.
- Chen, X., J. Oppenheim, e O.M. Howard. 2001. Shikonin, a component of antiinflammatory Chinese herbal medicine, selectively blocks chemokine binding to CC chemokine receptor-1. *Int Immunopharmacol.* 1:229-36.
- Chung, C.Y., G. Potikyan, e R.A. Firtel. 2001. Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAKa. *Mol Cell.* 7:937-47.
- Colombo, M.L., C. Bugatti, A. Mossa, N. Pescalli, L. Piazzoni, G. Pezzoni, E. Menta, S. Spinelli, F. Johnson, R.C. Gupta, e L. Dasaradhi. 2001. Cytotoxicity evaluation of natural coptisine and synthesis of coptisine from berberine. *Farmaco.* 56:403-9.

- Combes, R.D. 2000. The use of structure-activity relationships and markers of cell toxicity to detect non-genotoxic carcinogens. *Toxicol In Vitro*. 14:387-99.
- Cooper, H.L. 1972. Studies on RNA metabolism during lymphocyte activation. *Transplant Rev*. 11:3-38.
- Costa-Lotufo, L.V., G.M. Cunha, P.A. Farias, G.S. Viana, K.M. Cunha, C. Pessoa, M.O. Moraes, E.R. Silveira, N.V. Gramosa, e V.S. Rao. 2002. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon*. 40:1231-234.
- Cotran, R.S., V. Kumar, e S.L. Robbins. 1994. Robbins - Pathologic basis of disease. W. B. Saunders Co., Philadelphia. 1400 pp.
- Cotter, G., R. Weedle, e K. Kavanagh. 1998. Monoclonal antibodies directed against extracellular matrix proteins reduce the adherence of *Candida albicans* to HEp-2 cells. *Mycopathologia*. 141:137-42.
- Cragg, G.E., e A.K. Kerman. 2005. Complex chemical potential: signature of decay in a bose-einstein condensate. *Phys Rev Lett*. 94:190402.
- Croat, T. 1978. Flora of Barro Colorado Island. Stanford University Press, Stanford. 943 pp.
- Dekker, L.V., e A.W. Segal. 2000. Perspectives: signal transduction. Signals to move cells. *Science*. 287:982-3, 985.
- Doherty, D.E., P.M. Henson, e R.A. Clark. 1990. Fibronectin fragments containing the RGDS cell-binding domain mediate monocyte migration into the rabbit lung. A potential mechanism for C5 fragment-induced monocyte lung accumulation. *J Clin Invest*. 86:1065-75.
- Dudez, T.S., M. Chanson, S.E. Schlegel-Haueter, e S. Suter. 2002. Characterization of a novel chemotactic factor for neutrophils in the bronchial secretion of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 186:774-781.
- Eldin, S., e A. Dunfors. 2001. Fitoterapia na atenção primária à saúde. Manole, São Paulo. 163 pp.
- Engel, J., e D.J. Prockop. 1991. The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. *Annu Rev Biophys Chem*. 20:137-52.
- Feske, S., R. Draeger, H.H. Peter, K. Eichmann, e A. Rao. 2000. The duration of nuclear residence of NFAT determines the pattern of cytokine expression in human SCID T cell. *J Immunol*. 165:297-305.
- Florão, A. 2006. Avaliação de atividades biológicas de óleos essenciais de quatro espécies de *Baccharis*, Asteraceae. In Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba - Paraná. 80 pp.
- Fontana, J.D., F.M. Lancas, e M. Passos. 1998. Selective polarity and absorption-guided extraction/purification of polar acetogenins and biological assay against agricultural pests. *Appl. Biotechnol. Biotechnol*. 70-72:67-76.
- Franks, L.M., e N.M. Teich. 1997. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Oxford University Press, Oxford. 458 pp.
- Garcez, F.R., W.S. Garcez, M. Martins, M.F. Matos, Z.R. Guterres, M.S. Mantovani, C.K. Misu, e S.T. Nakashita. 2005. Cytotoxic and genotoxic butanolides and lignans from *Aiouea trinervis*. *Planta Med*. 71:923-7.

