PATRÍCIA FRANCISCONE MENDES

**Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos e imunotóxicos da *Uncaria tomentosa*
em ratos**

São Paulo

2014

PATRÍCIA FRANCISCONE MENDES

**Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos e imunotóxicos da *Uncaria tomentosa*
em ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:
Profa. Dra. Isis Machado Hueza

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2979
FMVZ

Mendes, Patrícia Franciscone
Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos e imunotóxicos da *Uncaria tomentosa* em ratos / Patrícia
Franciscone Mendes. -- 2014.
84 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Isis Machado Hueza.

1. Unha-de-gato. 2. Fitoterápico. 3. Planta Medicinal. 4. Imunotoxicidade. 5. Glicemia.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos e imunotóxicos da *Uncaria tomentosa* em ratos", protocolado sob o nº 2500/2011, utilizando 160 (cento e sessenta) ratos, sob a responsabilidade do(a) Isis Machado Hueza (Pós-Doutoranda do Departamento de Patologia), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

We certify that the Research "Evaluation of the possible toxic and immunotoxic effects of *Uncaria tomentosa* in rats", protocol number 2500/2011, utilizing 160 (one hundred sixty), under the responsibility Isis Machado Hueza (Pós-Doutoranda do Departamento de Patologia), agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 16 de fevereiro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MENDES, Patrícia Franciscone

Título: Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos e imunotóxicos da *Uncaria tomentosa* em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Isaura Maria e José Antonio, por todo o apoio, incentivo, conselhos e, acima de tudo, pelo carinho, amizade e amor, sentimentos compartilhados que sempre me determinaram a buscar fazer o melhor em todas ações e situações da minha vida. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Isis Machado Hueza, que ao longo de nossos anos de convívio, mesmo antes de meu ingresso na pós-graduação, me introduziu na área da pesquisa, me apresentando um “universo” até então inexplorado por mim. Muito obrigada pelos seus ensinamentos, conselhos e por ter acreditado em meu potencial, me dando esta oportunidade de “crescer” profissionalmente. Sinto-me privilegiada por poder estar perto de um exemplo de pessoa e pesquisadora como você. Espero que nossa excelente relação de amizade, que ultrapassa os limites de uma simples relação aluna-orientadora, perdure por muitos anos.

À minha co-orientadora, Silvana Lima Górnjak, pela amizade, pelo exemplo de seriedade, por toda ajuda, sugestões e aconselhamentos dados, buscando sempre nos nortear para que pudéssemos tomar as melhores decisões a serem seguidas.

Aos meus familiares, pelo apoio e aprovação de minhas ações e decisões, bem como pelas demonstrações de afeto e orgulho diante de minhas conquistas, sempre me incentivando a seguir em frente.

Ao meu avô Antonio (*in memorian*), por me ensinar a amar e respeitar os animais incondicionalmente, despertando em mim, desde muito pequena, o desejo de ser médica veterinária.

À minha avó Isaura (*in memorian*), pelos seus sábios ensinamentos e conselhos, provando que para aprender não há idade.

À minha tia Fátima (*in memorian*), por me ensinar que a vida fica mais fácil de ser vivida se a encararmos com felicidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), cujo apoio financeiro, permitiu que este trabalho pudesse ser realizado (Processo número 2012/09565-8).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro disponibilizado ao projeto (Processo número 476572/2013-4).

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ - USP) e ao Departamento de Patologia (VPT), por terem me abrigado durante todo o período de desenvolvimento de minha dissertação e me proporcionado condições necessárias para realizar minha pesquisa.

A todos os funcionários da FMVZ - USP, pelo auxílio disponibilizado sempre que necessário, especialmente os funcionários do VPT, Cláudia, Dona Idalina, Nelsinho, Aline, Mauro e Luciana, pela dedicação e cuidados dispensando aos animais do biotério; Vagner, Herculano e Nicolle, pela amizade e auxílios nos experimentos no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do VPT; Luciano e Cláudio pela ajuda na confecção de lâminas histopatológicas no Laboratório de Histopatologia do VPT; e as secretárias do VPT e da pós-graduação do VPT, Adriana, Milena e Cristina, pela eficiência no trabalho sempre que solicitado.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX) do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, que foram os primeiros a me abrigar durante meu estágio extra-curricular aonde tive meu primeiro contato com a pesquisa, e que, desde então, tornaram-se muito queridos por mim: Paulo César (PC), Ester, Elaine, Adilson, a então aluna de Iniciação Científica, Júlia Benassi, e os demais funcionários, agradeço pela amizade e por toda a ajuda disponibilizada.

A todos os estagiários e residentes do Setor de Pequenos Ruminantes da FMVZ-USP, por estarem sempre aptos a me ajudar nas minhas diversas idas ao local solicitando a coleta de sangue de carneiro para utilizar em meu experimento.

Aos amigos, “irmãos científicos”, Fernando Ponce, Fernando Pípole, Dyanne Dutra Fraga e Bianca Nakayama, muito obrigada pela ajuda durante estes anos, se não fosse pela ajuda de vocês todo este trabalho não poderia ter sido executado.

Aos demais amigos do VPT, Alessandra, André Fukushima, Eduardo, Gabriela, Luciana Cunha, Mariana, Natália, Paula, Sayuri, Thaísa e Thiago Marinho, pela amizade, convivência e pelos momentos de descontração na sala de pós.

A todos os professores do VPT, pelos ensinamentos e pelo convívio. Em especial ao Prof. Dr. Paulo César Maiorka, pelo auxílio na análise de minhas lâminas de histopatologia.

Ao professor Fábio Ferreira Perazzo do Laboratório de Insumos Naturais e Sintéticos da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP - Campus Diadema, SP), pela realização da análise cromatográfica para determinação dos componentes químicos presentes no material de estudo utilizado em meus experimentos.

Por fim, agradeço especialmente a todos os animais que de alguma forma contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado: os carneiros do Setor de Pequenos Ruminantes; os porquinhos-da-Índia do biotério do VPT e também do CEPTOX; e, em particular, agradeço a todos os ratos Wistars utilizados em meus experimentos, que, sempre com muito respeito, nos doaram suas vidas para que pudéssemos aprender mais; vocês foram fundamentais em meus estudos, pesquisas e descobertas. Expresso minha eterna e profunda admiração e gratidão a estes seres maravilhosos que tanto me encantam e que tanto nos tem a ensinar, os animais!

“No semblante de um animal que não “fala”, há todo um discurso implícito que somente um ser humano evoluído é capaz de entender.”

Provérbio indiano - autor desconhecido

RESUMO

MENDES, P. F. **Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos e imunotóxicos da *Uncaria tomentosa* em ratos.** [Evaluation of the possible toxic and immunotoxic effects of *Uncaria tomentosa* in rats]. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A *Uncaria tomentosa* (*U. tomentosa*), popularmente conhecida como “Unha-de-gato”, é uma planta medicinal nativa das Américas, mundialmente empregada devido às suas atividades anti-inflamatórias e imunomodulatórias. O consumo desta planta ocorre não apenas na forma *in natura*, mas principalmente como fitoterápico, sendo muitas vezes utilizada de forma indiscriminada pela população. Apesar de vários estudos revelarem as propriedades terapêuticas da *U. tomentosa*, poucos são os trabalhos que empregam protocolos estabelecidos por agências regulamentadoras internacionais, para a avaliação dos possíveis efeitos tóxicos e imunotóxicos deste fitoterápico. Assim, o propósito do presente estudo foi verificar se a administração de um extrato seco de *U. tomentosa*, comercialmente disponível no mercado, poderia ocasionar efeitos tóxicos e imunotóxicos em ratos após 90 dias de tratamento. Para isso, 40 ratos Wistars machos foram tratados oralmente com as doses de 15, 75 ou 150 mg/kg de extrato seco de *U. tomentosa* comercialmente disponível no mercado, contendo teores de alcaloides de acordo com aqueles valores preconizados em literatura. No final do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia para realização de avaliações bioquímicas, hematológicas, histopatológicas, análise de órgãos linfoides e não-linfoides, avaliação das respostas imunes inata, inflamatória e humoral, bem como teste para determinação de reação de hipersensibilidade do tipo IV. Os resultados revelaram aumento nos níveis de ALT dos animais tratados com a dose de 75 mg/kg, e redução nos índices glicêmicos de ratos tratados com 75 e 150 mg/kg de *U. tomentosa*. Entretanto, somente os ratos tratados com a maior dose exibiram discreta vacuolização centro-lobular hepática; assim, somente os dados de ALT não são sugestivos de efeitos hepáticos adversos da *U. tomentosa* após um longo período de tratamento. A redução nos índices sanguíneos de glicose dos ratos, após tratamento com a *U. tomentosa*, podem representar importante risco para seres humanos diabéticos, susceptíveis ao desenvolvimento de hipoglicemia e que fazem uso da *U. tomentosa* para outros propósitos. Em conclusão, estes estudos demonstraram que, apesar de a

U. tomentosa não promover efeitos tóxicos e imunotóxicos, o uso prolongado da mesma, a altas doses, pode promover redução dos índices glicêmicos.

Palavras-chave: Unha-de-gato. Fitoterápico. Planta medicinal. Imunotoxicidade. Glicemia.

ABSTRACT

MENDES, P. F. **Evaluation of the possible toxic and immunotoxic effects of *Uncaria tomentosa* in rats.** [Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos e imunotóxicos da *Uncaria tomentosa* em ratos]. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Uncaria tomentosa (*U. tomentosa*), commonly known as “Cat’s claw”, is a native medicinal plant from America, it is employed worldwide for its anti-inflammatory and immunomodulatory activities. The consumption of this plant occurs not only *in natura*, but mainly as a phytotherapeutic, used indiscriminately by the population. Although many researchers revealed the therapeutic properties of *U. tomentosa*, few studies employing established protocols by international regulatory agencies for the evaluation of the possible toxic and immunotoxic effects of this herbal medicine. Thus, the purpose of the present study was to verify if the dry extract of *U. tomentosa* could promote toxic and/or immunotoxic effects in rats following 90 days of treatment. For this, forty male rats were orally treated with 15, 75 or 150mg/kg of dry extract of *U. tomentosa*, commercially available, containing levels of alkaloids according to those values recommended in the literature. At the end of experimental period, the rats were killed for the evaluation of the biochemistry, haematology, histopathology, status of the lymphoid and non-lymphoid organs, evaluation of innate, inflammatory and humoral immune responses, as well as a test to determine the delayed type hypersensitivity. The results revealed an increase in the levels of ALT in the animals treated with 75mg/kg and a reduction in the glycaemic levels of rats treated with 75 and 150mg/kg of *U. tomentosa*. However, only rats treated with the higher dose showed a slight centrilobular hepatic vacuolation; thus, ALT data alone are not suggestive of a hepatic adverse effect of *U. tomentosa* following long-term treatment. The reduction in blood glucose levels of the rats, could represent an important risk for diabetic humans, who are susceptible to the development of hypoglycaemia and who might use *U. tomentosa* for purposes other than anti-diabetes. In conclusion, these studies demonstrated that, while *U. tomentosa* has no immunotoxic effect, long-term *U. tomentosa* treatment at high doses can promote reduction in glycemic levels.

Keywords: Cat's claw. Phytotherapeutic. Medicinal plant. Immunotoxicity. Glycaemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de distribuição geográfica da <i>Uncaria tomentosa</i> na América Latina.....	23
Figura 2 - <i>Uncaria tomentosa</i> exibindo ramos floridos (A) e ramos contendo espinhos (B)...	24
Figura 3 - Estrutura química dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos.....	28
Figura 4 - Cromatograma de HPLC da fração rica em alcaloides provenientes da casca de <i>Uncaria tomentosa</i> L. (Rubiaceae), foram identificados oito alcaloides, incluindo: (A) especiofilina (B) uncarina F, (C) mitrafilina, (D) rincofilina; (E) isomitrafilina, (F) pteropodina, (L) isoriconfilina, (H) isopteropodina.....	51
Figura 5 - Avaliação histopatológica de ratos tratados ou não (a) com extrato seco da <i>Uncaria tomentosa</i> , durante 90 dias, por gavagem. Nota-se a presença de vacuolização na zona centrolobular dos hepatócitos dos ratos tratados com 150 mg/kg de extrato seco da <i>Uncaria tomentosa</i> (b), HE, 20X.....	56
Figura 6 - Reação de hipersensibilidade tardia (DTH), em mm, de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg do extrato seco da <i>Uncaria tomentosa</i> , durante 90 dias, por gavagem. São apresentados as médias e seus respectivos erros-padrões.....	59
Figura 7 - Avaliação da resposta imune adquirida de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg do extrato seco da <i>Uncaria tomentosa</i> , durante 90 dias, por gavagem. São apresentados as médias e seus respectivos erros-padrões.....	60
Figura 8 - Avaliação da efetividade fagocítica de macrófagos peritoneais de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg do extrato seco da <i>Uncaria tomentosa</i> , durante 90 dias, por gavagem. São apresentados as médias e seus respectivos erros-padrões. *p< 0,05 versus grupo controle, teste de Dunnett.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Alcaloides identificados presentes na <i>Uncaria tomentosa</i>	27
Tabela 2 -	Consumo de ração e ganho de peso total de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg do extrato seco da <i>Uncaria tomentosa</i> , durante 90 dias, por gavagem. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões....	52
Tabela 3 -	Diferencial de células sanguíneas circulantes de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg do extrato seco da <i>Uncaria tomentosa</i> , durante 90 dias, por gavagem. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.....	53
Tabela 4 -	Bioquímica sérica de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg do extrato seco da <i>Uncaria tomentosa</i> , durante 90 dias, por gavagem. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.....	55
Tabela 5 -	Peso relativo de timo e baço; morfometria do timo (razão córtex/medula) e celularidade de baço e medula óssea de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg do extrato seco da <i>Uncaria tomentosa</i> , durante 90 dias, por gavagem. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões.....	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	<i>UNCARIA TOMENTOSA</i>.....	23
2.1	CONSTITUINTES QUÍMICOS.....	25
2.2	ATIVIDADES TERAPÊUTICAS.....	29
2.2.1	Atividade imunomodulatória.....	29
2.2.2	Atividade anti-inflamatória.....	31
2.2.3	Atividade antiviral.....	32
2.2.4	Atividade antimutagênica/antitumoral.....	33
2.2.5	Atividade antioxidante.....	34
2.2.6	Atividade contraceptiva.....	34
3	TOXICIDADE.....	35
3.1	ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS.....	35
3.2	INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS.....	36
4	OBJETIVOS.....	38
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5.1	O FITOTERÁPICO E SEUS COMPONENTES QUÍMICOS.....	39
5.2	ANIMAIS.....	40
5.3	REAGENTES.....	40
5.4	ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO SECO DA <i>U. TOMENTOSA</i>	41
5.5	AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO E DO CONSUMO DE RAÇÃO DE RATOS TRATADOS COM A <i>U. TOMENTOSA</i>	41
5.6	EUTANÁSIA.....	41
5.7	AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA.....	42
5.7.1	Hemograma, parâmetros bioquímicos e histopatologia.....	42
5.7.2	Avaliação do peso seco de órgãos não-linfoides.....	42
5.8	AVALIAÇÃO IMUNOTOXICOLÓGICA.....	43
5.8.1	Avaliação do peso relativo de órgãos linfoides e suas celularidades.....	43
5.8.2	Morfometria de órgãos linfoides.....	43
5.8.3	Reação de hipersensibilidade do tipo tardia - <i>Delayed Type</i>	

	<i>Hypersensitivity assay (DTH)</i>	44
5.8.4	Avaliação da resposta imune humoral	44
5.8.4.1	Obtenção dos eritrócitos de carneiro e a sensibilização dos animais.....	44
5.8.4.2	O ensaio do PFC.....	45
5.8.4.3	O plaqueamento.....	45
5.8.5	Avaliação de atividade dos macrófagos peritoneais por meio do “burst” oxidativo e da fagocitose	46
5.8.5.1	Coleta das células peritoneais elicitadas pelo tioglicolato 3%.....	46
5.8.5.2	Execução da técnica para avaliação do “burst” oxidativo e fagocitose.....	46
5.9	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	47
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
6	RESULTADOS	51
6.1	ESTUDO QUÍMICO.....	51
6.2	AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA.....	52
6.2.1	Avaliação do ganho de peso e do consumo de ração de ratos tratados com a <i>U. tomentosa</i>	52
6.2.2	Hemograma	52
6.2.3	Parâmetros bioquímicos	53
6.2.4	Histopatologia	56
6.2.5	Avaliação do peso seco de órgãos não-linfóides	57
6.3	AVALIAÇÃO IMUNOTOXICOLÓGICA.....	57
6.3.1	Avaliação do peso relativo de órgãos linfóides, suas celularidades e morfometria	57
6.3.2	Reação de hipersensibilidade do tipo tardia - (DTH)	58
6.3.3	Avaliação da resposta imune humoral	59
6.3.4	Avaliação da resposta imune inata e inflamatória de macrófagos peritoneais (“burst” oxidativo)	60
7	DISCUSSÃO	62
8	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICE	79

1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos o homem sempre recorreu à natureza buscando encontrar soluções para os seus problemas de saúde (CUNHA; SILVA; RODRIGUES, 2003), sendo assim, o hábito de explorar nas plantas propriedades com propósitos medicinais se confunde com o desenvolvimento da humanidade (EBERS, 1875).

A tradução de estelas suméricas com data anterior a 4000 a.C. revelou que os povos desta civilização já faziam uso de várias plantas para tratar diferentes doenças, como por exemplo, o ópio obtido da *Papaver somniferum* para minorar e/ou abolir a dor (GALLO, 2008; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

Outras civilizações que também fizeram uso extensivo de plantas com propósitos medicinais, com relatos que datam de 2600 a.C., foram os mesopotâmicos que utilizavam aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas, na maioria óleos essenciais obtidos de *Cedrus spp*, *Cupressus sempervirens*, entre outras (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

Procedentes do antigo Egito, os Papiros de Ebers são um dos primeiros receituários de conteúdo exclusivo para terapêutica e fins médicos documentados em pergaminho. Datados de 1500 a.C., possuem cerca de 800 receitas e referências a mais de 700 substâncias de origem vegetal e também mineral, utilizadas na medicina egípcia com finalidades curativas e também como praguicidas (LIMA JÚNIOR, 2005).

Ainda, as antigas civilizações do mundo Oriental, como as culturas chinesa e hindu, são tradicionais no uso de plantas. O compêndio *Materia Medica* da China teve seu primeiro registro em 1100 a.C., contendo cerca de 52 volumes que registram numerosas substâncias de origem vegetal, mineral e animal (DING, 1987).

A Grécia Antiga também contribuiu de forma significativa para o desenvolvimento consciente do uso das plantas medicinais. Em meados dos anos 300 a.C., o filósofo Theophrastus (371 – 287 a.C.), conhecido como o pai da botânica, exerceu extrema importância ao classificar e descrever certas qualidades de diversas plantas, sugerindo que mudanças nas características vegetais poderiam ser advindas de diferentes formas de cultivo (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; PHILLIPSON, 2001). Nos anos 100 d.C., o físico grego Dioscórides (40 – 90 d.C.) foi um dos mais importantes representantes do estudo de plantas medicinais, sendo inclusive classificado como o fundador da farmacognosia. Ainda,

Galeno (129 – 200? d.C) praticou e ensinou farmácia e medicina com base no uso de plantas, escrevendo cerca de 30 livros sobre este tópico (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

Já no Brasil, a prática de utilizar plantas medicinais tem sua origem nas diferentes culturas de grupos indígenas que habitavam o país, além da população escravagista, que com seus costumes e hábitos também contribuíram para tal conhecimento (SIMÕES, 1998). Segundo relatos feitos pelos portugueses que chegaram ao Brasil no ano de 1500, os povos indígenas utilizavam de forma extensiva a flora e também a fauna com o objetivo de promover a cura (PETROVICK; MARQUES; DE PAULA, 1999). O uso de plantas pelos nativos indígenas foi significativo para a adoção de métodos terapêuticos pelos brasileiros e europeus que para cá vieram e levaram tais conhecimentos ao Império, proporcionando sua difusão pela Europa (DE MELLO, 1980).

Em 1618, muitos resultados de estudos científicos com plantas foram agrupados em compêndios e outras formas de publicações, como, por exemplo, o da “Farmacopéia Londrina”, publicado neste mesmo ano (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000). Nos anos subsequentes, os estudos com plantas com atividade terapêutica se intensificaram, e foi no início dos anos de 1800 que os cientistas franceses Caventou (1795 – 1877) e Pelletier (1788 – 1842) passaram a fazer uso de solventes para extrair princípios ativos destes vegetais, como a emetina extraída da *Psychotria ipecacuanha* (1817), a estricnina e a brucina da *Nux vomica* (1818) e o agente anti-malárico quinina, extraído da *Cinchona* spp em 1820, marcando assim, o início dos estudos de metodologia para extração e isolamento de princípios biologicamente ativos de vegetais (KYLE; SHAMPE, 1974; HAAS, 1994).