- García, P.A., A.B. Oliveira, e R. Batista. 2007. Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. *Molecules*. 12:455-483.
- Gery, I., e B.H. Waksman. 1972. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). *J Exp Med*. 136:143-155.
- Ghisalberti, E.L. 1997. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia*. 68:303-325
- Gillis, S., M.M. Ferm, W. Ou, e K.A. Smith. 1978. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol*. 120:2027-2032.
- Goody, R.J., e I. Kitchen. 2001. Influence of maternal milk on functional activation of delta-opioid receptors in postnatal rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 296:744-8.
- Grabley, S., e R. Thiericke. 1999. Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 64:101-54.
- Greaves, M., e G. Janossy. 1972. Elicitation of selective T and B lymphocyte responses by cell surface binding ligands. *Transplant Rev*. 11:87-130.
- Hallet, M.B., E.V. Davies, e A.K. Campbell. 1990. Oxidase activation in individual neutrophils is dependent on the onset and magnitude of the  $Ca^{2+}$  signal. *Cell Calcium*. 11:655-663.
- Hayes, A.J., e B. Markovic. 2002. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 40:535-43.
- Hofbauer, R., M. Frass, B. Gmeiner, S. Handler, W. Speiser, e S. Kapiotis. 1999. The green tea extract epigallocatechin gallate is able to reduce neutrophil transmigration through monolayers of endothelial cells. *Wien Klin Wochenschr*. 111:278-82.
- Hofbauer, R., M. Frass, B. Gmeiner, A.D. Kaye, e E.A. Frost. 2001. Effects of garlic extract (*Allium sativum*) on neutrophil migration at the cellular level. *Heart Dis*. 3:14-7.
- Homolka, J., M.W. Ziegenhagen, K.I. Gaede, P. Entzian, G. Zissel, e J. Muller-Quernheim. 2003. Systemic immune cell activation in a subgroup of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration*. 70:262-269.
- Hynes, R.O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 48:549-54.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69:11-25.
- Ihantola-Vormisto, A., J. Summanen, H. Kankaanranta, H. Vuorela, Z.M. Asmawi, e E. Moilanen. 1997. Anti-inflammatory activity of extracts from leaves of *Phyllanthus emblica*. *Planta Med*. 63:518-24.
- Janeway, C.A. 2002. *Imunologia: o sistema imunológico na saúde e na doença*. Artmed, Porto Alegre. 767 pp.
- Janossy, G., e M.F. Greaves. 1972. Lymphocyte activation. II. Discriminating stimulation of lymphocyte subpopulations by phytomitogens and heterologous anti-lymphocyte sera. *Clin Exp Immunol*. 10:525-536.
- Jaramillo, M.C., G.J. Arango, M.C. Gonzalez, S.M. Robledo, e I.D. Velez. 2000. Cytotoxicity and anti-leishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia*. 71:183-6.

- Jarma, A., T. Rengifo, e H. Araméndiz-Tatis. 2006. Physiology of stevia (*Stevia rebaudiana*) regarding radiation near the Colombian Caribbean coast. II. Growth analysis. *Agronom colombiana*. 24:38-47.
- Jeppesen, P.B., S. Gregersen, C.R. Poulsen, e K. Hermansen. 2000. Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup>-channel activity. *Metabolism*. 49:208-14.
- Johansson, S., U. Goransson, T. Luijendijk, A. Backlund, P. Claeson, e L. Bohlin. 2002. A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. *J Nat Prod*. 65:32-41.
- Kubbies, M., D. Schindler, H. Hoehn, e P.S. Rabinovitch. 1985. Cell cycle kinetics by BrdU-Hoechst flow cytometry: an alternative to the differential metaphase labeling technique. *Cell Tissue Kinet*. 18:551-562.
- Kumar, R.A., K. Sridevi, N.V. Kumar, S. Nanduri, e S. Rajagopal. 2004. Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*. *J Ethnopharmacol*. 92:291-5.
- Lampugnani, M.G., e E. Dejana. 1997. Interendothelial junctions: structure, signaling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol*. 9:674.
- Lawrence, M.B., e T.A. Springer. 1991. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*. 65:859.
- Leboeuf, M., J. Streith, e A. Cave. 1975. Alkaloids of Annonaceae: alkaloids of the bark of *Cananga odorata* Hook. F. and Thomson. *Ann Pharm Fr*. 33:43-7.
- Lee, C., Q.H. Liu, B. Tomkowicz, B.D. Freedman, e R.G. Collman. 2003. Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways. *J Leukoc Biol*. 74:676-682.
- Lee, G.R., J. Foerster, J. Lukens, F. Paraskevas, J.P. Greer, e G.M. Rodgers. 1999. Wintrobe's clinical hematology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2367 pp.
- Lewis, S.L., e D.E. Van Epps. 1983. Demonstration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry. *Inflammation*. 7:363-75.
- Liu, X.X., E. Pilarinou, e J.L. McLaughlin. 1999. Two novel acetogenins, annoglaxin and 27-hydroxybullatacin, from *Annona glabra*. *J Nat Prod*. 62:848-52.
- Lyons, A.B. 2000. Analyzing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods*. 243:147-154.
- Mabberley, D.J. 1997. The plant-book. Cambridge University Press, New York. 858 pp.
- Macey, M.G. 1994. Flow cytometry - clinical applications. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 310 pp.
- Machado Jr., J., A. Florão, F.V.R. Mattana, F.H. Rocha, C.A.M. Santos, e A.M. Weffort-Santos. 2006. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacog*. 16:645-655.
- Mackai, I.R., e F.S. Rosen. 2000. T-cell function and migration. *N Engl J Med*. 343:1020-1034.

- Mans, D.R., A.B. Rocha, e G. Schwartzmann. 2000. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: target plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist*. 5:185-198.
- Mazurov, V.V., M.E. Solovieva, V.V. Leshchenko, A.G. Kruglov, E.F. Edelweiss, R.I. Yakubovskaya, e V.S. Akatov. 2003. Small heat shock protein hsp27 as a possible mediator of intercellular adhesion-induced drug resistance in human larynx carcinoma HEP-2 cells. *Biosci Rep*. 23:187-97.
- McCutcheon, M. 1955. Chemotaxis and locomotion of leukocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 59:941-4.
- McKinney, J.D. 1985. The molecular basis of chemical toxicity. *Environ Health Perspect*. 61:5-10.
- Melis, M.S. 1992. Stevioside effect on renal function of normal and hypertensive rats. *J Ethnopharmacol*. 36:213-7.
- Mendonca, F.A., K.F. Silva, K.K. Santos, K.A. Ribeiro Junior, e A.E. Sant'ana. 2005. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*. 76:629-636.
- Merchant, D., R. Kahn, e W. Murphy. 1964. Handbook of cell and organ culture. Burgess Publishing, Broken Arrow.
- Meyer, B.N., N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, e J.L. McLaughlin. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*. 45:31-4.
- Michael, A.S., C.G. Thompson, e M. Abramovicz. 1956. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. *Science*:123-464.
- Moore, A.E., L. Sabachewsky, e H.W. Toolan. 1955. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res*. 15:598-602.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*. 65:55-63.
- Muller, A.A., S.A. Reiter, K.G. Heider, e H. Wagner. 1999. Plant-derived acetophenones with antiasthmatic and anti-inflammatory properties: inhibitory effects on chemotaxis, right angle light scatter and actin polymerization of polymorphonuclear granulocytes. *Planta Med*. 65:590-4.
- Myers, R.L. 1995. Immunology - a laboratory manual. WCB Publishers, Dubuque. 133 pp.
- Newman, D.J., G.M. Cragg, e K.M. Snader. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*. 66:1022-37.
- Ohkoshi, E., S. Kamo, M. Makino, e Y. Fujimoto. 2004. ent-Kaurenoic acids from *Mikania hirsutissima* (compositae). *Phytochemistry*. 65:885-90
- Oliveira, B.H., A.E. Sant'Ana, e D.Z. Bastos. 2002. Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. *Phytochem Anal*. 13:368-71.
- Oppenheim, M.M., e D.L. Rosenstreich. 1976. Mitogens in immunobiology. Academic Press, New York.
- Ozaki, Y., T. Ohashi, e S. Kume. 1987. Potential of neutrophil function by recombinant DNA-produced interleukin 1a. *J Leukoc Biol*. 42:621-627.
- Padmaja, V., V. Thankamany, N. Hara, Y. Fujimoto, e A. Hisham. 1995. Biological activities of *Annona glabra*. *J Ethnopharmacol*. 48:21-4.