Até meados do século XX, as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa. Do ponto de vista cronológico, a preponderância na utilização das plantas se manteve até cerca de 1930, quando a síntese química iniciou uma fase de desenvolvimento vertiginoso, principalmente decorrente da intensificação de estudos durante a Segunda Guerra Mundial, marcando um ponto de partida para o aparecimento da síntese de milhares de novas moléculas com finalidades terapêuticas (BEZANGER-BEAUQUESNE; PINKAS; TORCK, 1986).

Somente a partir de 1976 a medicina tradicional, que inclui as plantas medicinais e os fitoterápicos, passou a ser integrada ao programa internacional da Organização Mundial de Saúde (OMS), que reconheceu a importância do uso destas plantas pela população, apesar desse tipo de medicina, nomeada alternativa, já ser praticada há milhares de anos (AKERELE, 1998).

Tendo sido isto exposto, é importante ressaltar que atualmente, para uma planta ser classificada e utilizada com propósitos medicinais, é necessária a realização de uma série de estudos com abrangência multidisciplinar sobre uma dada espécie vegetal. Estes estudos concatenam avaliações fitoquímicas, microbiológicas, fármaco e toxicológicas, de tal forma que, por meio dessa integração, possam averiguar as propriedades medicinais já tradicionalmente e culturalmente atribuídas, além de propiciar uma ampliação pela indústria fármaco-química das possibilidades de busca por novas moléculas ativas (UNICAMP, 2007).

Geralmente, para classificação de uma planta ou de seu fitoterápico dentro de um grupo farmacológico, o conhecimento das propriedades farmacológicas de um único constituinte fitoquímico é suficiente para tal (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996). Consequentemente, interpretações precipitadas podem ser e são realizadas na atribuição de certas atividades terapêuticas a uma dada planta (FARINHA; CEPÊDA, 2000).

Vale ressaltar ainda que, do ponto de vista fitoquímico, as espécies vegetais não são fontes homogêneas de matéria-prima para comercialização, pois as mesmas são susceptíveis a fatores ambientais (intempéries ambientais e qualidade de solo) que podem induzir à expressão de características fenotípicas diferenciadas dentro de uma mesma espécie, por exemplo, síntese ou não de princípios ativos com atividade biológica. Assim, a pesquisa fitoquímica tem como objetivo principal caracterizar os constituintes químicos das espécies vegetais (SIMÕES et al., 1999).

Pelo fato de muitos acreditarem que plantas medicinais são desprovidas de toxicidade, crendo na inocuidade do natural, consumidores acabam confiando na utilização e manipulação destes vegetais e seus derivados por qualquer indivíduo que atue na área de comercialização de plantas medicinais (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996). Estudos indicam que cerca de 50% dos produtos à base de plantas medicinais disponíveis no comércio brasileiro, apresentam alguma irregularidade como: presença de matéria orgânica estranha; presença de contaminantes bióticos (insetos), e abióticos (constituintes tóxicos, inclusive metais pesados); problemas na identificação botânica da planta; teores de componentes químicos especificados erroneamente; inadequada preparação e estocagem da matéria vegetal; e adulteração durante o acondicionamento (CAPASSO et al., 2000).

Ainda, a maioria das espécies de plantas ditas medicinais é utilizada empiricamente, sem nenhum respaldo científico quanto à sua eficácia e segurança. De fato, em todo o mundo, até o ano de 2003, apenas 17% das plantas de uso popular foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e fármaco-toxicológicos. (HAMBURGER; MARSTON;

HOSTETTMANN, 1991; NODARI; GUERRA, 1999; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

Idealmente, quando do uso e comercialização de plantas medicinais e seus derivados em grande escala, métodos científicos sensíveis para a investigação fitoquímica e para a determinação das atividades biológicas e fármaco-toxicológicas de seus constituintes devem ser considerados, proporcionando desta forma seu uso seguro e criterioso (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996).

Além de todos estes aspectos químicos e biológicos a serem considerados com as plantas medicinais e seus derivados, bem como medicamentos alopáticos, é necessário estabelecer precauções na utilização dos mesmos em grupos especiais de pacientes e também em relação a contra-indicações e potenciais interações com outras substâncias (NEWALL; ANDERSON; PHILLIPSON, 1996), sendo este, uma realidade preocupante quando do uso de alguns produtos vegetais de forma concomitante com medicamentos alopáticos que pode levar ao antagonismo farmacológico – prejudicando o tratamento –, ou sinergismo e potenciação de um dos constituintes farmacológicos administrados, podendo levar à intoxicação do paciente, por exemplo: a *Mikania glomerulata* Sprengl. (Guaco), cujos extratos secos podem interagir sinergicamente com alguns antibióticos (BETONI et al., 2006); e a *Piper methysticum* Forst (Kava-kava), que antagoniza o efeito da dopamina podendo reduzir a eficácia da Levodopa (L-Dopa) na terapêutica do Parkinson (VALE; 2002, CORDEIRO; CHUNG; SACRAMENTO, 2005).

Diferente de alguns países desenvolvidos, como a Alemanha, onde o uso com conhecimento científico de plantas complementa a medicina alopática (VALERIO JÚNIOR; GONZALES, 2005), nos países em desenvolvimento, uma fração significativa da população permanece dependente dos conhecimentos ancestrais sobre o uso das plantas medicinais e seus derivados em resposta à satisfação das necessidades básicas ou primárias de saúde (VALERIO JÚNIOR; GONZALES, 2005). Além das razões de ordem econômica e também devido ao reduzido número de pessoal habilitado e/ou profissionais de saúde disponíveis para administrar e atender as demandas desta população (DE FEO, 1992), estes países também possuem fortes razões históricas ou culturais que influenciam nessa prática (VALERIO JÚNIOR; GONZALES, 2005).

Aliado a esta característica populacional, atualmente há uma tendência, mesmo nos países desenvolvidos, da população não só continuar empregando as plantas medicinais para o tratamento de diversas doenças, como também fazer uso, muitas vezes indiscriminado, de fitoterápicos, apoiando-se na crença “do que é natural não faz mal”. Porém, a busca pelo uso

de produtos cada vez mais “naturais”, como aqueles oriundos da agricultura e pecuária orgânica; do desenvolvimento sustentável; visando estilos de vida alternativos ou “zen” (*zen lifestyle*), e a preferência em utilizar medicamentos tradicionais àqueles alopáticos, pode culminar no aparecimento de problemas relacionados à toxicidade destes produtos.

A OMS com a finalidade de implementar os sistemas de saúde dos países subdesenvolvidos, observou ser importante incorporar à medicina moderna a medicina tradicional. Para tanto estimula formalmente o interesse pelas plantas medicinais, propondo aos países auxílio para promoção de programas de saúde mais bem adaptados às suas realidades sócio-econômicas (AKERELE, 1998; WHO, 1998).

Várias iniciativas têm sido empenhadas com o intuito de viabilizar o uso de fitoterápicos na saúde pública (MATOS, 1997). Conforme definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fitoterápicos são: “medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais. Eles são obtidos empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco e outros)”. No Brasil, a prescrição dos fitoterápicos por agentes de saúde foi incorporada pelo Ministério da Saúde, por meio da Portaria Interministerial nº2960, 2008 (BRASIL, 2008), ao Sistema Único de Saúde (SUS).

Em 2009, o Ministério da Saúde lançou uma relação de 71 espécies vegetais com potencial para gerar produtos de interesse terapêutico a ser empregado no SUS, denominada de Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS) (BRASIL, 2009) visando auxiliar no tratamento da população brasileira, principalmente aquela mais carente.

Em 2012, o Ministério da Saúde publicou a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (BRASIL, 2012), que reúne informações sobre 12 fitoterápicos utilizados para combater as doenças mais comuns que atingem a população brasileira. Dentre as plantas medicinais e os fitoterápicos listados nestas relações, está a *Uncaria tomentosa* (*U. tomentosa*), de amplo uso da população, não só do Brasil como de muitos países da América Latina e também daqueles países ditos desenvolvidos.

Devido a esta demanda originada com a implementação da “terapia alterativa” para complementação de tratamentos pelo sistema de saúde nacional, aquisições de resultados científicos na área de produtos naturais devem ser obrigatórias e precisam ser realizadas, bem como testes para análises de atividades fitoquímicas, farmacológicas e toxicológicas, para que assim a indústria possa fornecer fitoterápicos oriundos de plantas homogêneas, sendo capaz de estabelecer padrões de qualidade, segurança e eficiência terapêutica (BAUER; TITTEL,

1996; CALIXTO, 2000), proporcionando ao profissional de saúde a confiabilidade na sua prescrição e ao paciente segurança de seu uso.

Apesar de a maioria dos estudos revelarem as propriedades terapêuticas, até o presente momento, limitadas são as pesquisas que focam os possíveis efeitos tóxicos das plantas medicinais e de fitoterápicos, inclusive da *U. tomentosa* e seus insumos farmacêuticos. É importante ressaltar também que alguns efeitos observados com o uso de plantas nem sempre refletem em atributos positivos, como por exemplo, o sabido efeito imunomodulador da *U. tomentosa*. Teria este efeito ações sinérgicas ou antagônicas funcionais para pacientes com alterações imunológicas importantes, como uma autoimunidade ou uma imunossupressão?

Assim, o objetivo do presente estudo foi o de verificar a toxicidade de doses crescentes da *U. tomentosa* e também empregar protocolos de imunotoxicologia sugeridos por várias agências regulatórias, como a *Food and Drug Administration* (FDA), *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) e *United States Environmental Protection Agency* (US-EPA), visando averiguar a segurança da *U. tomentosa* para a população mundial.

2 *UNCARIA TOMENTOSA*

A *U. tomentosa* (Willd.) DC (Rubiaceae), popularmente conhecida como “Unha-de-gato”, é uma planta nativa das florestas tropicais da região Amazônica e da América Central, pertencente à família Rubiaceae (KEPLINGER et al., 1999) (Figura 1).

Figura 1 - Mapa de distribuição geográfica da *Uncaria tomentosa* na América Latina

Fonte: (POLLITO, P. A. Z., 2004)

A *U. tomentosa* é um arbusto trepador lenhoso que pode alcançar entre 10 a 30 metros de altura (MIRANDA; SOUSA; PEREIRA, 2001). Apresenta crescimento lento, podendo levar até 20 anos para atingir a maturidade (KEMPER, 1999). Possui folhas simples e opostas (ZAVALA; ZEVALLOS, 1996), flores bissexuais ou funcionalmente unissexuais (Figura 2A), frutos com cápsulas alongadas, sementes aladas (STEYERMARK, 1974; GENTRY, 1993; REA, 1995; ZEVALLOS; LOMBARDI; BERNAL, 2000), espinhos pequenos, pontiagudos, de consistência lenhosa (KEPLINGER et al., 1999) e curvados, lembrando garras, por isso o nome popular “Unha-de-gato” (CHENG et al., 2007) (Figura 2B), o que

facilita a sua aderência à casca e ramos de árvores, sendo frequentemente encontrada em copas de árvores com até 30 metros de altura (CARVALHO, 2004).

Figura 2 - *Uncaria tomentosa* exibindo ramos floridos (A) e ramos contendo espinhos (B)

Fonte A: (RAPOSO, A., 2011); Fonte B: www.huertodeurbano.com/consejos-mr-urbano/una-de-gato-o-uncaria-tomentosa

O gênero *Uncaria* compreende 50 espécies distribuídas pela América do Sul e ao redor da América Central, destas espécies, somente duas são de interesse terapêutico a *U. tomentosa* e a *Uncaria guianensis* que compartilham as mesmas aplicações medicinais tradicionais (PISCOYA et al., 2001).

Acredita-se que os antigos incas utilizavam a *Uncaria guianensis* e repassaram seus conhecimentos aos indígenas do Peru. O uso desta espécie tem o mesmo efeito da *Uncaria tomentosa* cujas cascas são utilizadas há pelo menos 2000 anos na medicina tradicional de algumas tribos indígenas peruanas, especialmente os Asháninka (PILARSKI et al., 2006), e há séculos por tribos indígenas amazônicas (JONG et al., 1999).

A *U. tomentosa* era empregada na medicina tradicional destas tribos e apresentava diversas aplicações terapêuticas, sendo utilizada para o tratamento de diversas enfermidades como asma, artrite, bursite, reumatismo, herpes, alergias, inflamações, abscessos, hemorragias, úlceras gástricas, desordens gastro-intestinais, febre, infecções, e até como contraceptivo, além de auxiliar no tratamento de diferentes tipos de câncer e na prevenção de doenças (JONG et al., 1999; MUHAMMAD et al., 2001). Para estes propósitos, a casca ou a raiz da planta eram geralmente preparadas por meio de infusão ou utilizadas na forma de extratos ou tinturas (WILLIAMS, 2001; KEPLINGER et al., 1999).

As principais partes comerciais dessas duas espécies do gênero *Uncaria* são as cascas do caule, as raízes e as folhas. Como as cascas de ambas são semelhantes, é corriqueiro encontrar no mercado uma mistura das duas espécies sob o mesmo nome de “Unha-de-gato” (REINHARD, 1999).

Levando-se em consideração o uso extensivo da “Unha-de-gato” mundialmente para o tratamento de várias enfermidades, em 1994, durante uma conferência da OMS, a *U. tomentosa* foi reconhecida oficialmente por esta Organização como uma “planta medicinal” devido a seu amplo uso na medicina tradicional (LORENZI; ABREU MATOS, 2008).

Atualmente, os consumidores fazem uso de produtos derivados da *U. tomentosa* para diversos fins medicinais, não diferindo dos propósitos há muito relatados, como: artrite, úlceras, gastrite, infecções virais e outras doenças crônicas (PISCOYA et al., 2001; MUR; HARTING; SCHIMER, 2002). Há uma grande variedade de formas de apresentação de produtos a base de *U. tomentosa* disponíveis comercialmente como fitoterápicos, incluindo: cápsulas de extrato seco e pulverizado, provenientes da casca e/ou da raiz (WILLIAMS, 2001), casca seca do arbusto, casca da raiz processada ou moída, casca micropulverizada, extratos da planta inteira e/ou somente de suas folhas, tinturas alcoólicas, tabletes prensados, cápsulas, pomadas e chás. Dependendo da fonte, muitos produtos não são padronizados e, portanto, possuem qualidade e procedência duvidosa (VALERIO JÚNIOR; GONZALES, 2005).

2.1 CONSTITUINTES QUÍMICOS

O sucesso do uso da *U. tomentosa* pelas tribos indígenas como forma de tratamento para diversas afecções, despertou a atenção de pesquisadores que, na década de 1960, determinaram pela primeira vez a presença de constituintes químicos ativos reconhecidos como alcaloides oxindólicos (JONG et al., 1999).

Em 1970, o pesquisador austríaco Klaus Keplinger coletou alguns espécimes da planta e os levou para Innsbruck, na Áustria, para que fossem estudados, visando elucidar as propriedades farmacológicas da *U. tomentosa* (KEPLINGER, 1993). Descobriu-se então, os primeiros alcaloides ativos da planta. Outros estudos etnobotânicos, químicos e farmacológicos foram realizados e vários alcaloides ativos e outros componentes químicos foram também isolados e caracterizados (JONG et al., 1999).

Em 1996, o botânico James Duke's enumerou 29 componentes químicos como constituintes da *U. tomentosa* em seu banco de dados sobre fitoquímica e etnobotânica (BECKSTROM-STERNBERG; DUKE; WAIN, 1994).

O número de constituintes químicos determinados desde então aumentou para aproximadamente 50 (HEITZMAN et al., 2005); entretanto, dentre a variada gama de metabólitos bioativos, existem 3 classes de componentes principais que se destacam por exercerem um importante papel na atividade medicinal da *U. tomentosa*. Estes componentes são: os triterpenos polihidroxilados, os glicosídeos do ácido quinóico e os alcaloides (MONTORO et al., 2004).

Outros componentes derivados da *U. tomentosa* com potencial relevância terapêutica incluem: as procianidinas, os triterpenos polioxigenados, os flavonóides, as catequinas, os taninos e os esteróis como o beta-sitosterol (β -sitosterol), o estigmasterol e o campesterol (SENATORE et al., 1989). Todos estes componentes são capazes de atuar individualmente ou sinergicamente aos alcaloides, desencadeando os benefícios terapêuticos da *U. tomentosa* (AQUINO et al., 1991; FERREIRA, 2009).

Os alcaloides formam um grupo heterogêneo de substâncias orgânicas que incluem na sua fórmula molecular: carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio geralmente sob a forma de amina (MARQUES, 2008). As diversas tentativas para avaliar o potencial terapêutico dos compostos desta planta levaram à descoberta de dois quimiotipos de alcaloides, os oxindólicos e os indólicos, e ainda com padrões diferentes, os tetracíclicos e os pentacíclicos (MARQUES, 2008; KEPLINGER et al., 1999; HEITZMAN et al., 2005). (Tabela 1).

Tabela 1 - Alcaloides identificados presentes na *Uncaria tomentosa*

Alcaloides	Pentacíclicos	Tetracíclicos
Oxindólicos	Pteropodina	Rincofilina
	Isopteropodina	Isorincofilina
	Especiofilina	Corinoxeína
	Uncarina F	Isocorinoxeína
	Mitrafilina	
	Isomitrafalina	
Indólicos	Aquamigina	Hirsutina
	<i>Tetrahydro-alstonina</i>	Dihidrocorianteína
	3-Iso-19-epi-ajmalicina	Hirsuteína
		Corinanteína

Fonte: adaptado de VALERIO JÚNIOR; GONZALES, 2005

Supõe-se que os alcaloides oxindólicos são sintetizados a partir do alcaloide indólico estereoquimicamente correspondente à aquamigina (LAUS; BROSSNER; KEPLINGER, 1997b).

Muitos autores atribuem à maioria das atividades terapêuticas exercidas pela *U. tomentosa* aos alcaloides oxindólicos pentacíclicos (WURM, 1997; KEPLINGER et al., 1999), já que evidências científicas têm sido acumuladas atribuindo a estes compostos os efeitos benéficos desta planta (VALERIO JÚNIOR; GONZALES, 2005). De fato, a maior parte das preparações comerciais da *U. tomentosa* apenas refere-se à presença destes alcaloides (KEPLINGER et al., 1999), padronizando-as, por meio de técnicas cromatográficas, para elevados teores de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (superior a 97 %) (FALKIEWICZ; LUKASIAK, 2001) (Figura 3).

Em relação à distribuição dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos, existe um padrão quanto à presença dos mesmos nas diferentes partes da planta, ou seja, nas folhas, caules e raízes da *U. tomentosa* (REINHARD, 1999). São observadas concentrações mais elevadas em folhas jovens, nas quais o alcaloide principal é a uncarina F, que é capaz de sofrer isomerização originando a pteropodina, a especiofilina e a isopteropodina (LAUS; WURST, 2003). Nas folhas maduras, a especiofilina é o alcaloide predominante (LAUS; BROSSNER; KEPLINGER, 1997b). Já durante o processo de transporte destes alcaloides, que ocorre concomitantemente ao transporte de seivas e de nutrientes até as raízes, há a formação da mitrafalina, e da isomitrafalina na casca do caule (LAUS; WURST, 2003). Acredita-se ainda que outros alcaloides oxindólicos possam ser formados durante o transporte destes componentes até as raízes, local aonde ocorre a deposição de todos os seis alcaloides oxindólicos (MONTORO et al., 2004; REINHARD, 1999).

Figura 3 - Estrutura química dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos

Fonte: adaptado de KEPLINGER et al., 1999; HEITZMANN et al., 2005

No entanto, a concentração e a distribuição destes constituintes ativos são passíveis de variações externas, como o clima, a intensidade e ciclo de luz, qualidade de solo, forma de cultivo da mesma e as estações do ano em que é coletada, e ainda, variações da própria planta, como, o ciclo de vida da mesma e a genética das variedades que pode originar a ocorrência de diferentes quimiotipos de princípios ativos (MONTORO et al., 2004; REINHARD, 1999; LAUS; KEPLINGER, 1997a).

É importante reconhecer qual o perfil dos alcaloides presentes na *U. tomentosa*, pois os alcaloides oxindólicos pentacíclicos possuem propriedades farmacológicas distintas dos alcaloides oxindólicos tetracíclicos. Os oxindólicos tetracíclicos demonstram ser mais ativos nos sistemas cardiovascular e nervoso central (SHI et al., 2003), enquanto que os oxindólicos pentacíclicos são associados às propriedades imunomodulatórias (HEITZMAN et al., 2005). E ainda mais, os alcaloides oxindólicos tetracíclicos atuam antagonicamente aos oxindólicos pentacíclicos (WURM et al., 1998).

Portanto, procedimentos analíticos para controle da qualidade da matéria vegetal ou de fitoterápicos contendo *U. tomentosa*, devem ser realizados com o intuito de detectar e

distinguir a presença dessas duas classes de alcaloides, evitando assim, a interconversão das mesmas durante a preparação de um produto (BERTOL; FRANCO; de OLIVEIRA, 2012). Aliado a isso, encontra-se a necessidade de empregar elevados padrões de fabricação e controle de qualidade na produção de medicamentos a partir de plantas medicinais, contendo uma clara especificação de sua composição química (MUR; HARTING; SCHIMER, 2002).