- Page, J.E., F. Balza, T. Nishida, e G.H. Neil Towers. 1992. Biologically active diterpenes from *Aspilia mossambicensis*, a chimpanzee medicinal plant. *Phytochem.* 31:3437-3439.
- Paiva, L.A., L.A. Gurgel, R.M. Silva, A.R. Tome, N.V. Gramosa, E.R. Silveira, F.A. Santos, e V.S. Rao. 2002. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffi* on acetic acid-induced colitis in rats. *Vascul Pharmacol.* 39:303-7.
- Parham, P. 2001. O sistema imune. Artmed, Porto Alegre. 372 pp.
- Pezzuto, J.M., C.M. Compadre, S.M. Swanson, D. Nanayakkara, e A.D. Kinghorn. 1985. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:2478-82.
- Presibella, M.M., L.D.B. Villas-Boas, K.M.S. Belletti, C.A.M. Santos, e A.M. Weffort-Santos. 2006. Comparison of chemical constituents of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert essential oil and its anti-chemotactic activity. *Braz Arc Biol Technol.* 49:717-724.
- Protection, L. 2004. Pond apple *Annona glabra* declared class 2. In Facts Sheets. Vol. PP58.
- Qu, J., K. Hosoi, T. Shimojima, T. Oi, e K. Ikeda. 1995. Effects of *f*-MLP and LPS on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> of peritoneal exudate polymorphonuclear leukocytes following onset of inflammation. *J Periodontal Res.* 30:153-8.
- Quesenberry, P.J., e G.A. Colvin. 2000. Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In Williams Hematology. Mc-Graw-Hill, New York. 153-174.
- Rabgaoui, N., M.C. Guerin, e J. Torreilles. 1994. Casein-derived peptides can modulate the production of 5-hydroxyeicosatetraenoic acid in human neutrophils. *Biochem Cell Biol.* 72:305-11.
- Rang, H.P., M.M. Dale, e J.M. Ritter. 2001. Farmacologia, Rio de Janeiro. 692 pp.
- Rao, A., C. Luo, e P.G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 15:707-747.
- Rao, Y.V., e R. Chakrabarti. 2005. Stimulation of immunity in Indian major carp *Catla catla* with herbal feed ingredients. *Fish Shellfish Immunol.* 18:327-334.
- Rates, S.M. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 39:603-13.
- Reeves, G., e I. Todd. 2000. Lecture notes on immunology. Blackwell Science, Oxford. 267 pp.
- Roitt, I.M., D.K. Male, e J. Brostoff. 2003. Imunologia. Manole, São Paulo. 481 pp.
- Santos, D.Y., e M.L. Salatino. 2000. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochem.* 55:567-73.
- Saúde, M. 1996. SUS - Construindo um modelo de atenção à saúde para a qualidade de vida (Relatório Final). In 10<sup>a</sup> Conferência Nacional de Saúde. Ministério da Saúde, Brasília. 28-29.
- Scott, M.J., J.J. Hoth, S.A. Gardner, J.C. Peyton, e W.G. Cheadle. 2003. Natural killer cell activation primes macrophages to clear bacterial infection. *Am Surg.* 69:679-686.
- Sekihashi, K., H. Saitoh, e Y. Sasaki. 2002. Genotoxicity studies of stevia extract and steviol by the comet assay. *J Toxicol Sci.* 27 Suppl 1:1-8.

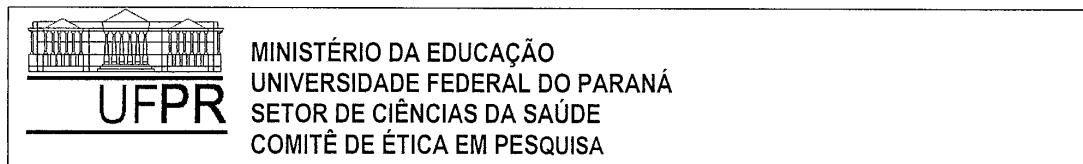
- Shalaby, M.R., B.B. Aggarwal, E. Ridernecht, L.P. Svedersky, B.S. Finkle, e M.A. Palladino. 1985. Activation of human polymorphonuclear functions by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *J Immunol.* 135:2069-2073.
- Shapiro, H.M. 1985. Practical flow cytometry. Alan R. Liss, New York.
- Shen, Y.C., C.J. Chou, W.F. Chiou, e C.F. Chen. 2001. Anti-inflammatory effects of the partially purified extract of radix *Stephaniae tetrandrae*: comparative studies of its active principles tetrandrine and fangchinoline on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Mol Pharmacol.* 60:1083-90.
- Shiomi, K., K. Hatae, Y. Yamaguchi, R. Masuma, H. Tomoda, S. Kobayashi, e S. Omura. 2002. New antibiotics miyakamides produced by a fungus. *J Antibiot (Tokyo).* 55:952-61.
- Siddiqui, R.A., L.P. Akard, J.G. Garcia, Y. Cui, e D. English. 1999. Chemotactic migration triggers IL-8 generation in neutrophilic leukocytes. *J Immunol.* 162:1077-83.
- Simmons, D.L. 1995. The role of ICAM expression in immunity and disease. *Cancer Surveys: cell adhesion and cancer.* 25:141.
- Slimestrad, R., A. Marston, S. Mavi, e K. Hostettmann. 1995. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. *Planta Med.* 61:562-563.
- Smith, C.W., J.C. Hollers, R.A. Patrick, e C. Hassett. 1979. Motility and adhesiveness in human neutrophils. Effects of chemotactic factors. *J Clin Invest.* 63:221-229.
- Smith, K.A., e D.A. Cantrell. 1985. Interleukin-2 regulates its own receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:864-868.
- Solis, P.N., C.W. Wright, M.M. Anderson, M.P. Gupta, e J.D. Phillipson. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Med.* 59:250-2.
- Solyomossy, M., Z. Nagy, G. Toth, e F. Antoni. 1986. Interaction of casein with human polymorphonuclear cells. *Biochem Med Metab Biol.* 35:293-301.
- Springer, T.A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 346:425-434.
- Springer, T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 76:301-14.
- Suttajit, M., U. Vinitketkaumnun, U. Meevatee, e D. Buddhasukh. 1993. Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Environ Health Perspect.* 101 Suppl 3:53-6.
- Szabo, I., X.H. Chen, L. Xin, M.W. Adler, O.M. Howard, J.J. Oppenheim, e T.J. Rogers. 2002. Heterologous desensitization of opioid receptors by chemokines inhibits chemotaxis and enhances the perception of pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:10276-81.
- Taub, D.D., e J.J. Oppenheim. 1994. Chemokines, inflammation and the immune system. *Ther Immunol.* 1:229-46.
- Terai, T., H. Ren, G. Mori, Y. Yamaguchi, e T. Hayashi. 2002. Mutagenicity of steviol and its oxidative derivatives in *Salmonella typhimurium* TM677. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 50:1007-10.
- Thelen, M., B. Dewald, e M. Baggiolini. 1993. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol Reviews.* 73:797-821.