2.2 ATIVIDADES TERAPÊUTICAS

Atribui-se a *U. tomentosa* as seguintes propriedades: imunomodulatória, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antimutagênica, antitumoral, antioxidante e contraceptiva (RAMIREZ, 1992; GONÇALVES; DINIS; BATISTA, 2005).

2.2.1 Atividade imunomodulatória

Pesquisas realizadas determinaram que os alcaloides oxindólicos pentacíclicos são capazes de estimular as células do sistema imune, podendo aumentar sua atividade em até 50% (KEPLINGER; WAGNER; KREUTZKAMP, 1989, KEPLINGER; KEPLINGER, 1994; SHENG et al., 1998, SHENG; BRYNGELSSON; PERO, 2000a; LEMAIRE et al., 1999), direcionando o uso da *U. tomentosa* como adjuvante no tratamento de doenças que impactam negativamente a imunidade (KEPLINGER; WAGNER; KREUTZKAMP, 1989, STUPPNER; STURM; KONWALINKA, 1992; WINKLER et al., 2004).

Em humanos, foi observado que uma das atividades imunomodulatórias dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos presentes na da *U. tomentosa* estava na indução de maior atividade fagocítica, tanto de granulócitos quanto de macrófagos. Por outro lado, este mesmo estudo evidenciou que estes alcaloides diminuem a atividade proliferativa das linhagens celulares mielóides (KEPLINGER et al., 1999).

Um experimento *in vitro* testou a efetividade de seis alcaloides oxindólicos pentacíclicos (especiofilina, uncarina F, mitrafilina, isomitrafilina, pteropodina e isopteropodina) sobre os linfoblastos B e T. Os resultados obtidos deste estudo sugeriram que estes alcaloides são capazes de estimular linhagens de células endoteliais humanas a liberarem um fator ainda desconhecido, que influencia na proliferação destes linfócitos inativados ou pouco ativados. A secreção deste fator pelas células endoteliais ocorreu na presença dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos, mas não na presença dos alcaloides oxindólicos

tetracíclicos, comprovando assim, que os alcaloides oxindólicos tetracíclicos atuam antagonicamente aos alcaloides oxindólicos pentacíclicos como dito anteriormente (KEPLINGER et al., 1999).

Outro estudo relatou efeitos imunoestimulantes de extratos de *U. tomentosa* por meio da produção de interleucina (IL) -1 e IL-6 por macrófagos alveolares de ratos. Os resultados indicaram que o tratamento com o extrato da planta promoveu uma estimulação dose-dependente na produção destas citocinas por macrófagos, assim como uma melhoria na produção destas citosinas após estes macrófagos serem estimulados com o lipopolissacarídeo (LPS) (LEMAIRE et al., 1999). Vale ressaltar neste momento que tal efeito imunomodulador pode caracterizar uma atividade pró-inflamatória, o que é controverso ao que se encontra na literatura, como será descrito adiante.

A atividade proliferativa de leucócitos promovida pela *U. tomentosa* também foi determinada em um estudo *in vivo*, utilizando-se uma fração patenteada do extrato da planta solúvel em água, denominada C-Med-100[®]. Nesse estudo, voluntários foram submetidos a um desafio vacinal 30 dias após o início da suplementação dietética de 350 mg de C-Med-100[®]. Após duas administrações diárias, durante dois meses, não foram observados efeitos colaterais e registrou-se uma melhoria estatisticamente significativa da resposta imune, expressada por uma elevação no índice de leucócitos circulantes no sangue periférico, caracterizando uma resposta imune eficiente (LAMM; SHENG; PERO, 2001).

Foi também avaliada a resposta hematopoiética de ratos infectados com a bactéria *Listeria monocytogenes* e tratados com o extrato aquoso de *U. tomentosa*, o qual foi administrado aos animais por via oral utilizando-se doses de 50 e 100 mg/kg, sete dias antes dos mesmos serem infectados por uma dose sub-letal da bactéria. Houve aumento da produção dos fatores estimuladores de colônias (CSFs) e das células progenitoras de macrófagos e granulócitos (CFU-GM) do baço e ainda aumento da produção de IL-1 e IL-6 em ratos não infectados, tratados com 100 mg/kg de extrato de *U. tomentosa* (EBERLIN; DOS SANTOS; QUEIROZ, 2005).

A atividade imunomoduladora da *U. tomentosa* também está relacionada com a capacidade de suprimir a síntese do TNF- α (SANDOVAL et al., 2002), o que pode, portanto, desencadear também uma atividade anti-inflamatória. Em outro estudo *in vivo*, utilizando camundongos, o C-Med-100[®] promoveu aumento do número de células do sistema imune incluindo linfócitos B, T, NK, granulócitos e células B de memória. Nesse estudo, foi concluído que estas células tiveram sua sobrevivência prolongada ao invés de maior atividade proliferativa (AKESSON et al., 2003).

2.2.2 Atividade anti-inflamatória

Alguns autores afirmam que as atividades anti-inflamatórias da *U. tomentosa* parecem ser independentes de seu conteúdo total de alcaloides (FERREIRA, 2009), atribuindo aos glicosídeos do ácido quinóico a capacidade para o desenvolvimento destas atividades (AQUINO et al., 1991). Um experimento utilizando modelo clássico para inflamação em ratos (edema de pata induzido pela carragenina) revelou a atividade anti-inflamatória destes glicosídeos, provenientes de extratos obtidos da casca da raiz da planta, os quais reduziram a resposta inflamatória desencadeada pela carragenina em aproximadamente 70% (AQUINO et al., 1991).

Confirmando tais efeitos atribuídos à *U. tomentosa*, determinou-se a produção de TNF- α e prostaglandina E₂ (PGE₂) em linhagens celulares de macrófagos de camundongos pré-tratadas com baixas concentrações de um extrato da planta (1-1000 ng/mL ou 50 ng/mL). De fato, observou-se uma redução dose-dependente nos níveis de TNF- α e PGE₂ após estimulação dessas células pré-tratadas com LPS, tendo sido atribuído a este extrato atividade inibitória da expressão da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (PISCOYA et al., 2001).

Em um estudo randomizado duplo cego, a segurança e a eficácia clínica de um extrato de *U. tomentosa* contendo alcaloides oxindólicos pentacíclicos foi testada durante 24 semanas em 40 pacientes com artrite reumatóide. Além da terapia anti-reumática padrão (anti-inflamatório não esteroide: sulfasalazina e corticoide: hidroxiclороquina), os pacientes receberam 60 mg/kg/dia do extrato de *U. tomentosa*. Ao final do período de estudo, foi observada uma melhora nos sintomas característicos da doença apresentados pelos pacientes (dores nas articulações e rigidez matinal), demonstrando o potencial terapêutico adjuvante da *U. tomentosa* associada com outros medicamentos convencionais utilizados no tratamento dessa doença (MUR; HARTING; SCHIMER, 2002).

Estudos de quimiluminescência e ensaio de liberação de carbono *in vivo* com a finalidade de avaliar o efeito estimulante sobre a atividade fagocitária de granulócitos revelaram que extratos e alcaloides puros melhoraram a atividade fagocítica destas células, tendo sido destacados os efeitos dos seguintes princípios ativos: pteropodina, isomitrafalina, isorincofilina e com maior intensidade a catequina e a isopteropona, enquanto que, a mitrafalina e a rincofilina não desencadearam qualquer efeito (KREUTZKAMP, 1984; WAGNER; KREUTZKAMP; JURCIC, 1985).

Ainda, estudos com a *U. tomentosa* relacionados à expressão gênica induzida pelo fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), um fator nuclear capaz de ser ativado por diferentes sinais celulares, revelou que os constituintes da planta podem modular a atividade do mesmo (AKESSON et al., 2003). Este fator é ativado em casos de doenças inflamatórias como artrite, esclerose múltipla, asma, aterosclerose, entre outras (TAK; FIRESTEIN, 2001; BALDWIN JÚNIOR, 2001), sendo capaz de regular a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 (TAK; FIRESTEIN, 2001) e a apoptose (AGGARWAL, 2000). Akesson e colaboradores (2003) obtiveram evidências da inibição do NF- κ B em culturas de linfócitos de células submetidas ao tratamento com extrato de *U. tomentosa*. Considerando o papel central desempenhado por este fator ativador da transcrição na expressão de diversos genes de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α , a ação anti-inflamatória da planta pode ser atribuída a esse mecanismo, e, conseqüentemente, estes compostos químicos, sendo alcaloides ou não, são potenciais candidatos para o desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios (SANDOVAL-CHACON et al., 1998).

2.2.3 Atividade antiviral

Estudos com os glicosídeos do ácido quinóvico também apresentaram efeito inibidor nas infecções virais, demonstrado *in vitro* para o vírus da estomatite vesicular (AQUINO et al., 1989). Esta afirmação foi concluída realizando-se a infecção do vírus da estomatite vesicular em uma cultura de células HeLa que posteriormente foram expostas a seis glicosídeos do ácido quinóvico. Todos os glicosídeos do ácido quinóvico testados foram responsáveis pela atividade antiviral ao vírus da estomatite vesicular (AQUINO et al., 1989; HEITZMAN et al., 2005).

Ainda, monócitos humanos infectados com o vírus da dengue tipo-2 (cepa 16681) foram cultivados *in vitro* e tratados com extrato bruto hidroalcoólico de *U. tomentosa* obtido da casca do caule da planta e com frações contendo apenas os alcaloides. Conclui-se que o extrato bruto hidroalcoólico de *U. tomentosa* diminuiu significativamente a detecção de antígenos do vírus da dengue em concentrações de 10 μ g/mL, enquanto que as frações contendo alcaloides relevaram atividade inibitória ainda mais eficaz na concentração de 1 μ g/mL (REIS et al., 2008).

2.2.4 Atividade antimutagênica/antitumoral

Rizzi et al., (1993) relataram atividades antimutagênicas provenientes de extratos e frações cromatográficas provenientes da casca de *U. tomentosa*. O efeito protetor antimutagênico desses extratos e frações foi comprovado após a realização de estudos fotomutagênicos *in vitro* em culturas de *Salmonella typhimurium*.

Estudos realizados com esplenócitos de ratos pré-tratados com extrato de *U. tomentosa* e depois submetidos à irradiação ionizante revelou que estas células apresentaram maior grau de reparo de material genético, seja de fitas duplas ou simples de DNA, do que animais que receberam somente a irradiação, sugerindo que a planta tem potencial reparador ou protetor contra a lesão de material genético fisicamente induzida (SHENG; PERO; WAGNER, 2000b).

O extrato aquoso de C-Med-100[®] também foi utilizado para determinação da capacidade inibidora de crescimento tumoral promovida pela *U. tomentosa*. Linhagens celulares leucêmicas humanas foram tratadas com este produto e de fato, observou-se atividade antiproliferativa deste composto. O efeito supressor promovido pelo extrato da *U. tomentosa* sobre o crescimento de células tumorais, possivelmente foi mediado através da indução da apoptose, observada através das alterações morfológicas características desse processo; fragmentação do DNA internucleossomal e quantificação da fragmentação do DNA (SHENG et al., 1998).

A indução de quebras na cadeia do DNA acoplada a apoptose pode explicar a inibição do crescimento das células tumorais por extratos de *U. tomentosa* fornecendo uma evidência direta sobre as propriedades antitumorais da planta, demonstrando que o modo de atuação ocorre através de um mecanismo de indução de apoptose seletiva, ou seja, daquelas células que se encontram em franca atividade proliferativa (BANKER et al., 1998; SHENG et al., 1998).

É importante salientar também que, a *U. tomentosa* é empregada na terapia auxiliar do tratamento de diferentes tipos de neoplasias, sendo utilizada como adjuvante na quimioterapia ou radioterapia (KEPLINGER, 1999; WILLIAMS, 2001).

2.2.5 Atividade antioxidante

As características antioxidantes atribuídas a *U. tomentosa* provavelmente estão relacionadas à alta concentração de flavonóides presentes na planta, compostos capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio, diminuindo o estresse oxidativo no processo inflamatório, reduzindo a peroxidação lipídica e exercendo ação reparadora celular (CERRI et al., 1988; WURM et al., 1998; WILLIAMS, 2001).

A ação antioxidante e anti-inflamatória de extrato de *U. tomentosa* foi caracterizada em estudos *in vitro*. Estes estudos demonstraram que o extrato de *U. tomentosa* foi efetivo na inibição da produção de radicais livres induzidos por LPS e, subsequente peroxidação lipídica de células inflamatórias (SANDOVAL et al., 2000). A produção de TNF- α e de óxido nítrico-sintase induzível (iNOS), via expressão de NF-kB, também foram inibidas pelo extrato de *U. tomentosa* (AHMED; KOOB, 2005). Ainda, extratos metanólicos da casca e da raiz de *U. tomentosa* também demonstraram capacidade neutralizante de radicais livres reduzindo a peroxidação lipídica e os danos ao DNA (DESMARCHELIER et al., 1997).

2.2.6 Atividade contraceptiva

Os esteróis, representantes de uma subclasse dos triterpenos, assemelham-se quimicamente aos hormônios esteroidais (PADUCH et al., 2007) e são capazes de interagir com os receptores de estrógeno (SALAZAR; JAYME, 1998). Apesar da ausência de estudos científicos sobre o potencial efeito contraceptivo referido da *U. tomentosa*, este pode ser um dos fatores responsáveis por atribuir a ação de contracepção promovida pelo uso de extratos da planta (KURAS et al., 2006).

3 TOXICIDADE

As avaliações científicas e as publicações sobre a toxicidade de produtos naturais são ainda raras (SHENG et al., 2001). Apesar da longa história de utilização médica da *U. tomentosa*, sendo tradicionalmente empregada entre os povos indígenas e atualmente disponível comercialmente em vários países como forma de medicina alternativa (VALERIO JÚNIOR; GONZALEZ, 2005), ainda existem flagrantes da falta de estudos sobre os possíveis efeitos tóxicos que podem ser desencadeados após a administração dessa planta (SHENG; PERO; WAGNER, 2000b).

Sabe-se que o uso indiscriminado de plantas medicinais e fitoterápicos sem orientação médica ou critérios, pode resultar em danos potencialmente perigosos ao organismo (KLAASSEN; AMDUR; DOULL, 2001; ROTBLAT; ZIMENT, 2002).

3.1 ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS

Ensaio de citotoxicidade *in vitro*, utilizando culturas de células de ovário de hamster, células epiteliais intestinais humanas e macrófagos de camundongos, foram realizados com a finalidade de determinar a toxicidade de um extrato aquoso de *U. tomentosa*. Após exposição à concentração de 100 mg/mL do extrato aquoso de *U. tomentosa*, as células ovarianas não exibiram evidências de citotoxicidade (SANTA MARIA, 1997). O mesmo foi observado em relação às células epiteliais intestinais humanas e os macrófagos de camundongos que após 24 horas de exposição ao extrato aquoso de *U. tomentosa*, apresentaram viabilidade maior que 90 %. O extrato de *U. tomentosa* inibiu também a toxicidade celular induzida pelo LPS, exibindo evidências experimentais da sua potencial proteção contra o estresse oxidativo *in vitro* (SANDOVAL; THOMPSON; ZHANG, 1998).

Um estudo determinou que a DL₅₀ (dose necessária para causar a morte de 50 % dos indivíduos de uma população em condições experimentais) da *U. tomentosa* em ratos é maior que 8 g/kg. Neste mesmo estudo foram testados um pó comercial da planta e um extrato contendo uma mistura de água e etanol com 4% de concentração de alcaloides, nestes casos, foi determinado que a DL₅₀ foi maior que 2 e menor que 5 g/kg (SHENG; PERO; WAGNER, 2000b).

Um extrato aquoso liofilizado da raiz de *U. tomentosa*, contendo 35 mg/g de alcaloides oxindólicos pentacíclicos, foi preparado e administrado oralmente a dez camundongos em um volume de 40 mL/kg durante 14 dias. Dois animais morreram dentro de quatro horas após o início do tratamento revelando a presença de hemorragia em estômago, intestinos, fígado e baço. Neste estudo, a DL₅₀ em camundongos, foi estabelecida como sendo maior que 16 g/kg, uma alta dose indicativa de baixa toxicidade (KYNOCH; LLOYD, 1975).

Em um estudo clínico com voluntários, homens adultos saudáveis, foram submetidos à administração oral de comprimidos contendo 350 mg de C-Med-100[®] durante seis semanas consecutivas. Foram analisados os possíveis efeitos colaterais que poderiam ser desencadeados, além dos parâmetros hematológicos e sinais clínicos como perda de peso, diarreias, constipação, dores de cabeça, náuseas, êmese, erupções cutâneas e edemas. Nenhum efeito colateral foi relatado pelos voluntários do estudo e todos os parâmetros avaliados mantiveram-se normais ao longo do período experimental (SHENG; PERO; WAGNER, 2000b).

3.2 INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS

Em geral, em humanos existe um número limitado de relatos sobre efeitos adversos clinicamente significativos provenientes da administração aguda ou crônica de *U. tomentosa* (PISCOYA et al., 2001; MUR; HARTING; SCHIMER, 2002; SHENG et al., 2001). Entretanto, um relato de caso descreveu que um paciente portador de lúpus eritematoso sistêmico desenvolveu falência renal aguda associada à ingestão de 4 cápsulas/dia de *U. tomentosa*. Os níveis de creatinina e proteinúria mostraram-se aumentados, comparando-se os resultados da urinálise antes do emprego da planta no tratamento. Apesar do emprego de outros fármacos (prednisona, atenolol, metolazona, furosemida e nifedipina) concomitantemente ao tratamento com a *U. tomentosa* e, portanto, a possível interação medicamentosa que possa ter resultado disso, a descontinuidade do tratamento com a planta resultou em parâmetros bioquímicos normais da função renal (HILEPO; BELLUCCI; MOSSEY, 1997).

Estudos indicam que a *U. tomentosa* pode inibir a enzima CYP3A4 do citocromo P450 (BUDZINSKI et al., 2000). Essa enzima é expressa abundantemente no fígado e no intestino delgado, sendo capaz de realizar a biotransformação de vários hormônios esteroides e xenobióticos incluindo medicamentos de várias classes terapêuticas (KLAASSEN;

AMDUR; DOULL, 2001). Um estudo conduzido *in vitro*, utilizando um ensaio fluorimétrico, reportou a ocorrência de efeitos inibitórios sobre a atividade enzimática da CYP3A4 (BUDZINSKI et al., 2000). Este estudo foi utilizado comparativamente para analisar chás provenientes de plantas medicinais, inclusive da *U. tomentosa* e outras misturas naturais, as quais também demonstraram atividade inibitória dose-dependente sobre essa enzima e outras isoformas de enzimas provenientes do citocromo P450 (CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6) (FOSTER et al., 2003), o que pode levar a uma menor biotransformação de xenobióticos, e consequentemente, maior biodisponibilidade dos mesmos.

Baseando-se nas evidências experimentais de que a *U. tomentosa* estimula a fagocitose e pode modular as funções do sistema imune pode-se assumir que ela é capaz de interferir na ação de medicamentos imunossupressores, além disso, devido ao potencial imunoestimulante também atribuído a planta, indivíduos com doenças autoimune ou que utilizam medicamentos com atividade supressora sobre o sistema imune devem evitar fazer uso da *U. tomentosa* (KEPLINGER et al., 1999).

4 OBJETIVOS

Avaliar os possíveis efeitos tóxicos e imunotóxicos da administração do extrato seco de *U. tomentosa* comercialmente disponível no mercado, durante 90 dias, em ratos.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Quantificação dos princípios ativos pertencentes ao grupo dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos (uncarina F, especiofilina, isopteropodina, pteropodina, mitrafilina, isomitrafilina, rincofilina e isorincofilina)
- ✓ Toxicidade em doses-repetidas:
 - Parâmetros clínicos, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos;
 - Avaliação do peso seco de órgãos não-linfoides.
- ✓ Imunotoxicidade:
 - Avaliação do peso relativo de órgãos linfoides (timo e baço), suas celularidades e morfometria do timo;
 - Reação de hipersensibilidade do tipo IV (*Delayed-Type Hypersensitivity* - DTH);
 - Avaliação da resposta imune humoral: Avaliação do número de plasmócitos esplênicos produtores de anticorpos (*Plaque-forming cell assay* - PFC).
 - Avaliação da resposta imune inata e inflamatória: avaliação da atividade de macrófagos peritoneais: “*burst*” oxidativo e fagocitose.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os materiais e os procedimentos utilizados no desenvolvimento desta pesquisa.

5.1 O FITOTERÁPICO E SEUS COMPONENTES QUÍMICOS

Utilizou-se um extrato seco proveniente da casca do caule de *U. tomentosa* (Lot# UNX01/0311, certificado para conter 0,65% de alcaloides totais), geralmente utilizado como matéria-prima para produção do fitoterápico obtido a partir da casca do caule da planta; o controle de qualidade deste material foi fornecido pelo fabricante: "Santosflora: ervas, especiarias e extratos secos, Ltda." (Tatuapé, São Paulo, Brasil).

O pó proveniente do extrato seco foi pesado (200 mg) e extraído com etanol 60% (10 mL) em um banho ultrassônico (20 minutos, 30°C). Uma alíquota de 2 mL foi limpa por extração em fase sólida em coluna de poliamida antes da análise. O cartucho foi condicionado com 2 mL de metanol e depois 5 mL de água. Após a introdução da amostra, os alcaloides foram eluídos com 2 mL de etanol 60% e transferidos para um balão volumétrico de 5 mL.

O método analítico foi previamente descrito por Bertol et al. (2012). O sistema LC nano utilizado consistiu no sistema de HPLC "Shimadzu Proeminence Nano HPLC System" (Shimadzu, Japão) com um auto-injector para distribuição de solvente e a introdução da amostra. Todas as análises foram realizadas com uma coluna Zorbax XDB C18 (150 mm x 4,6 mm, 3.5 μ m). A fase móvel foi realizada com tampão de acetato de trietilamônio 35mM (0,2% v/v), pH 6,9 (A) e acetonitrila (B). Gradiente de composição (A:B): 0-18 minutos (65:35), 18-32 minutos (50:50). Taxa de fluxo foi de 0,8 mL/minutos e a detecção foi a 245 nm. A mitrafilina foi utilizada como padrão de alcaloide puro. Os picos foram designados na base dos seus tempos de retenção em comparação com o padrão (mitrafilina). Na ausência dos compostos de referência, os resultados para os compostos tetracíclicos permitiram o cálculo de uma percentagem em termos da quantidade total dos alcaloides oxindólicos. Para a quantificação de todos os alcaloides, uma curva de calibração de cinco pontos de mitrafilina foi utilizada (8-200 μ g/mL).

Os principais alcaloides da *U. tomentosa* são representados por seis estereoisômeros de alcaloides pentacíclicos, nomeadamente, pteropodina, isopteropodina, especiofilina,

uncarina F, mitrafilina e isomitrafilina. Os dois principais alcaloides tetracíclicos identificados como rincofilina e isorincofilina e dois alcaloides tetracíclicos menores, corinoxéina e isocorinoxéina também foram descritos.

5.2 ANIMAIS

Para realização de cada experimento, foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar, com aproximadamente 60 dias de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ - USP). Os animais foram utilizados em conformidade com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório da FMVZ-USP, protocolo nº 2500/2011, aprovado em 15/02/2012. Os ratos permaneceram durante todo o experimento em caixas plásticas medindo 40x50x20cm e forradas com maravalha esterilizada, sendo alocado 1 (um) rato por caixa. As caixas foram mantidas em sala com aeração, exaustão, temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (45% - 65%) controladas por meio de aparelhos de ar condicionado central em um ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais receberam ração Nuvilab e água filtrada *ad libitum*. Ainda, os mesmos foram mantidos nestas condições por um período de adaptação de no mínimo três dias antes do início de cada experimento, quando estes foram pesados para o controle do ganho de peso e ajuste da dose.

5.3 REAGENTES

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 10% 3 mM (Merck), formol 10% (Merck), álcool etílico 96° (Archote), meio de cultura RPMI-1640 (Gibco), trypan blue (Gibco), kits da Laborlab para albumina, proteínas totais, fosfatase alcalina (FA), alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), γ -glutamyl transpeptidase (GGT), glicose, colesterol, triglicérides, lipoproteínas de alta densidade (HDL), uréia e creatinina; Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) (Calbiochem), diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Molecular Probes), forbol de miristato acetato (PMA), iodeto de propídeo (PI) (Sigma Chemical Co.), bacto ágar a 0,5% (BD), dietilaminoetil (DEAE)-dextrano (Sigma).

5.4 ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO SECO DA *U. TOMENTOSA*

Quarenta ratos machos da linhagem Wistar, foram homocedasticamente divididos em 4 grupos iguais (n=10/grupo), a saber: 1 grupo controle e 3 grupos experimentais.

Para o tratamento dos animais, foram empregadas 3 doses do extrato seco da *U. tomentosa*, aquela convencional indicada para uso humano: 15 mg/kg (dose terapêutica), segundo bula do produto a ser utilizado (a dose foi ajustada para o peso vivo dos ratos) e duas outras, a de 75 e a de 150 mg/kg; conforme preconizado em experimentos clássicos de toxicidade. Para preparar as doses utilizadas no presente estudo, o extrato seco de *U. tomentosa* foi inicialmente pesado e depois suspenso e misturado à água destilada para atingir a concentração final de 15, 75 e 150 mg de extrato seco de *U. tomentosa*/mL.

As soluções-mãe preparadas de cada concentração de *U. tomentosa* foram mantidas sob refrigeração até o momento do uso (4°C). Os animais foram tratados diariamente, por via oral (gavagem), durante 90 dias consecutivos (estudo de toxicidade oral), conforme protocolos sugeridos pela OECD para avaliação de xenobióticos. Os ratos do grupo controle receberam apenas o veículo (água) pela mesma via e período.

5.5 AVALIAÇÃO DO GANHO DE PESO E DO CONSUMO DE RAÇÃO DE RATOS TRATADOS COM A *U. TOMENTOSA*

Durante todo o período experimental, o consumo de ração e o peso dos animais foram avaliados a cada 3 dias, para a adequação das doses a serem administradas e determinação do ganho de peso, bem como consumo total de ração.

5.6 EUTANÁSIA

Ao final de cada delineamento experimental (91º dia após o período experimental), os animais foram submetidos a protocolo de eutanásia aceito pelo Comitê de Bioética Animal da FMVZ. Realizou-se aprofundamento anestésico seguido por deslocamento cervical, para isto, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina, utilizando-se as doses de 5,0 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal (I.P.) e posteriormente às coletas de amostras *in vivo* necessárias, os animais, após anestesia, tiveram a porção cervical da coluna deslocada para promoção da eutanásia.

5.7 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

Para avaliação toxicológica os seguintes procedimentos foram realizados.

5.7.1 Hemograma, parâmetros bioquímicos e histopatologia

A coleta de sangue foi realizada por meio de punção da veia cava caudal em dois tubos com ou sem EDTA 10% para avaliação hematológica e análise da bioquímica sérica, respectivamente. Os parâmetros hematológicos (hemograma completo: séries branca e vermelha) foram avaliados com o uso de sistema automatizado Horiba® ABX e por meio do diferencial de células brancas. As análises séricas das enzimas hepáticas (ALT, AST, FA e GGT), função renal (uréia e creatinina), albumina, proteínas totais, colesterol, triglicérides e HDL, foram realizadas por meio de “kit” comercial da Laborlab em equipamento da CELM - SBA 200, o qual tem como princípio o teste UV otimizado de acordo com a IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*). A metodologia empregada para determinação dos níveis destas enzimas acima citadas está de acordo com as especificações recomendadas pelo fabricante.

Os níveis séricos de imunoglobulina do isotipo G (IgG) foram determinados por meio do método de turbidimetria, seguindo bula de kit da mesma marca daquela descrita acima e submetida a análise no mesmo equipamento.

Para a avaliação histopatológica, após a eutanásia por deslocamento cervical, foram coletados de 5 animais/grupo fragmentos teciduais dos seguintes órgãos: linfonodos mesentéricos, placas de Peyer, fígado, rins e adrenais, os quais foram fixados em formol 10% tamponado, processados seguindo as técnicas de rotina, cortados a 5 micra e corados por hematoxilina e eosina.

5.7.2 Avaliação do peso seco de órgãos não-linfóides

Foram coletados o cérebro, o coração, o fígado, os pulmões e o rim de 5 animais por grupo, os quais foram pesados em balança analítica e colocados em estufa a 60°C durante 24 horas para determinação do peso seco relativo de cada um destes órgãos.

5.8 AVALIAÇÃO IMUNOTOXICOLÓGICA

A avaliação imunotoxicológica foi determinada por meio dos procedimentos descritos a seguir.

5.8.1 Avaliação do peso relativo de órgãos linfoides e suas celularidades

Após a eutanásia por deslocamento cervical, os órgãos linfoides (timo e baço) e a medula óssea do fêmur esquerdo foram coletados para determinação das celularidades do baço e da medula óssea, realizados como segue.

Após análise do peso relativo do timo e do baço, o timo foi fixado em formol para avaliação histopatológica e morfométrica. Quanto ao baço, um fragmento com peso conhecido foi divulsionado, lavado em meio de cultura RPMI-1640 e ressuspenso em 5 mL desse mesmo meio para realização da contagem de esplenócitos; o outro fragmento remanescente do baço foi também fixado em formol para histopatologia. Também foi coletada a medula óssea femoral dos animais, por meio da lavagem do fêmur esquerdo com uma seringa contendo 10 mL do meio de cultura RPMI-1640 (4°C) após o corte de suas epífises. Esta suspensão celular foi gentilmente homogeneizada, centrifugada, e ressuspensa com 5 mL de RPMI (4°C) para contagem de sua celularidade. A viabilidade celular das suspensões de células obtidas do baço e da medula óssea foi realizada com o uso de azul de trypan (0,1%), aceitando-se no mínimo 95% de viabilidade, e o número de células foi determinado com o uso do sistema automatizado *Countess Automated Cell Counter* (Invitrogen).

5.8.2 Morfometria de órgãos linfoides

A avaliação morfométrica do timo foi realizada utilizando-se o *software* Image-J, Version 1.43m (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, USA.) e a razão entre as áreas da região cortical e medular (C/M) foi determinada e calculada pela fórmula $C/M = \text{área total do córtex} / [(\text{área total}) - (\text{área total da medula})]$.

5.8.3 Reação de hipersensibilidade do tipo tardia - *Delayed Type Hypersensitivity assay (DTH)*

Para a sensibilização imunológica dos ratos, nos dias 75° e 82° do período experimental, foi injetado, por via subcutânea na base da cauda de cada animal; 0,2 mL de KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanine*) (1,0 mg/mL em PBS).

No 89° dia do período experimental, preparou-se o *heat-aggregated-KLH*, aquecendo-se o KLH (10 mg/mL em salina) por 1 hora em banho-maria a 75°C. Esta solução foi centrifugada a 2000 rpm, por 10 minutos, para remover excesso de salina e, a seguir, injetada por via intradérmica (I.D.) (0,1 mL/rato) no coxim plantar da pata esquerda dos animais.

Após 24 horas do desafio com o *heat-aggregated-KLH*, o edema resultante foi medido por meio da espessura plantar com o paquímetro. Os resultados do DTH foram expressos a partir da subtração do valor obtido na mensuração do coxim plantar da pata que recebeu o *heat-aggregated-KLH* com o valor obtido na mensuração do coxim plantar da pata que não recebeu o inóculo.

5.8.4 Avaliação da resposta imune humoral

A resposta imune humoral foi avaliada por meio da quantificação do número de plasmócitos esplênicos produtores de anticorpos específicos (PFC: *Plaque-forming cell*).

5.8.4.1 Obtenção dos eritrócitos de carneiro e a sensibilização dos animais

A técnica de titulação de anticorpos anti-SRBC foi realizada, com modificações, de acordo com Sharma, James e Molineux (2004). Para tal, foram coletados assepticamente em tubo heparinizado eritrócitos de carneiro (SRBC - *sheep red blood cell*) reprodutor adulto, sadio, pertencente ao Setor de Pequenos Ruminantes da FMVZ-USP, o número do animal foi anotado para eventuais coletadas posteriores de sangue.

O tubo de sangue total, após homogeneizado, foi mantido em geladeira (10°C) por pelo menos 24 horas antes de ser utilizado para ser administrado em ratos e promover a sensibilização dos mesmos sete dias antes do final do período experimental (83° dia de experimento). Antes da sensibilização, os eritrócitos de carneiro foram lavados 3 vezes em PBS (centrifugação a 4000 rpm, por 10 minutos) e uma suspensão de SRBC foi ajustada para

$2,0 \times 10^9$ eritrócitos de carneiro/mL, sendo injetado 1 mL deste volume, por via I.P, nos ratos pertencentes aos grupos experimentais. Os animais do grupo controle receberam injeção de 1 mL de PBS estéril pela mesma via.

5.8.4.2 O ensaio do PFC

A técnica do PFC foi realizada com modificações, segundo Wilson, Mundson e Meade (1999). Para a preparação do SRBC que foi utilizado para plaquear as amostras, os eritrócitos de carneiro foram lavados 3x (na mesma rotação que acima), na última lavada, tirou-se o sobrenadante e homogeneizaram-se os eritrócitos no tubo (SRBC total). Desta solução de SRBC total, fez-se uma diluição de 1:2 (p.ex. 0,5 mL de SRBC total + 0,5 mL de salina) e manteve-se em gelo até o momento de plaquear.

O baço dos animais sensibilizados com SRBC foi coletado, após a sua divulsão, os esplenócitos foram centrifugados (centrífuga 1500 rpm, 10 minutos, 4°C), o sobrenadante retirado, e adicionada solução salina 0,2% a qual foi homogeneizada por 20 segundos com o pellet de células para promover a lise das células vermelhas e imediatamente depois foi adicionado o mesmo volume de uma solução salina a 1,6%. Os esplenócitos foram, então, contados e foi preparada uma suspensão celular com $12,0 \times 10^6$ células/mL.

Para a confecção da placa foi preparada uma solução de bacto ágar a 0,5%, utilizando RPMI-1640, (100 mL de meio com 0,5 g de bacto ágar). Esta solução foi colocada em homogeneizador magnético sob agitação e aquecimento até fervura. Após fervura, foi adicionado dietilaminoetil (DEAE)-dextrano (1,6 mL de uma solução 0,05% de DEAE para cada 100 mL de ágar). Enquanto isso foi colocado em banho-maria com temperatura entre 46 e 48°C, microtubos (1,5 mL) já com a identificação das amostras. Em cada microtubo, ainda no banho-maria, foi adicionada 0,5 mL da solução de bacto ágar.

5.8.4.3 O plaqueamento

Para plaquear, adicionou-se em um microtubo de 0,5 mL: 25 μ L da suspensão de SRBC (1:2) + 100 μ L da suspensão de esplenócitos + 70 μ L de soro de cobaia (sistema complemento).

Estas misturas de suspensões celulares foram transferidas para o microtubo contendo bacto ágar o qual foi submetido ao vórtex por 5 vezes e em seguida foi plaqueado em lâmina

de histologia, previamente limpa, 50 μ L desta suspensão, cuidadosamente colocou-se sobre a gota formada a lamínula, também previamente limpa (22x22). Aguardou-se alguns minutos e a lamínula foi selada com esmalte incolor ou base. As placas foram levadas à estufa a 37°C por 3 horas. Após este período, os halos de lise de eritrócitos de carneiro foram contados e representados como número de PFC/ 10^5 esplenócitos.

5.8.5 Avaliação de atividade dos macrófagos peritoneais por meio do “burst” oxidativo e da fagocitose

Para avaliação da resposta inflamatória e imunidade inata dos animais, no 85º dia do período experimental, todos os ratos receberam um injeção I.P. de 5 mL de uma solução de tioglicolato a 3% estéril para induzir a elicitação de macrófagos até a cavidade abdominal.

5.8.5.1 Coleta das células peritoneais elicitadas pelo tioglicolato 3%

Ao final do período experimental, todos os animais foram sacrificados para realizar a análise de macrófagos. Para isso, 10 mL de PBS gelado foram lentamente injetados na cavidade peritoneal utilizando uma agulha 26G1/2. Após massagem abdominal, foi colhida uma suspensão de células, através de uma punção da cavidade peritoneal. Estas células foram mantidas em banho de gelo, dentro de tubos de ensaio de plástico de polipropileno até serem quantificadas em câmara de *Neubauer*. As suspensões de células conservadas em banho de gelo foram ajustadas para $2,0 \times 10^6$ células/mL e 100 μ L da solução obtida foram utilizados para analisar a atividade fagocítica e a resposta do “burst” oxidativo de macrófagos.

5.8.5.2 Execução da técnica para avaliação do “burst” oxidativo e fagocitose

O método de análise foi adotado a partir do delineado por Hasui et al. (1989) para análise da resposta do “burst” oxidativo. Para tal foram preparados com as suspensões celulares de macrófagos peritoneais obtidas de cada rato (2×10^6 células/tubo), os seguintes tubos:

- Tubo 1: $2,0 \times 10^6$ células em 1 mL de PBS;

- Tubo 2: 100 μ L da amostra, 200 μ L de 2',7'-diclorfluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (0,3 μ M) em 800 μ L de PBS. O DCFH-DA reage com os radicais livres produzidos pelas células e emite fluorescência verde;
- Tubo 3: 100 μ L da amostra, 100 μ L de *Staphylococcus aureus* conjugado com o iodeto de propídeo (SAPI) em 900 μ L de PBS. O iodeto de propídeo se intercala ao DNA da célula e emite fluorescência vermelha;
- Tubo 4: 100 μ L da amostra, 200 μ L de DCFH-DA (0,3 μ M), 100 μ L de SAPI em 700 μ L de PBS;
- Tubo 5: 100 μ L da amostra, 200 μ L de DCFH-DA (0,3 μ M), 100 μ L de PMA (1 ng/ μ L) em 700 μ L de PBS.

O forbol de miristato acetato (PMA) e o SAPI foram usados como estímulos *in vitro* para a produção de radicais livres de oxigênio. O tubo contendo apenas SAPI foi utilizado para avaliação da fagocitose. Todas as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos, logo após adicionou-se 2 mL de EDTA (3 mM) para parar a reação. As amostras foram então centrifugadas (1500 rpm/5 minutos) e ressuspensas em 300 μ L de PBS. Em seguida foi realizada a análise por citometria de fluxo.

Foram adquiridos dez mil eventos de neutrófilos utilizando a citometria de fluxo (FACS Calibur FACSCalibur citômetro de fluxo equipado com Cell Quest Pro[®] Software (Becton Dickinson [BD] Immunocytometry System). Os valores referentes ao “burst” oxidativo e a fagocitose foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelos macrófagos peritoneiais. Este valor foi fornecido pelo aparelho a partir do *gate* selecionado para a população celular de interesse e pela análise do histograma de fluorescência da população. Os resultados foram analisados utilizando o FlowJo 7.2.2[®] Software (Tree Star Inc, Ashland, KY).

5.9 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

- Experimento 1: avaliação dos efeitos do tratamento com a *U. tomentosa*, por gavagem durante 90 dias, sobre parâmetros hemáticos, bioquímicos, histológicos e sobre órgãos linfóides de ratos

Foram empregados 40 ratos, divididos em 4 grupos iguais (n=10/grupo), um grupo controle e 3 grupos experimentais os quais foram tratados com 15, 75 e 150 mg/kg de *U.*

tomentosa, por gavagem, durante 90 dias, conforme descrito no item 5.4. Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e consumo de ração, conforme descrito no item 5.5. No final do período experimental, todos os ratos foram previamente pesados e anestesiados (item 5.6) para coleta de amostras sanguíneas para determinação do hemograma completo e dos níveis séricos dos parâmetros bioquímicos, conforme detalhado no item 5.7.1 Após a eutanásia dos ratos (item 5.6), foram coletadas amostras teciduais, de 3 animais por grupo, de diferentes órgãos para avaliação histopatológica (item 5.7.1), bem como coleta do cérebro, coração, fígado, pulmões e rim, de 5 animais por grupo, para avaliação do peso seco destes órgãos (item 5.7.2). Foram coletados também os órgãos linfoides timo e baço para determinação do peso relativo de cada órgão e da celularidade do baço e da medula óssea, conforme detalhadamente descrito no item 5.8.1. Ainda, os fragmentos dos órgãos linfoides coletados foram avaliados quanto à sua histopatologia e o timo foi submetido à morfometria, conforme descrito no item 5.8.2.

- Experimento 2: avaliação dos efeitos do tratamento com a *U. tomentosa*, por gavagem durante 90 dias, sobre a reação de hipersensibilidade do tipo tardia (dth)

Foram empregados 40 ratos, divididos em 4 grupos iguais (n=10/grupo), um grupo controle e 3 grupos experimentais os quais foram tratados com 15, 75 e 150 mg/kg de *U. tomentosa*, por gavagem, durante 90 dias, conforme descrito no item 5.4. Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e consumo de ração, conforme descrito no item 5.5. No 75º e 82º dias do período experimental, todos os ratos foram sensibilizados com uma solução de KLH, conforme descrito no item 5.8.3. No 89º dia do período experimental, os ratos receberam por via I.D. no coxim plantar esquerdo, o desafio imunológico, por meio da inoculação de uma solução denominada de *heat-aggregated-KLH*. No dia seguinte ao inóculo, após a eutanásia dos ratos (item 5.6), o “tumor” gerado pelo desafio com KLH foi avaliado com o uso do paquímetro, procedimentos estes detalhadamente descritos no item 5.8.3.