- Tirapelli, C.R., S.R. Ambrosio, F.B. Costa, S.T. Coutinho, D.C. Oliveira, e A.M. Oliveira. 2004. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 492:233-41.
- Toskulkao, C., M. Sutheerawattananon, e P. Piyachaturawat. 1995. Inhibitory effect of steviol, a metabolite of stevioside, on glucose absorption in averted hamster intestine *in vitro*. *Toxicol Lett.* 80:153-9.
- Trama, J., Q. Lu, R.G. Hawley, e S.N. Ho. 2000. The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner. *J Immunol.* 165:4884-4894.
- Varanda, E.A. 2006. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Rev Ciênc Farm Bas Apl.* 27:1-7.
- Veiga, S.S., M. Elias, W. Gremski, M.A. Porcionatto, R. Silva, H.B. Nader, e R.R. Brentani. 1997. Post-translational modifications of alpha5beta1 integrin by glycosaminoglycan chains. The alpha5beta1 integrin is a facultative proteoglycan. *J Biol Chem.* 272:12529-35.
- Velikova, M., V. Bankova, I. Tsvetkova, A. Kujungiev, e M.C. Marcucci. 2000. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia.* 71:693-6.
- Vieira, H.S., J.A. Takahashi, e M.A. Boaventura. 2002. Novel derivatives of ent-17,19-dihydroxy-16betaH-kaurane obtained by biotransformation with *Verticillium lecanii*. *J Agric Food Chem.* 50:3704-7.
- Wagner, H. 1989. Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. *Planta Med.* 55:235-41.
- Wang, F.I., J.W. Yang, S.Y. Hung, e I.J. Pan. 2001. *In vitro* migratory responses of swine neutrophils to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Exp Anim.* 50:139-45.
- Wasuntarawat, C., P. Temcharoen, C. Toskulkao, P. Mungkornkarn, M. Suttajit, e T. Glinsukon. 1998. Developmental toxicity of steviol, a metabolite of stevioside, in the hamster. *Drug Chem Toxicol.* 21:207-22.
- WHO. 2002a. Herbal Medicines. *WHO Drug Information.* 16.
- WHO. 2002b. WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005. World Health Organization, Geneva. 59 pp.
- Wilkinson, P.C. 1974. Surface and cell membrane activities of leukocyte chemotactic factors. *Nature.* 251:58-60.
- Wilkinson, P.C. 1988. Chemotactic factors: an overview. *Methods Enzymol.* 162:127-32.
- Wilkinson, P.C. 1996. Cell locomotion and chemotaxis: basic concepts and methodological approaches. *Methods.* 10:74-81.
- Wilkinson, P.C., e W.S. Haston. 1988. Chemotaxis: an overview. *Methods Enzymol.* 162:3-16.
- Yamaguchi, H. 1992. Immunomodulation by medicinal plants. *Adv Exp Med Biol.* 319:287-97.
- Zani, C.L., P.P.G. Chaves, R. Queiroz, N.M. Mendes, A.B. Oliveira, J.E. Cardoso, A.M.G. Anjos, e T.S. Grandi. 1995. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Phytomedicine.* 2:47-50.
- Zhang, Y.H., H.Y. Peng, G.H. Xia, M.Y. Wang, e Y. Han. 2004. Anticancer effect of two diterpenoid compounds isolated from *Annona glabra* Linn. *Acta Pharmacol Sin.* 25:937-42.

- Zhao, W.M., G.W. Qin, e L.G. Lou. 1999. Evaluation of toxicity of some saponins on brine shrimp. *J Asian Nat Prod Res.* 1:307-11.
- Zigmond, S.H. 1977. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotatic factors. *J Cell Biol.* 75:606-616.
- Zotz, G., M.T. Tyree, e S. Patino. 1997. Hydraulic architecture and water relations of a flood-tolerant tropical tree, *Annona glabra*. *Tree Physiol.* 17:359-65.

**ANEXOS**





Curitiba, 28 de abril de 2.004.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**ALMERIANE MARIA WEFFORT SANTOS**  
Nesta

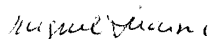
Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa **intitulado** “ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS ISOLADOS OU DERIVADOS DE PLANTAS MEDICINAIS”, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR em reunião do dia 28 de abril de 2.004.

Registro **CEP/SD**: 039.SI.003/04-01

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente



**Prof.º Dr. Miguel Ibraim A. Hanna Sobrinho**  
Coordenador do Comitê de Ética em  
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Endereço: Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-Pr. – C EP: 80060-240  
Fone/fax: 41-360-7259 – e-mail: [cometica@saude.ufpr.br](mailto:cometica@saude.ufpr.br)