- Experimento 3: avaliação dos efeitos do tratamento com a *U. tomentosa*, por gavagem durante 90 dias, sobre a resposta imune humoral de ratos

Foram empregados 40 ratos, divididos em 4 grupos iguais (n=10/grupo), um grupo controle e 3 grupos experimentais os quais foram tratados com 15, 75 e 150 mg/kg de *U. tomentosa*, por gavagem, durante 90 dias, conforme descrito no item 5.4. Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e consumo de ração, conforme descrito no item 5.5. No 83º dia do período experimental, todos os ratos receberam um injeção I.P. de 1 mL de uma suspensão de SRBC ajustada para $2,0 \times 10^9$ eritrócitos de carneiro/mL, conforme descrito no item 5.8.4.1. Ao final do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia (item 5.6), para realização da análise da coleta de sangue e baço, procedimentos estes detalhadamente descritos no item 5.8.4.2 e 5.8.4.3.

- Experimento 4: avaliação dos efeitos do tratamento com a *U. tomentosa*, por gavagem durante 90 dias, sobre atividade de macrófagos peritoneais por meio do “burst” oxidativo e da fagocitose

Foram empregados 40 ratos, divididos em 4 grupos iguais (n=10/grupo), um grupo controle e 3 grupos experimentais os quais foram tratados com 15, 75 e 150 mg/kg de *U. tomentosa*, por gavagem, durante 90 dias, conforme descrito no item 5.4. Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e consumo de ração, conforme descrito no item 5.5. No 85º dia do período experimental, todos os ratos receberam um injeção I.P. de 5 mL de uma solução de tioglicolato estéril a 3%, conforme descrito no item 5.8.5.1. Ao final do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia (item 5.6), para realização da análise de macrófagos, procedimentos estes detalhadamente descritos no item 5.8.5.2.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5.03[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Foi empregada a análise de variância ANOVA (SNEDCOR, 1946) seguida pelo teste de Dunnett para múltiplas comparações. A análise de variância Kruskal-Wallis seguida do teste de Dunnett foi utilizada para dados não paramétricos. Os resultados obtidos foram apresentados na forma de média e seus respectivos erros-padrão, e as

diferenças entre os grupos controle e experimental foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos são relatados a seguir.

6.1 ESTUDO QUÍMICO

Os resultados da análise cromatográfica indicaram que a pteropodina (20%), a isopteropodina (12%) e a isomitrafalina (10%) foram os alcaloides mais abundantes no extrato de casca do caule. Especiofilina (11%), uncarina F (4%) e mitrafalina (18%) corresponderam a 33% do conteúdo de alcaloides pentacíclicos, totalizando 75%. O teor de alcaloides tetracíclicos foi de 25%, determinado como rincofilina (15%), isorincofilina (10%). Corinoxeína e isocorinoxeína foram detectados, mas não foi possível quantificá-los, pois são considerados traços de alcaloides (Figura 4).

Figura 4 - Cromatograma de HPLC da fração rica em alcaloides provenientes da casca de *Uncaria tomentosa* L. (Rubiaceae), foram identificados oito alcaloides, incluindo: (A) especiofilina (B) uncarina F, (C) mitrafalina, (D) rincofilina; (E) isomitrafalina, (F) pteropodina, (L) isoriconfilina, (H) isopteropodina

Fonte: (MENDES, et al., 2014)

6.2 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

São descritos os resultados referentes a avaliação toxicológica.

6.2.1 Avaliação do ganho de peso e do consumo de ração de ratos tratados com a *U. tomentosa*

A tabela 2 mostra o consumo de ração e o ganho de peso total de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg de *U. tomentosa*, durante 90 dias, por gavagem. A análise de variância (ANOVA) empregada não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais durante todo o período experimental, seja no que diz respeito ao ganho de peso total, seja em relação ao consumo total de ração por 90 dias.

Tabela 2 - Consumo de ração e ganho de peso total de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg do extrato seco da *Uncaria tomentosa*, durante 90 dias, por gavagem. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões

	Grupos			
	Controle (n=10)	15 mg/kg (n=10)	75 mg/kg (n=10)	150 mg/kg (n=10)
Consumo de ração (g)	2368,9 ± 80,2	2536,6 ± 83,8	2491,5 ± 65,3	2483,2 ± 67,5
Ganho de peso (g)	80,2 ± 7,4	101,6 ± 4,7	93,0 ± 8,5	86,6 ± 13,7

Fonte: (MENDES, P. F., 2014)

6.2.2 Hemograma

A tabela 3 mostra os resultados obtidos com a avaliação do diferencial de células sanguíneas circulantes de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg de *U. tomentosa*, durante 90 dias, por gavagem. A ANOVA não foi capaz de detectar diferenças estatisticamente significantes, durante todo o período avaliado, entre os grupos de animais tratados ou não. Ainda, os outros dados do hemograma completo, a saber: hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), foram submetidos ao mesmo teste matemático de

variância e nenhuma alteração entre os grupos de animais foi detectada (dados não mostrados).

Tabela 3 - Diferencial de células sanguíneas circulantes de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg do extrato seco da *Uncaria tomentosa*, durante 90 dias, por gavagem. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões

	Grupos			
	Controle (n=10)	15 mg/kg (n=10)	75 mg/kg (n=10)	150 mg/kg (n=10)
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	$8,2 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,2$
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	$5,8 \pm 0,5$	$5,9 \pm 0,5$	$6,6 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,5$
Neutrófilos (%)	$22,4 \pm 1,1$	$23,7 \pm 2,1$	$23,2 \pm 2,3$	$22,4 \pm 1,9$
Linfócitos (%)	$72,7 \pm 1,0$	$74,5 \pm 2,2$	$74,3 \pm 2,3$	$75,1 \pm 2,1$
Monócitos (%)	$4,0 \pm 0,6$	$2,2 \pm 0,7$	$2,6 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,5$
Eosinófilos (%)	$0,7 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,2$
Basófilos (%)	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

Fonte: (MENDES, P. F., 2014)

6.2.3 Parâmetros bioquímicos

A tabela 4 mostra os resultados da bioquímica sérica de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg de *U. tomentosa*, durante 90 dias, por gavagem. A análise estatística empregada (ANOVA) revelou haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais quando avaliados quanto aos níveis de ALT e de glicose ($F=7,068$ e $F=11,02$, respectivamente; $df=3,34$ e $p<0,01$). O teste *posthoc* de Dunnett revelou que os animais tratados com a dose de 75 mg/kg da *U. tomentosa* exibiram aumento nos índices da enzima hepática ALT quando comparados com os animais do grupo controle. Por outro lado, o mesmo teste revelou que os animais tratados com as doses de 75 e 150 mg/kg exibiram uma redução nos níveis séricos de glicose quando comparados com os ratos não tratados. Nos outros parâmetros da bioquímica sérica avaliada, nenhuma alteração estatisticamente significativa foi evidenciada pela análise de variância empregada. Vale ainda ressaltar que a análise matemática (ANOVA) dos resultados referentes aos níveis séricos de IgG pelo método de turbidimetria não foi capaz de evidenciar qualquer alteração nos níveis deste isotipo de

anticorpos entre os diferentes grupos de animais aqui estudados (Controle = $380,1 \pm 54,7$; 15mg/kg = $461,4 \pm 48,0$; 75mg/kg = $451,5 \pm 54,4$; 150mg/kg = $499,3 \pm 41,7$).

Tabela 4 - Bioquímica sérica de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg do extrato seco da *Uncaria tomentosa*, durante 90 dias, por gavagem. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões

Grupos	^a AST (U/L)	ALT (U/L)	FA (U/L)	GGT (mg/dl)	Pt (g/dl)	Alb (g/dl)	Gli (mg/dl)	Col (mg/dl)	Trig (mg/dl)	HDL (mg/dl)
Controle	64,9±5,4(8) ^b	29,2±2,7(8)	81,9±5,1(8)	1,3±0,2(6)	6,3±0,1(8)	3,2±0,0(8)	125,1±11,7(8)	93,5±5,2(8)	44,8±9,3(8)	77,3±11,6 (8)
15 mg/kg	71,6±3,9	33,0±2,3	95,1±5,8	1,1±0,2(9)	6,6±0,1	3,2±0,0	141,9±5,1	99,7±3,6	37,1±6,1	84,1±10
75 mg/kg	70,1±3,3(8)	47,2±4**	93,8±6,6	1,4±0,2(6)	6,3±0,1	3,2±0,0	100,3±6,1*	91,5±2,1	49,5±5,6	78,5±12,3
150 mg/kg	72,7±4,6	39,4±2(9)	98,8±4,9	1,1±0,1(9)	6,3±0,1	3,2±0,0	94,6±4,0*	92,7±4,0	38,6±6,1	82,3±13,8

Nota: ^aAST= aspartato aminotransferase; ALT= alanina aminotransferase; FA=fosfatase alcalina; GGT= *gamma-glutamyl transpeptidase*; Pt=proteínas totais; Alb= albumina; Gli=glicose; Col=colesterol; Trig= triglicérides; HDL= high density lipoproteins; ^bNúmero de amostras aptas à análise por espectrofotometria; *p< 0,05; **p< 0,01 *versus* grupo controle, teste de Dunnett. Fonte: (MENDES, P. F., 2014)

6.2.4 Histopatologia

A figura 5 ilustra uma amostra de tecido hepático de animal pertencente ao grupo controle (a), e de animal tratado com a dose de 150 mg/kg da *U. tomentosa* (b). Note na amostra tecidual de rato exposto à *U. tomentosa* a presença de vacuolização dos hepatócitos, predominantemente na zona centrolobular do fígado (aumento de 20X, HE).

Figura 5 - Avaliação histopatológica de ratos tratados ou não (a) com extrato seco da *Uncaria tomentosa*, durante 90 dias, por gavagem. Nota-se a presença de vacuolização na zona centrolobular dos hepatócitos dos ratos tratados com 150 mg/kg de extrato seco da *Uncaria tomentosa* (b), HE, 20X

Fonte: (MENDES, P. F., 2014)

6.2.5 Avaliação do peso seco de órgãos não-linfoides

Quando o peso seco dos órgãos não-linfoides (cérebro, pulmão, coração, fígado e rins) foi avaliado nenhuma diferença estatisticamente significativa (ANOVA) foi observada entre os grupos de animais tratados e não tratados com o extrato seco da *U. tomentosa* (dados não apresentados).

6.3 AVALIAÇÃO IMUNOTOXICOLÓGICA

Abaixo encontram-se descritos os resultados referentes a avaliação imunotoxicológica.

6.3.1 Avaliação do peso relativo de órgãos linfoides, suas celularidades e morfometria

A tabela 5 mostra os resultados da avaliação do peso relativo de órgãos linfoides, suas celularidades e a morfometria do timo de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg de *U. tomentosa*, durante 90 dias, por gavagem. Considerando estes parâmetros analisados, a ANOVA não foi capaz de detectar quaisquer diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais estudados em todos os parâmetros relacionados a estes órgãos linfoides.

Tabela 5 - Peso relativo de timo e baço; morfometria do timo (razão córtex/medula) e celularidade de baço e medula óssea de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg do extrato seco da *Uncaria tomentosa*, durante 90 dias, por gavagem. São apresentadas as médias e seus respectivos erros-padrões

	Grupos			
	Controle (n=10)	15 mg/kg (n=10)	75 mg/kg (n=10)	150 mg/kg (n=10)
Timo (x10 ⁻³ g/100g de PV ^a)	54,6 ± 2,9	59,3 ± 2,7	56,3 ± 1,6	59,6 ± 3,4
Baço (x10 ⁻³ g/100g de PV ^a)	216,0 ± 13,7	221,8 ± 10,6	235,7 ± 7,0	234,7 ± 10,3
Celularidade do baço (x10 ⁷ /g de baço)	8,3 ± 0,3	7,9 ± 0,5	7,6 ± 0,4	6,6 ± 0,8
Celularidade da medula óssea (x10 ⁶ células)	0,4 ± 0,03	0,3 ± 0,05	0,4 ± 0,03	0,4 ± 0,01
C/M razão ^b	0,4 ± 0,08	0,28 ± 0,10	0,37 ± 0,07	0,45 ± 0,10

Nota: ^aPV= peso vivo; ^bC/M razão= razão córtex/medula. Fonte: (MENDES, P. F., 2014)

6.3.2 Reação de hipersensibilidade do tipo tardia - (DTH)

Apesar de ter sido observado uma diminuição no tumor gerado pelo desafio com o *heat-aggregated-KLH*, a ANOVA empregada para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos de animais tratados e não tratados com a *U. tomentosa* não revelou quaisquer diferenças entre os grupos de animais (Figura 6).

Figura 6 - Reação de hipersensibilidade tardia (DTH), em mm, de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg do extrato seco da *Uncaria tomentosa*, durante 90 dias, por gavagem. São apresentados as médias e seus respectivos erros-padrões

Fonte: (MENDES, P. F., 2014)

6.3.3 Avaliação da resposta imune humoral

A avaliação da resposta imune humoral dos animais tratados ou não com o extrato seco da *U. tomentosa* foi determinada por meio da quantificação do número de plasmócitos esplênicos produtores de anticorpos específicos ao antígeno (SRBC). Apesar do teste ANOVA não ter sido capaz de detectar alterações estatisticamente significantes entre os grupos de animais, o valor de $p < 0,06$ obtido desta análise mostra haver uma tendência estatística, e caso o Teste de Dunnett fosse empregado, seria possível observar um aumento estatisticamente significativo no número de plasmócitos produtores de anticorpos anti-SRBC naqueles animais tratados com a maior dose (150 mg/kg) de *U. tomentosa* quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 7).

Figura 7 - Avaliação da resposta imune adquirida de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg do extrato seco da *Uncaria tomentosa*, durante 90 dias, por gavagem. São apresentados as médias e seus respectivos erros-padrões

Fonte: (MENDES, P. F., 2014)

6.3.4 Avaliação da resposta imune inata e inflamatória de macrófagos peritoneais (“burst” oxidativo)

Dentre os ensaios realizados para avaliação da atividade de macrófagos peritoneais de ratos tratados ou não com o extrato seco da planta, a ANOVA foi capaz de detectar alterações significantes entre os grupos de animais, somente relacionadas à atividade fagocítica destas células ($F=3,08$ com $df=3,34$ e $p<0,05$). O teste *posthoc* revelou que somente os animais tratados com a dose de 75 mg/kg de *U. tomentosa* exibiram um aumento da efetividade de fagocitose dos macrófagos peritoneais quando comparados com os animais pertencentes ao grupo controle (Figura 8).

Em relação aos outros parâmetros da resposta inflamatória destas células peritoneais destes, o mesmo teste estatístico de variância não foi capaz de detectar qualquer alteração estatisticamente significante entre os grupos de animais (dados não mostrados).

Figura 8 - Avaliação da efetividade fagocítica de macrófagos peritoneais de ratos tratados com 0, 15, 75 e 150 mg/kg do extrato seco da *Uncaria tomentosa*, durante 90 dias, por gavagem. São apresentados as médias e seus respectivos erros-padrões. * $p < 0,05$ versus grupo controle, teste de Dunnett

Fonte: (MENDES, P. F., 2014)

7 DISCUSSÃO

A *U. tomentosa* é um fitoterápico mundialmente empregado para o tratamento de diversas doenças envolvendo processos inflamatórios e reumáticos, neoplasias e outras enfermidades (RIZZI et al., 1993; SHENG et al., 1998; RIVA et al., 2001). As propriedades terapêuticas sugeridas nas prescrições manufaturadas aliadas às crenças populares sobre a segurança das plantas medicinais, devido à sua origem natural, são fatores que estimulam as pessoas a acreditarem que o uso crônico e indiscriminado da *U. tomentosa* não oferece riscos à saúde. Assim, no presente estudo, tentou-se estabelecer um cenário de exposição semelhante ao que ocorre na medicina tradicional. Para isso, foi utilizado então, uma dose terapêutica (15 mg/kg), uma dose intermediária (75 mg/kg) e uma dose 10 vezes maior do que a recomendada (150 mg/kg), durante 3 meses, com a finalidade de verificar a segurança toxicológica da *U. tomentosa* e seus possíveis efeitos imunotóxicos em ratos.

A dose mais baixa utilizada em nosso estudo foi determinada de acordo com as recomendações do “Santosflora: ervas, especiarias e extratos secos^{Ltda}”, que indica 6 cápsulas de 150 mg/dia de extrato seco da *U. tomentosa*. Considerando um homem adulto com 60 kg (peso médio aceito pela ANVISA), a ingestão recomendada é de 900 mg/dia; assim, a dose mais baixa empregada neste experimento foi a de 15 mg/kg, diariamente.

No entanto, independente da indicação de bula, os alcaloides da *U. tomentosa* não são discriminados neste insumo. Assim, foi realizado um estudo químico, no qual teve-se como objetivo a quantificação dos principais alcaloides oxindólicos, tanto os pentacíclicos (que perfaz 75% do total), quanto os tetracíclicos (25%). Assim, uma vez determinado e quantificado tais alcaloides, foi possível dar sequência na experimentação, uma vez que estes valores estão de acordo com aqueles preconizados na literatura (MONTORO et al., 2004).

Quando estudos *in vivo* são realizados com a finalidade de avaliar efeitos tóxicos de xenobióticos sobre o sistema imune, é importante verificar se as doses utilizadas não são capazes de causar toxicidade exacerbada e/ou sinais clínicos nos animais testados, pois distúrbios de saúde, como febre (HERON; BERG, 1978; ROBERTS, 1991) ou estresse (IDOVA; CHEIDO; DEVOINO, 1997) podem ser prejudiciais para a avaliação de parâmetros imunológicos, e um dos mais significativos sinais de toxicidade observados em modelos animais estão relacionados à anorexia e à perda de peso (STEVENS; GALLO, 1989).

No presente estudo, não foi observado redução no consumo de ração ou no ganho de peso entre os grupos de animais tratados ou não com extrato da *U. tomentosa*, revelando desta

forma, que as doses empregadas neste projeto são aceitáveis para avaliação imunotoxicológica.

Com a finalidade de padronizar protocolos toxicológicos em todo o mundo, várias agências regulamentadoras/normatizadoras como o FDA, a OECD e o US-EPA propuseram alguns modelos *in vivo* e *in vitro* para avaliar a segurança de medicamentos e outros compostos químicos para o ser humano, como aqueles aqui empregados em um estudo de 90 dias consecutivos. Geralmente, essas agências propõem para estudos de 90 dias, preferencialmente o uso de ratos de ambos os sexos; no entanto, para evitar a possível influência de hormônios femininos, como o estrógeno, sabidamente com atividade imunomodulatória (LANG, 2004; WALKER, 2011), decidiu-se utilizar somente ratos machos para estudar os possíveis efeitos tóxicos e imunotóxicos do extrato da *U. tomentosa*.

A alteração na contagem de células sanguíneas (vermelhas e brancas) é uma das primeiras indicações de um possível efeito imunotóxico de um composto. Os resultados do hemograma aqui apresentados não revelaram quaisquer efeitos deletérios promovidos pela *U. tomentosa* sobre estes parâmetros. Além disso, a avaliação da medula óssea de animais tratados com o fitoterápico não revelou alterações na sua celularidade e na celularidade do baço. De fato, apesar dos relatos *in vitro* sobre o efeito linfoproliferativo e do aumento na porcentagem de linfócitos circulantes promovidos pela *U. tomentosa* (WURM et al., 1998; SHENG; BRYNGELSSON; PERO, 2000a), nenhuma alteração foi evidenciada em todos os parâmetros de celularidade aqui avaliados. No entanto, é importante salientar que até este momento, nenhum desafio imunológico passível de revelar qualquer atividade linfoproliferativa anormal havia sido realizado nos animais. O que mais uma vez vai de encontro com estudos realizados por Keplinger et al. (1999), em que linfoblastos B e T, ou seja, células linfoides ainda não maduras e sem estímulos antigênicos, entram em atividade proliferativa em resposta a fatores endoteliais liberados pelos alcaloides oxindólicos pentacíclicos da *U. tomentosa*.

Durante uma resposta imune, os linfócitos B podem realizar o “switch”, ou seja, mudar a expressão da classe de imunoglobulina (isotipo) que apresentam (por exemplo, mudar de IgM para IgG). Esta mudança de classe é baseada em eventos de recombinação de DNA que resultam na troca de segmentos de genes que codificam a região constante da cadeia pesada das imunoglobulinas, entretanto, a cadeia pesada da região variável da imunoglobulina é retida. Este processo altera a eficácia do anticorpo correspondente, resultando no aumento da especificidade ao antígeno (KRACKER; RADBRUCH, 2004). Geralmente, o “switch” ocorre após o linfócito B ter sido estimulado por um antígeno, como, por exemplo, a

sensibilização pelo KLH (NOSSAL et al., 1964; WITKO-SARSAT et al., 2000). O tumor gerado pelo KLH não resultou em diferenças estatísticas devido ao tratamento com a *U. tomentosa*, e não foram observadas mudanças nos níveis séricos de IgG entre os grupos de ratos, indicando que a *U. tomentosa* não promoveu efeito imunomodulador sobre as respostas imunes, celular ou humoral.

No entanto, vale ressaltar que um método amplamente aceito pelas agências normatizadoras para avaliação de risco de xenobióticos, preconiza como protocolo de avaliação da resposta humoral, não os níveis séricos de imunoglobulinas, mas um ensaio que avalie a funcionalidade da resposta imune humoral do tipo T-dependente sendo tal protocolo de escolha, o PFC (GORE, 2006; LADICS, 2007).

Considerando os resultados referentes ao PFC aqui obtidos, a tendência estatística ($p < 0,06$) no aumento no número de células produtoras de anticorpos específicos anti-SRBC, resultante da proliferação de linfócitos esplênicos em resposta ao desafio antigênico ocorrido de forma dose-dependente, encontra subsídios na literatura que alicerçam a hipótese de que a *U. tomentosa* aqui empregada possui atividade imunomodulatória sobre a resposta imune humoral.

Em um experimento realizado por Sheng, Bryngelsson e Pero (2000a), ratas tratadas com o C-Med-100[®], durante oito semanas consecutivas, exibiram aumento da proliferação de linfócitos esplênicos estimulados pela fitohemaglutinina. Ainda, em um estudo realizado por Domingues et al. (2011) com camundongos tratados com extrato hidroalcoólico da *U. tomentosa*, durante 28 dias, revelou um alargamento da zona marginal do baço, local de predileção de linfócitos B. Outro estudo realizado por Ruiz e Olano (2013), com a finalidade de avaliar a atividade imunoestimulatória de um extrato hidroalcoólico contendo 5% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos de *U. tomentosa* em camundongos, revelou que camundongos tratados com este extrato apresentaram maior ativação de linfócitos B esplênicos, sendo sugerido pelos mesmos autores que este extrato seja utilizado como potente adjuvante na estimulação da resposta de linfócitos B e consequentemente na produção de anticorpos.

Apesar dos efeitos anti-inflamatórios atribuídos à *U. tomentosa* na literatura (SANDOVAL; THOMPSON; ZHANG, 2000; REIS et al., 2008), os resultados aqui apresentados não são conclusivos, uma vez que só os ratos tratados com 75 mg/kg de *U. tomentosa* exibiram efeitos imunomodulatórios sobre a atividade de macrófagos. Além disso, o aumento na fagocitose, isoladamente, não é suficiente para revelar possíveis propriedades anti-inflamatórias da *U. tomentosa*.

Quando se realizou a análise bioquímica, foi observado um aumento nos níveis séricos de ALT em ratos tratados com a dose de 75 mg/kg do extrato seco da *U. tomentosa*. Nenhuma diferença foi observada em relação aos níveis de AST, FA, GGT e no peso seco do fígado. É importante ressaltar que, apesar da ocorrência da ALT em outros tecidos, como músculos, coração e rins (DAVIES, 1992), não houve indicações de efeitos adversos no peso relativo ou na histologia desses órgãos nos animais tratados. A ALT é considerada um indicador mais sensível e específico de injúria hepatocelular do que a outras enzimas de função hepática, como AST, dados estes disponíveis em ratos, cães e primatas não humanos (BOONE et al., 2005), no entanto, a análise histopatológica do fígado revelou somente a presença de uma discreta vacuolização centro-lobular nos ratos expostos a maior dose de *U. tomentosa* e, nenhuma lesão necrótica foi observada no animais tratados. Assim, o aumento sérico de ALT evidenciado neste estudo, parece não ter significado clínico-biológico.

Além dos resultados bioquímicos, notou-se que os ratos tratados com 75 e 150 mg/kg de extrato seco da *U. tomentosa* apresentaram uma redução nos níveis de glicose no sangue. Apesar do uso popular das espécies de *Uncaria* em todo o mundo ser principalmente para o tratamento de diversas desordens inflamatórias, não há relatos científicos de seu uso para diminuir níveis séricos de glicose. Recentemente, um estudo realizado *in vitro* utilizando extratos de uma espécie da *Uncaria* proveniente da Malásia evidenciou sua atividade inibitória sobre a α -glucosidase similar à promovida pelo *1-deoxinojirimicina*, um potente antagonista sintético dessa enzima (AHMAD et al., 2011). Em um estudo realizado por Domingues et al. (2011) empregando extrato etanol-aquoso da *U. tomentosa* em um modelo de diabetes em camundongos induzida pela estreptozotocina, foi possível observar uma redução nos índices glicêmicos e na incidência de diabetes nos camundongos testados. Sabe-se que o ácido ursólico, um ácido triterpeno pentacíclico isolado da *U. hirsuta* tem muitas atividades biológicas, incluindo atividade hipoglicêmica (SAFAYHI; SAILER, 1997). A *U. tomentosa* também possui este ácido como constituinte químico (AQUINO et al., 1991; HEITZMAN et al., 2005), sugerindo dessa forma, que esta espécie de planta pode possuir esta mesma atividade.

Os efeitos hipoglicemiantes do extrato ocorreram em doses que são consistentes com aquelas empregadas na prática da medicina tradicional, o que proporciona uma forte evidência para a hipótese de que a *U. tomentosa* dispõe de propriedades hipoglicêmicas.

É importante levantar a questão: como a diminuição dos níveis de glicose no sangue pode ser benéfica em indivíduos não diabéticos ou, especialmente, em pacientes diabéticos que empregam a insulina e a *U. tomentosa* para o tratamento de outras doenças não

relacionadas? É sabido que a hipoglicemia pode refletir em um efeito adverso que pode variar de uma leve tontura com tremores e palpitações cardíacas, a efeitos mais severos como perda da consciência e até mesmo convulsões, coma e morte, principalmente em pacientes diabéticos (MCCRIMMON et al., 1994). A atividade hipoglicemiante da *U. tomentosa* observada em ratos não-diabéticos, enfatiza o elevado grau de atenção que deve ser considerado pelos diabéticos que fazem uso desta planta.

8 CONCLUSÕES

- O insumo farmacêutico da *U. tomentosa* empregado neste estudo possui: 75% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos, sendo: 20% de pteropodina, 18% de mitrafilina, 12% de isopteropodina, 11% de especiofilina, 10% de isomitrafilina e 4% de uncarina F; em relação ao alcaloides oxindólicos tetracíclicos, possui: 15% de rincofilina, 10% de isorincofilina e ainda há presença de corinoxeína e isocorinoxeína; porém, não foram possíveis de serem quantificadas;
- A administração crônica de *U. tomentosa* não promove alterações hematológicas, alterações hepáticas significativas, alterações renais ou de níveis proteicos, triglicérides ou colesterol séricos;
- A administração da *U. tomentosa* durante 90 dias promove diminuição nos níveis de glicose séricos, os quais podem ser prejudiciais para indivíduos com predisposição à hipoglicemia, como pacientes diabéticos em tratamento;
- A administração crônica de *U. tomentosa* não possui efeito imunotóxico sobre órgãos linfoides e suas celularidades;
- Em relação aos efeitos imunomodulatórios da administração crônica de *U. tomentosa* durante 90 dias, não foram observados efeitos modulatórios com significado clínico nas atividades macrofágicas e na reação de hipersensibilidade tardia; porém, promoveu uma maior produção de anticorpos T-dependentes frente a desafio imune específico.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B. Apoptosis and nuclear factor-kappa B: a tale of association and dissociation. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 8, p. 1033-1039, 2000.
- AHMAD, R.; HASHIM, H. M.; NOOR, Z. M.; ISMAIL, N. H.; SALIM, F.; LAJIS, N. H.; SHAARI, K. Antioxidant and antidiabetic potencial of Malaysin *Uncaria*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p. 587-595, 2011.
- AHMED, S. H.; KOOB, G. F. Transition to drug addiction: A negative reinforcement model based on an allostatic decrease in reward function. **Psychopharmacology**, v. 180, n. 3, p. 473-490, 2005.
- AKERELE, O. Medicinal plants and primary healthcare: agenda for action. **Fitoterapia**, v. 59, p. 353- 363, 1998.
- AKESSON, C.; LINDGREN, H.; PERO, R.W.; LEANDERSON, T.; IVARS, F. An extract of *Uncaria tomentosa* inhibiting cell division and NF-kB activity without inducing cell death. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 1889-1900, 2003.
- AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CONTI, C.; STAIN, M.L. Plant metabolites. structure and *in vitro* antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 4, p. 679-685, 1989.
- AQUINO, R.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CIRINO, G. Plant metabolites - New compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 2, p. 453-459, 1991.
- BALDWIN JÚNIOR, A. S. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n.1, p. 3-6, 2001.
- BANKER, D. E.; GROUDINE, M.; WILLMAN, C. L.; NORWOOD, T.; APPEL-BAUM, F. R. Cell cycle perturbations in acute myeloid leukaemia samples following *in vitro* exposures to therapeutic agents. **Leukaemia Research**, v. 22, n. 3, p. 221-239, 1998.
- BAUER, R.; TITTEL, G. Quality assessment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies. **Phytomedicine**, v. 2, n. 3, p. 193-198, 1996.
- BECKSTROM-STERMBERG, S.; DUKE, J.; WAIN, K. **Chemicals in *Uncaria tomentosa* DC (Pedaliaceae): the ethnobotany database**, Fulton: Agricultural Research Service, 1994.
- BERTOL, G.; FRANCO, L.; OLIVEIRA, B. H. de. HPLC Analysis of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa*: sample preparation and analysis optimisation by factorial design, **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 2, p. 143-151, 2012.

BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. C. D. S.; FERNANDES-JUNIOR, A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs use don *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n.4, p. 387-390, 2006.

BEZANGER-BEAUQUESNE, L.; PINKAS, M.; TORCK, F. **Les plantes dans la thérapeutique moderne**, Paris: Maloine, 1986. p. 5-7.

BOONE, L.; MEYER, D.; CUSICK, P.; ENNULAT, D.; PROVENCHER, B. A.; EVERDS, N.; MEADOR, V.; ELLIOTT, G.; HONOR, D.; BOUNOUS, D.; JORDAN, H. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 3, p. 182-188, 2005.

BRASIL. Portaria Interministerial n. 2960, de 9 de dezembro de 2008. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis./gm/2008/pri2960_09_12_2008.html>. Acesso em: 14 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS)**. Brasília. 2009. Disponível em: <<http://fcfrp.usp.br/dcf/download.php?file=arquivos/docentes/6/60.pdf&namfile=RENISUS%2520-%25202009.pdf>>. Acesso em 14 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME)**. Brasília. 2012. 129p. Disponível em: <<http://www.saude.goiania.go.gov.br/docs/secretaria/RENAME.pdf>>. Acesso em 14 jan. 2014.

BUDZINSKI, J. W.; FOSTER, B. C.; VANDENHOEK, S.; ARNASON, J. T. An *in vitro* evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. **Phytomedicine**, v. 7, n. 4, p. 273-282, 2000.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, v. 33, p. 179- 189, 2000.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, n. 71, p. 58-65, 2000.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmedd. 2004. 480 p.

CERRI, R. New quinóvic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 2, p. 257-261, 1988.

CHENG, A. C.; JIAN, C. B.; HUANG, Y. T.; LAI, C. S.; HSU, P.C.; PAN, M. H. Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome c release, and caspases activation in human leukemia cells. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 45, n. 11, p. 2206-2218, 2007.

CORDEIRO, C. H. G; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 272-278, 2005.

- CUNHA, A. P.; SILVA, R. A.; RODRIGUES, O. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**, Serviço de educação e bolsas. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. 738 p.
- DAVIES, D. T. Enzymology in preclinical safety evaluation. **Toxicologic Pathology**, v. 20, n. 3, p. 501-505, 1992.
- DE FEO, V. Medicinal and magical plants in the northern Peruvian Andes. **Fitoterapia**, v. 63, n. 5, p. 417-440, 1992.
- DE MELLO, J. F. Plants in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2, n. 1, p. 49-56, 1980.
- DESMARCHELIER, C.; MONGELLI, E.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Evaluation of the *in vitro* antioxidant activity in extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 3, p. 254-256, 1997.
- DING, G. S. Traditional Chinese medicine and modern pharmacology. **International Pharmacy Journal**, v. 1, p. 11-15, 1987.
- DOMINGUES, A.; SARTORI, A.; GOLIM, M. A.; VALENTE, L. M. M.; ROSA, L. C.; ISHIKAWA, L. L. W.; SIANI, A. C.; VIERO, R. M. Prevention of experimental diabetes by *Uncaria tomentosa* extract: Th2 polarization, regulatory T cell preservation or both? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 635-342, 2011.
- EBERLIN, S.; DOS SANTOS, L. M.; QUEIROZ, M. L. *Uncaria tomentosa* extract increases the number of myeloid progenitor cells in the bone marrow of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **International Immunopharmacology**, v. 5, n.7-8, p. 1235-1246, 2005.
- EBERS, G. Papyrus Ebers. **Das Hermetische Buch über die Arzneimittel der alten Ägypter in hieratischer Schrift**. Leipzig: Einleitung und Text, 1875.
- FALKIEWICZ, B.; LUKASIAK J. Vilcacora [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. and *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmel.] - A review of published scientific literature. **Case Reports and Clinical Practice Review**, v. 2, p. 305-316, 2001.
- FARINHA, A.; CEPÊDA A. M. Qualidade de medicamentos à base de plantas medicinais. **Boletim LEF**, v. 27, p. 1-9, 2000.
- FERREIRA, M. dos S. **Unha de gato - *Uncaria tomentosa* (Willd) DC**. 2009. 10 f. Monografia (Curso de Aperfeiçoamento em Fitoterapia) - Universidade Federal de São Paulo, 2009.
- FOSTER, B. C.; VANDENHOEK, S.; HANA, J.; KRANTIS, A.; AKHTAR, M. H.; BRYAN, M.; BUDZINSKI, J. W.; RAMPUTH, A.; ARNASON, J. T. *In vitro* inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. **Phytomedicine**, v. 10, n. 4, p. 334-342, 2003.
- GALLO, M. A. History and scope of toxicology. In: CURTIS, D. K. **Casarett and Doull's: toxicology the basic science of poisons**. New York: McGray Hill, 2008. p. 3-10.

GENTRY, A. **A field guide to the families and genera of woody plants of northwest Southamerica**. Washington: Conservation Internacional. 1993. 411 p.

GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M. T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 89-98, 2005.

GORE, E. R. Immune function tests for hazard identification: a paradigm shift in drug development. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 98, n. 4, p. 331-335, 2006.

HAAS, L. Pierre Joseph Pelletier (1788-1842) and Jean Bienaime Caventou (1795-1887). **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1333, 1994.

HAMBURGER, M.; MARSTON, A.; HOSTETTMAN, K. Search for new drugs of plant origin. **Advances in Drug Research**, v. 24, p. 167-169, 1991.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n. 1, p. 53-58, 1989.

HEITZMAN, M. E.; NETO, C. C.; WINIARZ, E.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 5-29, 2005.

HERON, I.; BERG, K. The actions of interferon are potentiated at elevated temperature. **Nature**, v. 274, p. 508-510, 1978.

HILEPO, J. N.; BELLUCCI, A. G.; MOSSEY, R. T. Acute renal failure caused by cat's claw herbal remedy in a patient with systemic lupus erythematosus. **Nephron Journals**, v. 77, n. 3, p. 361-369, 1997.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **A importância das plantas medicinais: princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: UFSCAR, 2003. 152 p. (Séries de textos da Escola de Verão em Química).

IDOVA, G.; CHEIDO, M.; DEVOINO, L. Modulation of the immune response by changing neuromediator systems activity under stress. **International Journal of Immunopharmacology**, v.19, n. 9-10, p. 535-540, 1997.

JONG, W.; MELNYK, M.; LOZANO, L. A.; ROSALES, M.; GARCIA, M. Uña de gato: fate and future of a Peruvian forest resource. Center for International Forestry Research (CIFOR). Disponível em: <<http://www.cifor.org/nc/online-library/browse/view-publication/publication/554.html>>. Acesso em 18 maio 2014.

KEMPER, K. J. **Cat's claw (*Uncaria tomentosa*)**. The Center for Holistic Pediatric Education and Research, 1999. 13 p. Disponível em: <<http://longwoodherbal.org/catsclaw/catsclaw.PH.PDF>>. Acesso em 26 maio 2014.

KEPLINGER, K.; WAGNER, H.; KREUTZKAMP, B. **Oxindole alkaloids having properties stimulating the immunologic system**. US Patents nº 4 844 901, July 4, 1989.

KEPLINGER, K. **Der Baum, der einem Mann ein Kind schenkte**. Germany: Herder Freiburg Br., 1993.

KEPLINGER, K.; KEPLINGER, D. **Oxindole alkaloids having properties stimulating the immunologic system and preparation containing the same**. US Patents 5302611 A, April 12, 1994.

KEPLINGER, K.; LAUS, G.; WURM, M.; DIERICH, M. P.; TEPPNER, H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. - Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 1, p. 23-24, 1999.

KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.O.; DOULL, J. **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. New York: McGraw Hill. 2001. 1280 p.

KRACKER, S.; RADBRUCH, A. Immunoglobulin class switching: *in vitro* induction and analysis. **Methods in Molecular Biology**, v. 271, 2004. p. 149-159.

KREUTZKAMP, B. **Niedermolekulare Inhaltsstoffe mit immunstimulierenden Eigenschaften aus *Uncaria tomentosa***, 1984. Tese (Doutorado) - University of Munich, 1984.

KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of allium test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Wild) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 211-221, 2006.

KYLE, R.; SHAMPE, M. Discoverers of quinine. **The Journal of the American Medical Association**, v. 229, n. 4, p. 462, 1974.

KYNOCH, S. R.; LLOYD, G. K. Acute oral toxicity to rats of 1-naphthol. **Huntingdon Research Center**, Report 14, 1975.

LADICS, G. S. Use of SRBC antibody responses for immunotoxicity testing. **Methods**, v. 41, n. 1, p. 9-19, 2007.

LAMM, S.; SHENG, Y.; PERO, R.W. Persistent response to pneumococcal vaccine in individuals supplemented with a novel water soluble extract of *Uncaria tomentosa*, C-Med-100. **Phytomedicine**, v. 8, n. 4, p. 267-274, 2001.

LANG, T. J. Estrogen as an immunomodulator. **Clinical Immunology**, v. 113, n. 3, p. 224-230, 2004.

LAUS, G.; KEPLINGER, K. Radix *Uncaria tomentosa* (Wild.) DC. **Zeitschrift für Phytotherapie**. v. 18, p. 122-6, 1997a.

LAUS, G.; BROSSNER, D.; KEPLINGER, K. Alkaloids of Peruvian *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 855-860, 1997b.

LAUS, G.; WURST, K. X-ray crystal structure analysis of oxindole alkaloids. **Helvetica Chimica Acta**, v. 86, n. 1, p. 181-187, 2003.

- LEMAIRE, I.; ASSINNEWE, V.; CANO, P.; AWANG, D. V. C.; ARNASON, J. T. Stimulation of interleukin-1 and 6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 2, p.109-115, 1999.
- LIMA JÚNIOR, J. F. **Perspectivas dos cirurgiões-dentistas sobre a inserção da fitoterapia na atenção básica de saúde**. 2005. 108 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2005.
- LORENZI, H.; ABREU MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2008. 544 p.
- MARQUES, O. C. P. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com actividade antioxidante**. 2008. 210 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2008.
- MATOS, F. J. A. Natural products reserach in Brazil: living pharmacies. **Ciência e Cultura**, v. 49, n. 5, p. 409-412, 1997.
- MIRANDA, E. M.; SOUSA, J. A.; PEREIRA, R. C. A. **Subsídios técnicos para o manejo sustentável da unha de gato (*Uncaria* spp.) no Vale do Rio Juruá**. Rio Branco: Embrapa. 2001. 21 p.
- MCCRIMMON, R. J.; FRIER, B. M. Hypoglycemia, the most feared complication of insulin therapy. **Diabetes and Metabolism**, v. 20, n. 6, p. 503-512, 1994.
- NOSSAL, G. J. Y.; SZENBERG, A.; ADA, G. L; AUSTIN, C. M. Single cell studies on 19S antibody production. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 119, n. 3, p. 485-502, 1964.
- MONTORO, P.; CARBONE, V.; QUIROZ, J. de. D.; SIMONE, F. de.; PIZZA, C. Identification and quantification of components in extracts of *Uncaria tomentosa* by HPLC-ES/MS. **Phytochemical Analysis**, v. 15, p. 55-64, 2004.
- MUHAMMAD, I.; DUNBAR, D. C.; KHAN, R. A.; GANZERA, M.; KHAN, I. A. Investigation of Uñya De Gato I. 7-Deoxyloganic acid and 15N NMR spectroscopic studies on pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 781-785, 2001.
- MUR, E.; HARTING, F. E. G.; SCHIMER, M. Randomized double blind trial of a extract from pentacyclic alkaloid-chemotype of *Uncaria tomentosa* for treatment of rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 29, n. 4, p. 678-81, 2002.
- NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. Herbal medicines: a guide for health-care professionals. **The Pharmaceutical Press**, v. 3, p. 6, 1996.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, O. M. C.; SCHENKEL, R. P.; GOSMANN, G.; MELLO, P. C. J.; MENTZ, A. L.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999. p. 13-26.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Research**, v. 20, p. 462-466, 1960.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEN, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum of immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315-327, 2007.

PETROVICK, P. R.; MARQUES, L. C.; DE PAULA, I. C. New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 51-55, 1999.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

PILARSKI, R.; ZIELINSKI, H.; CIESIOLKA, D.; GULEWICZ, K. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 18-23, 2006.

PISCOYA, J.; RODRIGUEZ, Z.; BUSTAMANTE, S. A.; OKUHAMA, N. N.; MILLER, M. J.; SANDOVAL, M. Efficacy and safety of freeze-dried cat's claw in osteoarthritis of the knee: mechanisms of action of the species *Uncaria guianensis*. **Inflammation Research**, v. 50, n. 9, p. 442-448. 2001.

POLLITO, P. A. Z. **Dendrologia, anatomia do lenho e "Status" de conservação das espécies lenhosas dos Gêneros Cinchona, Croton e Uncaria no Estado do Acre, Brasil**. 2004. 200 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2004.

RAMIREZ, E. **Curso introducción a la etnobotánica**. Lima: Universidad Cayetano Heredia Facultad de Ciencias y Filosofía, 1992. 10 p.

RAPOSO, A. **Metodologia científica: cultivo *in vitro* de Unha-de-gato**. Rio Branco: Embrapa, 2011. 5 p. (Embrapa. Circular Técnica, 57).

REA, R. L. **Cinchona y la tribu Cinchoneae (Rubiaceae) en Bolivia, actualización sistemática, fitoquímica y actividad antimalárica**. 1995. 183 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. 1995.

REIS, S. R. I. N.; VALENTE, L. M. M.; SAMPAIO, A. L.; SIANI, A. C.; GANDINI, M.; AZEREDO, E. L.; D'AVILA, L. A.; MAZZEI, J. L.; HENRIQUES, M. D.; KUBELKA, C. F. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 468-476, 2008.

REINHARD, K. N. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.: cat's claw, uña de gato, or savéntaro. **Journal of Alternative Medicine**, v. 5, n. 2, p. 143-51, 1999.

RIVA, L.; CORDINI, D.; DI FRONZO, G.; DE FEO, V.; DE TOMMASI, N.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C. The antiproliferative effects of *Uncaria tomentosa* extracts and fractions on the growth of breast cancer cell line. **Anticancer Research**, v. 21, p. 2457-2461, 2001.

RIZZI, R.; RE, F.; BIANCHI, A.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; BIANCHI, L.; STIVALA, L. A. Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 63-77, 1993.

ROBERTS, N. J. Jr. Impact of temperature elevation on immunologic defenses. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, n. 3, p. 462-472, 1991.

ROTBLAT, M.; ZIMENT, I. **Evidence-based herbal medicine**. Philadelphia: Hanley & Belfus, Medical Publishers, 2002.

RUIZ, D. F. Z.; OLANO, J. L. A. *Uncaria tomentosa* Willd. DC (Cat's claw) immunostimulatory activity in splenic B lymphocytes. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology, **Frontiers in Immunology**, 2013.

SAFAYHI, H.; SAILER, E. R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. **Planta Medica**, v. 63, n. 6, p. 487-493, 1997.

SALAZAR, E. L.; JAYME, V. Depletion of specific binding sites for estrogen receptor by *Uncaria tomentosa*. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 41, p. 123-124, 1998.

SANDOVAL-CHACON, M.; THOMPSON, J. H.; ZHANG, X. J.; LIU, X.; MANNICK, E. E.; SADOWICKA, H.; CHARBONNET, R. M.; CLARK, D.A.; MILLER, M. J. Antiinflammatory actions of cat's claw: the role of NF-kappaB. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 12, n. 12, p. 1279-1289, 1998.

SANDOVAL, M.; CHARBONNET, R. M.; OKUHAMA, N. N.; ROBERTS, J.; KRENOVA, Z.; TRENTACOSTI, A. M.; MILLER, M. J. S. Cat's Claw inhibits TNFalpha production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 1, n. 29, p. 71-78, 2000.

SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N. N.; ZHANG, X. J.; CONDEZO, L. A.; LAO J.; ANGELES, F. M.; MUSAH R. A.; BOBROWSKI; MILLER, M. J. S. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. **Phytomedicine**, v. 9, n. 4, p. 325-337, 2002.

SANTA MARIA, A.; LOPEZ, A.; DIAZ, M. M.; ALBAN, J.; GALAN DE MERA, A.; ORELLANA, J. A. V.; POZUELO, J. M. Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, n. 3, p. 183-187, 1997.

SENATORE, A.; CATALDO, A.; LACCARINO, F. P.; ELBERTI, M. G. Ricerche fitochimiche e biologiche sull *Uncaria tomentosa*. **Bollettino-Societa Italiana Biologia Sperimentale**, v. 656, p. 517-520, 1989.

- SHARMA, K. K.; MEDIRATTA, P. K.; REETA, K. H.; MAHAJAN, P. Effect of L-arginine on restraint stress in induced modulation of immune responses in rats and mice. **Pharmacological Research**, v. 49, p. 455-460, 2004.
- SHENG, Y.; PERO, R.W.; AMIRI, A.; BRYNGELSSON, C. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. **Anticancer Research**, v. 18, n. 5, p. 3363-3368, 1998.
- SHENG, Y.; BRYNGELSSON, C.; PERO, R. W. Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Jornal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 115-126, 2000a.
- SHENG, Y.; PERO, R. W.; WAGNER, H. Treatment of chemotherapy-induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Phytomedicine**, v. 7, n. 2, p. 137-143, 2000b.
- SHENG, Y.; LI, L.; HOLMGREN, K.; PERO, R. W. DNA repair enhancement of aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* in human volunteer study. **Phytomedicine**, v. 8, n. 4, p. 275-282, 2001.
- SHI, J. S.; YU, J. X.; CHEN, X. P.; XU, R. X. Pharmacological actions of Uncaria alkaloids, rhynchophylline and isorhynchophylline. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, n. 2, p. 97-101, 2003.
- SIMÕES, C. M. O. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. 172 p.
- SIMÕES, O. M. C.; SCHENKEL, R. P.; GOSMANN, G.; MELLO, P. C. J.; MENTZ, A. L.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999. 821 p.
- SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri: Manole, 2008. 942 p.
- STEVENS, K. R.; GALLO, M. A. Practical considerations in the conduct of chronic toxicity studies. **Principles and methods of toxicology**, New York: Raven Press. 1989. 929 p.
- STEYERMARK, J. A. Rubiaceae. In: LASER, T. **Flora da Venezuela**. Caracas: Instituto Botánico, 1974. 2070 p.
- STUPPNER, H.; STURM, S.; KONWALINKA, G. HPLC analysis of the main oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Chromatographia**, v. 34, p. 597-600, 1992.
- TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 1, p. 7-11, 2001.
- UNICAMP. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas. 2007. Disponível em: <<http://www.cpqba.unicamp.br>>. Acesso em 11 jan. 2014.

VALE, N. B. V. A farmacobotânica ainda tem lugar na moderna anestesiologia? **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 3, p. 368-380, 2002.

VALERIO JÚNIOR, L. G.; GONZALES, G. F. Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*): a critical synopsis. **Toxicological Reviews**, v. 24, n. 1, p. 11-13, 2005.

WAGNER, H.; KREUTZKAMP, B.; JURCIC, K. Die Alkaloide von *Uncaria tomentosa* ihre phagozytose-steigernde wirkung. **Planta Medica**, v. 51, n. 5, p. 419-423, 1985.

WALKER, S. E. Estrogen and autoimmune disease. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 40, n. 1, p. 60-65, 2011.

WHO. World Health Organization. **Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review**. 1998. 45 p.

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Una de Gato and Sangre de Grado. **Alternative Medicine Review**, v. 6, n. 6, p. 567-579, 2001.

WINKLER, C.; WIRLEITNER, B.; SCHROECKSNADEL, K.; SCHENNACH, H.; MUR, E.; FUCHS, D. *In vitro* effects of two extracts and two pure alkaloid preparations of *Uncaria tomentosa* on peripheral blood mononuclear cells. **Planta Medica**, v. 70, n. 3, p. 205-210, 2004.

WILSON, S. D.; MUNSON, A. E.; MEADE, B. J. Assessment of the functional integrity of the humoral immune response: The plaque-forming cell assay and the enzyme-linked immunosorbent assay. **Methods: A Companion to Methods in Enzymology**, v. 19, p. 3-7, 1999.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAYRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Laboratory Investigation**, v. 80, p. 617-653, 2000.

WURM, M. **Untersuchungen der immunologischen Wirkungsmechanismen der pentazyklischen Oxindolalkaloide aus *Uncaria tomentosa***. 1997. Tese (Doutorado) - University of Innsbruck, Austria, 1997.

WURM, M.; KACANI, L.; LAUS, G.; KEPLINGER, K.; DIERICH, M. P. Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte-proliferation-regulating factor. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 701-704, 1998.

ZAVALA, A.; ZEVALLOS, P. P. **Taxonomía, distribución geográfica y status del Género *Uncaria* en el Perú**. Facultad de Ciencias Forestales, Universidade Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú, 1996.103p.

ZEVALLOS, P. P.; LOMBARDI, I.; BERNAL, Y. Agrotecnología para el cultivo de la uña de gato o bejuco de agua. In: MARTÍNEZ J. V.; BERNAL, H. J.; CÁCERES, A. **Fundamentos de agrotecnología para el cultivo de plantas medicinales Iberoamericanas**.

Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 2000. p. 463-492.

HIGH DOSES OF *UNCARIA TOMENTOSA* (CAT'S CLAW) REDUCE BLOOD GLUCOSE LEVELS IN RATS

PATRÍCIA FRANCISCONE MENDES¹, FERNANDO PONCE¹, DYANNE DUTRA FRAGA¹, FERNANDO PÍPOLE¹,
FABIO FERREIRA PERAZZO² AND ISIS MACHADO HUEZA^{1, 2*}

¹School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Pathology, University of São Paulo, São Paulo, SP, 05508-270, Brazil,

²Federal University of São Paulo, Diadema, SP, 09972-270, Brazil. Email: imhueza@unifesp.br

Received: 28 Jan 2014, Revised and Accepted: 08 Mar 2014

ABSTRACT

Objective: *Uncaria tomentosa* (UT) is a medicinal plant employed worldwide for its anti-inflammatory and immunomodulatory activities. Thus, the purpose of the present studies was to verify if UT could promote toxic and/or immunotoxic effects in rats following exposure for 90 days.

Methods: Forty male rats were orally treated with 15, 75 or 150mg/kg of UT. At the end, the rats were sacrificed for evaluations of the biochemistry, haematology, histopathology, status of the lymphoid and non-lymphoid organs.

Results: The results revealed an increase in the levels of ALT in the animals treated with 75mg/kg and a reduction in the glycaemic levels of rats treated with 75 and 150mg/kg of UT. However, only rats treated with the higher dose showed a slight centrilobular hepatic vacuolation; thus, ALT data alone are not suggestive of a hepatic adverse effect of UT following long-term treatment. UT promoted a reduction in blood glucose levels of the rats.

Conclusion: This effect could present an important risk for diabetic humans, who are susceptible to the development of hypoglycaemia and who might use UT for purposes other than anti-diabetes. In closing, these studies demonstrated that, while UT has no immunotoxic effect, long-term UT treatment at high doses can promote hepatotoxicity and hypoglycaemia.

Keywords: Cat's claw, Phytotherapeutic, Long-term study, Immunotoxicology.

INTRODUCTION

Plants used for medicinal purposes merge over time with human development; it is well known that early civilisation employed medicinal plants, as seen in the Ebers Papyrus, which dates earlier than 2,000 B.C [1]. Currently, the world population is not only continuing to employ medicinal plants but it has begun to make extensive use of phytotherapies. This trend is at least partially due to the belief that natural products are innocuous.

Among these phytotherapeutic plants, there is a vine found in the tropical forests of the Amazonian region and belonging to the Rubiaceae family; this plant is named *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC (Rubiaceae) and is known as "Cat's claw" [2]. *Uncaria tomentosa* (UT) is usually commercialised as a phytotherapeutic and is employed worldwide for the treatment of many different diseases and conditions, such as arthritis, rheumatism [3], gastrointestinal injuries [4], wounds, abscesses, asthma, fever and even contraception [2]. In fact, in 1994, a conference of the World Health Organization (WHO) recognised and classified UT as a true "medicinal plant" due to its broad use in folk medicine [5, 6].

Phytochemical studies using UT revealed that this plant possesses approximately 50 potentially bioactive chemical constituents [7]; they are classified as triterpenoids, steroids, esters, glycosides of quinovic acid, procyanidins and indolic and oxindole alkaloids [8, 9]. These compounds are able to act individually or synergistically, triggering the effects of UT [10].

Among these constituents, many reports have revealed that oxindole pentacyclic alkaloids show immunomodulatory properties [2, 11]. Others have reported a UT induced increase of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [12], lymphocyte proliferation [2, 11, 13] and, of special interest, anti-inflammatory effects [14-16].

Despite the numerous studies that have revealed these therapeutics properties, no UT research is currently focused on the possible toxicity of this plant and its phytotherapies. In addition, it is important to highlight that immunomodulatory effects do not always reflect a positive attribute. Thus, the aim of the present study was to verify the toxicity of UT and to employ immunotoxicological

protocols to verify the scope of the safety of UT. The utilised protocols will include those suggested by many regulatory agencies, such as the Food and Drug Administration (FDA), the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) and the United States Environmental Protection Agency (US-EPA).

MATERIALS AND METHODS

The phytotherapeutic and its chemical compounds (dosage preparations)

A dried bark extract of UT was purchased (Lot# UNX01/0311, certified to contain 0.65% of total alkaloids) as this is usually employed as the raw material for the production of the phytotherapeutic obtained from the bark of the stems of the plant; quality control certification of this material was also provided by the manufacturer: "Santosflora: Herbs, Spices and Dry Extracts, Ltd." (Tatuape, Sao Paulo, Brazil).

The dried bark powder was weighed (200mg) and extracted with 60% ethanol (10mL) in an ultrasonic bath (20min, 30°C). An aliquot of 2mL was cleaned up by solid-phase extraction (SPE) on polyamide before analysis. The cartridge was conditioned with 2mL of methanol and then 5mL of water. After sample introduction, the alkaloids were eluted with 2mL of 60% ethanol and transferred to a 5mL volumetric flask.

The analytical method was previously described by Bertol et al.[17]. The nano LC system used consisted of a Shimadzu Proeminence Nano HPLC System (Shimadzu, Japan) with an autoinjector for solvent delivery and sample introduction. All analyses were made with a Zorbax XDB C18 column (150mm×4.6mm, 3.5µm). The mobile phase was 35mM triethylammonium acetate buffer (0.2%v/v), pH 6.9 (A) and acetonitrile (B). Gradient composition (A:B): 0-18min (65:35); 18-32min (50:50). Flow rate was 0.8mL/min and detection was at 245nm. Myrephylline was used as standard of pure alkaloid. Peaks were assigned on the basis of their retention times compared to standard (myrephylline). In the absence of reference compounds, the results for the tetracyclic compounds allowed a percentage calculated in terms of the total amount of the oxindole alkaloids. For quantification of all alkaloids, a five point calibration curve of mitraphylline was used (8-200µg/mL).

The major alkaloids of UT are represented by six stereoisomers of pentacyclic alkaloids, namely, pteropodine, isopteropodine, speciophylline, uncarine F, myrtraphylline and isomyrtraphylline. The two major tetracyclic alkaloids identified as ryncophylline and isoryncophylline and two minor tetracyclic alkaloids, corynoxine and isocorynoxine are also described.

The results indicate that pteropodine (20%), isopteropodine (12%) and isomyrtraphylline (10%) were the most abundant alkaloids in the bark extract. Speciophylline (11%), uncarine F (4%) and myrtraphylline (18%) correspond to 33% of pentacyclics alkaloid content, totaling 75%. The content of tetracyclics alkaloids was 25%, determined as ryncophylline (15%), isoryncophylline (10%). Corynoxine and isocorynoxine were detected but it was not possible to quantify them, as they are considered trace alkaloids (Figure 1). These results are in accordance to the literature [18].

Fig. 1: HPLC chromatogram of alkaloid-rich fraction from the barks of *Uncaria tomentosa* L. (Rubiaceae) whereby eight alkaloids were identified, including: (A) speciophylline; (B) uncarine F; (C) myrtraphylline; (D) rhynchophylline; (E) isomyrtraphylline; (F) pteropodine; (G) isorhynchophylline; (H) isopteropodine.

Animals

Male adult Wistar Hannover rats (60 days of age) were obtained from our colony in the Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo. The animals were used in accordance with the ethical principles and procedures adopted by the Bioethics Committee of the University of São Paulo (protocol 2500/2011, approved on 15/02/2012). All rats were housed separately in cages measuring 40x50x20cm, and the cage bottoms were lined with sterilised wood shavings. Cages were checked daily over the entire experimental period for soft faeces, food waste and mortality. The animals received food and water *ad libitum* and were maintained under controlled condition of temperature (22-25°C), relative humidity (50-65%) and lighting (12/12h light/dark cycle).

Reagents

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 10% 3 mM and phormol 10% were supplied by Merck (Sao Paulo, SP, Brazil). Archote (Curitiba, PR, Brazil) provided the ethanol. The RPMI culture medium-1640 and the trypan blue were obtained from Gibco (Sao Paulo, SP Brazil).

Laborlab (Sao Paulo, SP, Brazil) supplied assay kits for albumin, total protein, alkaline phosphatase (ALP), alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), γ -glutamyl transpeptidase (GGT), glucose, cholesterol, triglycerides and high-density lipoproteins (HDL), urea and creatinine. Keyhole limpet hemocyanin (KLH) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) was obtained from Molecular Probes. Lipopolysaccharide (LPS 0127:B8), peroxidase, phorbol myristate acetate (PMA), and propidium iodide (PI) were purchased from Sigma Chemical Co (San Diego, California, USA). RPMI culture medium-1640 and trypan blue were obtained from Gibco (São Paulo, SP, Brazil).

Toxicological and immunotoxicological evaluations

Dried extract of UT was weighed, suspended and mixed in distilled water to achieve final concentrations of 15, 75 and 150mg of dry extract of UT/mL for use.

Forty rats were randomly divided into one control group and three experimental groups. Rats from the experimental groups were treated once daily with 15 (usual therapeutic dose), 75 and 150mg/kg of body weight by gavage for 90 consecutive days. On day 91, all rats were deeply anaesthetised with xylazine and ketamine (5 and 50mg/kg of body weight, respectively) for blood collection from the caudal cava vein. After euthanasia by cervical dislocation, lymphoid organs (thymus and spleen) and bone marrow from the left femur were removed for lymphohematopoietic organ and cellularity analysis.

Blood collection was performed with and without EDTA for the evaluation of haematological and serum biochemical analyses, respectively. The haematological parameters were assessed using automatic Horiba® ABX equipment; differential white blood cell analyses were performed manually.

Serum biochemistry was analysed using a Celm-SBA200-biochemistry analyser with the corresponding reagents. The measured markers were albumin, total protein, ALP, ALT, AST, GGT, glucose, cholesterol, triglycerides, HDL, urea and creatinine. Tissue samples of liver, Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, adrenal glands and kidney were collected from 5 animals/group and fixed in 10% formalin, routinely embedded in paraffin, cut into 5- μ m thick sections and stained with haematoxylin and eosin for histopathology.

In addition, brain, heart, liver, lungs and kidney were collected from 5 animals/group, weighed in an analytical balance and then placed in an oven at 60°C for 24 hours to determine their relative dry weight. After the relative organ weight analysis of thymus and spleen, the thymus was fixed in phormol for histopathology and morphometric evaluation.

A fragment of a known weight of splenic tissue were prepared, washed in cold RPMI-1640 culture medium and resuspended in 5 mL of the culture medium for a splenocyte count; the remaining fragment was fixed for histopathology. Bone marrow cell suspensions were produced by flushing the marrow cavity of the left femur of each rat with ice-cold RPMI-1640 medium using a sterile syringe with a 26-gauge needle. Viability of white blood cells from the spleen and bone marrow was assessed by a trypan blue dye exclusion test, and cell numbers were determined with a Countess Automated Cell Counter equipment (Invitrogen, SP, Brazil). The histological sections of the rat's thymuses underwent morphometric analysis in an Image-J system, Version 1.43 m (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, USA.). The ratio of cortical to medullar areas (C/M) was determined with the formula $C/M = \text{Total cortex area} / [(\text{Total area}) - (\text{Total medulla area})]$.

Delayed-Type Hypersensitivity assay and serum immunoglobulin evaluation

Forty rats were randomly distributed into 4 groups, one control and three experimental groups. All animals were sensitized with KLH as described by Exon et al. [19]. Briefly, KLH (5mg/mL) was injected into the caudal tail fold in a 200 μ L volume of sterile water on experimental days 75 and 82. At the end of the experimental period (Day 89), all of the rats were challenged with heat-aggregated KLH (80°C for 1 hr) in 0.1mL of saline (20mg/mL).

The challenge antigen was injected into one footpad, while the other footpad received sterile saline. Swelling was measured with a micrometer and calculated by subtracting the thickness of the saline-injected left footpad from that of the KLH-injected right footpad. Swelling was then plotted as the difference between the measurements. Before euthanasia, rats were anesthetized for blood collection from the abdominal cava vein in order to determine serum immunoglobulin (IgG) levels. Serum IgG was analysed using a Celm-analyser® with corresponding reagents (Laborlab).

Evaluation of innate immunity

Another 40 rats were also distributed into 4 groups, one control and 3 experimental groups treated with UT. On experimental day 85, all rats received an intraperitoneal injection of 5mL of sterilized solution of thioglycolate 3% to induce macrophage elicitation in this

cavity. On the last experimental day, rats were killed to perform the macrophage analyses. For that, 10mL of ice cold PBS was slowly injected into the peritoneal cavity using a 26G1/2 needle. After washing the cavity with PBS, the macrophages were collected, and 100µL of the solution obtained was used to analyze the phagocytic activity and the oxidative macrophage burst response. The method of analysis was adopted from that outlined by Hasui et al. [20]. To analyze the oxidative burst response, cells obtained from each rat (2×10^5 cells/tube) were incubated for 30 minutes at 37°C with either dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), DCFH-DA + phorbol myristate acetate (PMA) or DCFH-DA + *Staphylococcus aureus* conjugated to propidium iodide (SAPI). To analyze the phagocytic activity, the cells were incubated for 30 minutes at 37°C with either SAPI or DCFH-DA and SAPI.

Ten thousand neutrophils were then acquired using flow cytometry (FACS Calibur FACSCalibur flow cytometer equipped with Cell Quest Pro® software (Becton Dickinson [BD] Immunocytometry System), and the data were analyzed using FlowJo 7.2.2® software (Tree Star Inc, Ashland, KY).

Statistical analysis

The data were analysed using GraphPad Prism 5.03® software (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA) by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test for multiple comparisons. Kruskal-Wallis analysis of variance followed by the Dunn test for multiple comparisons was employed for the nonparametric data. Data are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM), and differences between the control and the experimental groups were considered to be statistically significant when *P < 0.05 and **P < 0.01.

RESULTS

Toxicity signs, food consumption, body weight gain

During the experimental period, none of the rats showed signs of toxicity, such as soft faeces, depression, piloerection, neurological signs or mortality. Table 1 shows the total food consumption and the total body weight gain of rats treated with or without UT; no significant differences were observed in the signs of toxicity among the groups of rats analysed.

Table 1: Total food consumption and body weight gain of rats treated with 0, 15, 75 and 150mg/kg of dry extract of *Uncaria tomentosa*, during 90 days, by gavage

	Groups			
	Control (n=10)	15mg/kg (n=10)	75mg/kg (n=10)	150mg/kg (n=10)
Food Consumption (g)	2368.9 $\pm$ 80.2	2536.6 $\pm$ 83.8	2491.5 $\pm$ 65.3	2483.2 $\pm$ 67.5
Body weight (g)	80.2 $\pm$ 7.4	101.6 $\pm$ 4.7	93 $\pm$ 8.5	86.6 $\pm$ 13.7

Table 2: Haematological parameters and differential white cell counts of rats treated with 0, 15, 75 and 150mg/kg of dry extract of *Uncaria tomentosa*, during 90 days, by gavage

	Groups			
	Control (n=10)	15mg/kg (n=10)	75mg/kg (n=10)	150mg/kg (n=10)
Erythrocytes ($10^6/\text{mm}^3$)	8.2 $\pm$ 0.1	8.0 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 0.1	8.1 $\pm$ 0.2
Leukocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	5.8 $\pm$ 0.5	5.9 $\pm$ 0.5	6.6 $\pm$ 0.3	6.7 $\pm$ 0.5
Neutrophils (%)	22.4 $\pm$ 1.1	23.7 $\pm$ 2.1	23.2 $\pm$ 2.3	22.4 $\pm$ 1.9
Lymphocytes (%)	72.7 $\pm$ 1.0	74.5 $\pm$ 2.2	74.3 $\pm$ 2.3	75.1 $\pm$ 2.1
Monocytes (%)	4.0 $\pm$ 0.6	2.2 $\pm$ 0.7	2.6 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.5
Eosinophils (%)	0.7 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.2
Basophils (%)	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0

Table 3: Serum biochemistry analysis of rats treated with 0, 15, 75 and 150mg/kg of dry extract of *Uncaria tomentosa*, during 90 days, by gavage

Groups	*AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	GGT (mg/dL)	Pt (g/dL)	Alb (g/dL)	Glu (mg/dL)	Chol (mg/dL)	Trig (mg/dL)	HDL (mg/dL)
Control (n=8)	64.9 $\pm$ 5.4	29.2 $\pm$ 2.7	81.9 $\pm$ 5.1	1.3 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.0	125.1 $\pm$ 11.7	93.5 $\pm$ 5.2(8)	44.8 $\pm$ 9.3	77.3 $\pm$ 11.6
15mg/kg (n=10)	71.6 $\pm$ 3.9	33.0 $\pm$ 2.3	95.1 $\pm$ 5.8	1.1 $\pm$ 0.2	6.6 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.0	141.9 $\pm$ 5.1	99.7 $\pm$ 3.6	37.1 $\pm$ 6.1	84.1 $\pm$ 10.0
75mg/kg (n=10)	70.1 $\pm$ 3.3	47.2 $\pm$ 4.0**	93.8 $\pm$ 6.6	1.4 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.0	100.3 $\pm$ 6.1*	91.5 $\pm$ 2.1	49.5 $\pm$ 5.6	78.5 $\pm$ 12.3
150mg/kg (n=10)	72.7 $\pm$ 4.6	39.4 $\pm$ 2.0	98.8 $\pm$ 4.9	1.1 $\pm$ 0.1	6.3 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.0	94.6 $\pm$ 4.0*	92.7 $\pm$ 4.0	38.6 $\pm$ 6.1	82.3 $\pm$ 13.8

*AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase; ALP = alkaline phosphatase; GGT = gamma-glutamyl transpeptidase; Pt = total proteins; Alb = albumin; Glu = glucose; Chol = cholesterol; Trig = triglycerides; HDL = high density lipoproteins. Urea and creatinine levels were not shown. *P < 0.05; **P < 0.01 versus control group. Dunnett's test.

Haematological and biochemical parameters

The statistical test employed to evaluate differences in the complete blood counts did not reveal any significant differences among the groups for all the parameters evaluated (Table 2).

Conversely, in relation to the serum biochemistry, the statistical analysis revealed an increase in the ALT levels of rats treated with 75mg/kg of the UT extract compared to untreated animals (P < 0.01). In addition, rats treated with 75 and 150mg/kg of the dry extract of UT showed diminished glycaemia levels when compared to the untreated rats (P < 0.05). No other biochemical parameters,

including renal function, showed statistically significant differences among the groups of rats (Table 3).

Lymphoid organ evaluation and relative dry weight of non-lymphoid organs

In relation to lymphoid organ evaluation (relative weight of spleen and thymus; thymus morphometry and bone marrow and spleen cellularity), no significant differences were found among all the parameters evaluated. (Table 4). When the dry relative weight of non-lymphoid organs was examined, no significant differences were observed between the treated and untreated rats (data not shown).

Table 4: Relative weight of the spleen and thymus; the thymus morphometry (cortex/medulla ratio) and the bone marrow and spleen cellularity

	Groups			
	Control (n=10)	15mg/kg (n=10)	75mg/kg (n=10)	150mg/kg (n=10)
Thymus ($\times 10^{-3}$ g/100g of BW ^a)	54.6 $\pm$ 2.9	59.3 $\pm$ 2.7	56.3 $\pm$ 1.6	59.6 $\pm$ 3.4
Spleen ($\times 10^{-3}$ g/100g of BW)	216.0 $\pm$ 13.7	221.8 $\pm$ 10.6	235.7 $\pm$ 7.0	234.7 $\pm$ 10.3
Spleen cellularity ($\times 10^7$ /g of spleen)	8.3 $\pm$ 0.3	7.9 $\pm$ 0.5	7.6 $\pm$ 0.4	6.6 $\pm$ 0.8
Bone marrow cellularity ($\times 10^6$ /cells)	0.4 $\pm$ 0.03	0.3 $\pm$ 0.05	0.4 $\pm$ 0.03	0.4 $\pm$ 0.01
C/M ratio ^b	0.4 $\pm$ 0.08	0.28 $\pm$ 0.10	0.37 $\pm$ 0.07	0.45 $\pm$ 0.10

^aBW= body weight. ^bC/M ratio = cortex/medulla ratio.

Histopathology

Histopathological evaluation of tissue samples revealed only the occurrence of mild vacuolation of hepatocytes; this effect was mainly observed in the centrilobular region from animals treated with 150mg/kg (Figure 2).

Fig. 2: Liver tissues of rats treated or not treated with *Uncaria tomentosa* dried extract over 90 days by gavage. (a) Liver section of untreated rat. (b) Note the presence of vacuolation of hepatocytes in the centrilobular zone from the rat treated with 150mg/kg. Hematoxylin and eosin stain, 20X microscope objective lens

Delayed-type hypersensitivity assay and serum immune globulin levels

Even though there was an observable reduction in tumour development in animals treated with different doses of UT as shown by the DTH assay, the treatments were not statistically different (Figure 3, $P > 0.05$). In addition, there were no statistical differences in the levels of various immunoglobulins (*i.e.* IgG) between the groups of rats (data not show).

Evaluation of innate immunity

Only animals treated with 75mg/kg of UT exhibited an increase in the effectiveness of peritoneal macrophage phagocytosis when compared with the control group (Figure 4).

Fig. 3: Delayed-type hypersensitivity (DTH) of rats treated with 0, 15, 75 e 150mg/kg of dry extract of *Uncaria tomentosa*, during 90 days, by gavage

Effectiveness of phagocytosis

Fig. 4: Evaluation of innate immunity of rats treated with 0, 15, 75 and 150mg/kg of dry extract of *Uncaria tomentosa*, during 90 days, by gavage (mean $\pm$ SEM). * $P < 0.05$. Dunnett's test

DISCUSSION

UT is a phytotherapeutic widely employed in the treatment of many diseases, such as inflammatory and rheumatic processes, cancer and other health disturbances [21–23]. The therapeutic properties described in the manufacturer's package and advertising material focus on anecdotal reports about the safety of medicinal plants because the material is derived from a natural plant source. This in turn has led people to believe that UT has no harmful activity even when administered at high doses for prolonged periods. Thus, in the present study, we aimed to establish an exposure scenario similar to that used in folk medicine. Initially, to better mimic the effects of UT, it was necessary to assess whether the content of total alkaloids is consistent with that found in the literature [17, 18]. After chemical studies and the determination of the alkaloid content, we administered the usual therapeutic dose and a dose ten times higher for three months to verify the safety of UT and to identify its possible immunotoxic effects on rats.

The lower dose used in our study was based on the recommendation given by "Santosflora: Herbs, Spices and Dry Extracts, Ltd", and this dose was determined to be 6 capsules of 150mg/day of dried extract of UT. Considering an adult man with a 60kg body weight (the standard weight accepted by Brazilian ANVISA - National Agency of Health Surveillance), the recommended amount to be ingested is 900mg/day; thus, the lower dose employed here was 15mg/kg daily.

When *in vivo* studies examine the toxic effect of xenobiotics on the immune system, it is important to verify whether the doses used do not cause exacerbated toxicity and/or clinical symptoms in the hosts. It is well known that health disturbances such as fever [24, 25] or stress [26] can be deleterious to the immune system. One of the most significant signs of toxicity observed in animal models is anorexia and reduced body weight [27]. In the present study, no reduction of food consumption or body weight gain were observed among the groups of rats treated with the UT extract; this indicates that the doses employed here were acceptable for immunotoxic evaluation.

To standardise toxicological protocols worldwide, several regulatory agencies, including the FDA, OECD and US-EPA, proposed *in vivo* and *in vitro* models for the evaluation of the safety of pharmaceutical and other chemical compounds in humans. These studies are similar to

those employed here and were performed over a period of 90 consecutive days. Usually, these agencies preferentially use rats of both genders. However, we chose to avoid the possible influences of female hormones such as oestrogen, which is a known immunomodulator [28, 29]. Thus, we used only male rats for our studies of the possible toxic and immunotoxic effects of the UT extract.

Alteration in blood cell counts (red and white cells) is one of the first indications of a possible immunotoxic effect of a compound. The haemogram evaluated here did not reveal any deleterious effect caused by UT in these parameters. Moreover, the assessment of the bone marrow of animals treated with the phytotherapeutic did not reveal any alterations in its cellularity or in the cellularity of the spleen. In fact, despite previous reports of an *in vitro* lymphoproliferative effect [2, 11, 13] and an increased percentage of human lymphocytes [2], no alterations in immune function were observed. Nevertheless, it is important to emphasise that, at this point, no immunological challenge was performed on the rats that could have revealed any abnormal lymphoproliferative activity.

During an immune response, B lymphocytes can switch the expression of immunoglobulin class (isotype) from IgM to IgG. This Ig class switch is based on a deoxyribonucleic acid (DNA) recombination event that results in an exchange of the gene segments coding for the constant region of the Ig heavy chain, although the Ig heavy chain variable region is retained. This process changes the effectiveness of the corresponding antibody, resulting in enhanced antigen specificity [30].

Generally, the switch takes place after a committed B lymphocyte has been stimulated by a mitogen or antigen, as with the KLH sensitization here employed [31, 32]. The DTH assay did not show statistical differences due to UT treatment, and there were no changes in serum IgG levels observed between the groups of rats, indicating that UT did not promote any immunomodulator effects on either cell- or humoral immune responses.

In spite of the anti-inflammatory effects attributed to UT in the literature [14-16], the results presented here are not conclusive, since only rats treated with 75mg/kg of UT showed immunomodulatory effects on macrophage activity. In addition, the isolated increase in phagocytosis is not sufficient to reveal possible UT anti-inflammatory properties.

When the biochemical parameters were evaluated, an enhanced level of ALT from rats exposed to 75mg/kg of UT extract was observed. Furthermore, no differences were observed in AST, ALP, GGT levels and liver dry weight. It is important to highlight that, besides the occurrence of ALT in tissues, such as the muscle, heart, and kidneys [26], no adverse effects on the relative weight or histology of these organs from treated animals was found. Even though serum ALT value has long been used as surrogate marker of liver injury [33], and considered a more specific and sensitive indicator of hepatocellular injury than AST in rats, dogs and non-human primates [34], liver histopathology only revealed a slight presence of centrilobular vacuolation in rats exposed to the higher dose of UT. In addition, no occurrence of necrotic lesions was observed in any treated animals. Thus, it appears that the increased serum ALT activity found in this study does not have biological significance.

In addition to the biochemistry results, it was found that rats treated with 75 and 150mg/kg of dry extract of UT showed a reduction in blood glucose. The folk use of the *Uncaria* species worldwide is mainly for the treatment of inflammatory disorders; scientific reports about its hypoglycaemic effect are rare. Recently, an *in vitro* study performed with Malaysian *Uncaria* species extracts showed an alpha-glucosidase inhibitory activity similar to the potent glucosidase antagonist, 1-deoxynojirimycin [35]. Moreover, in their study, [36] used an aqueous-ethanol extract of UT in a streptozocin-induced diabetes model to reveal a reduction in the glycaemic levels and incidence of diabetes in the treated mice. This effect is related to ursolic acid, a pentacyclic triterpene acid found in *Uncaria hirsute*, which has many biological activities, including an anti-diabetic activity [37]. The UT species also contains ursolic acid as a chemical

constituent with biological activity [7, 10], suggesting a mechanism by which this plant could possess an anti-diabetic activity.

CONCLUSION

It is important to raise the question: how can a decrease in blood glucose levels be beneficial to a non-diabetic individual or especially to a diabetic patient who employs insulin and UT to treat an unrelated disease(s)? It is well known that hypoglycaemia can present as an adverse effect, which can range from mild dizziness with trembling and heart palpitations to more serious effects, such as unconsciousness and even seizures, coma and death. The latter effects pertain mainly to diabetic patients [38]. Thus, attention must be paid to this potentially serious adverse effect. The hypoglycaemic activity of UT in non-diabetic rats emphasises the high degree of attention that must be used by diabetics that also ingest UT.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Stella Bastos, Alessandra Teles and to Prof. Dr. Paulo César Maiorka for all their assistance. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brazil (Grant number 2012/09565-8, FAPESP).

REFERENCES

1. Ebers G, Stern LC. *Papyrus Ebers, das hermetische Buch über die Arzneimittel der alten Ägypter in hieratischer Schrift*, Osnabrück: Biblio Verlag, 1987.
2. Keplinger K, Laus G, Wurm M, Dierich MP, Teppner H. *Uncaria tomentosa* (Willd) DC: thnomedical use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J Ethnopharmacol* 1999; 64: 23-34.
3. Mur E, Hartig F, Eibl G, Schirmer M. Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloid-chemotype of *Uncaria tomentosa* for the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2002; 29: 4-48.
4. Rotblatt M, Ziment I. Evidence-Based Herbal Medicine, Hanley and Belfus Inc., Med Publishers: Philadelphia. 4, 2002.
5. WHO. *Monographs on selected medicinal plants*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2007.
6. Lorenzi H, Abreu MFJ. *Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas*, Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2008.
7. Heitzman ME, Neto CC, Abraham J, Gerald B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *Phytochem* 2005; 66: 5-29.
8. Cerri R, Aquino R, Simone FD, Pizze C. New quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. *J Nat Prod* 1988; 51: 257-261.
9. Reinhard KN. *Uncaria tomentosa* (Willd) DC: cat's claw, uña de gato or savéntaro. *J Altern Med* 1995; 5: 143-151.
10. Aquino R, Feo VD, Simone FD, Pizze C, Cirino G. Plant metabolites. New compounds anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. *J Nat Prod* 1991; 54: 453-459.
11. Wurm M, Kacani L, Laus G, Keplinger K, Dierich MP. Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte-proliferation-regulating factor. *Planta Med* 1998; 64: 701-704.
12. Eberlin S, dos Santos LM, Queiroz ML. *Uncaria tomentosa* extract increases the number of myeloid progenitor cells in the bone marrow of mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int Immunopharmacol* 1998; 5: 1235-1246.
13. Sheng Y, Bryngelsson C, Pero, RW. Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *J Ethnopharmacol*. 2000; 69: 115-126.
14. Sandoval M, Thompson JH, Zhang XJ. Anti-inflammatory actions of cat's claw: the role of NF-kappa B. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 12: 1279-1289.
15. Sandoval M, Okuhama NN, Zhang XJ, Condezo LA, Lao, J, Angeles FM, Musah RA, Bobrowski P, Miller, MJ. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine* 2002; 9: 325-337.
16. Reis SR, Valente LMM, Sampaio AL, Siani AC, Gandini M, Elzinandes LA, D'avila LA, Mazzei JL, Henriques MGM, Kubelka

- CF. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 468-476.
17. Bertol, G, Franco, L, Oliveira, HB. HPLC analysis of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa*: sample preparation and analysis optimization by factorial design. *Phytochem Anal* 2012; 23: 143-151.
 18. Montoro, P, Carbone, V, Dizio, JZQ, Dimone, F, Pizza, C. Identification and quantification of components in extracts of *Uncaria tomentosa* by HPLC-ES/MS. *Phytochem Anal* 2004; 15: 55-64.
 19. Exon, JH, Bussierer, JL, Mather, GC. Immunotoxicity testing in the rat: an improved multiple assay model. *Int J Immunopharmacol* 1990; 12: 699-701.
 20. Hasui, M, Hirabayashi, Y, Kobayashi, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. *J. Immunol. Meth* 1989; 117, 53-58.
 21. Rizzi R, Re F, Bianchi A, De Feo V, De Simone F, Bianchi L, Stivala LA. Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts. *J Ethnopharmacol* 1993; 38: 63-77.
 22. Sheng Y, Pero RW, Amiri A, Bryngelsson C. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. *Anticancer Res* 1998; 5: 3363-3368.
 23. Riva L, Cordini D, Di Fronzo G, De Feo V, De Tommasi N, De Simone F, Pizza C. The antiproliferative effects of *Uncaria tomentosa* extracts and fractions on the growth of breast cancer cell line. *Anticancer Res* 2001; 21: 2457-2461.
 24. Heron I, Berg K. The actions of interferon are potentiated at elevated temperature. *Nature* 1978; 274: 508-510.
 25. Roberts NJ Jr. Impact of temperature elevation on immunologic defenses. *Rev Infect Disease* 1991; 13: 462-472.
 26. Idoia G, Cheido M, Devoino L. Modulation of the immune response by changing neuromediator systems activity under stress. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19: 535-540.
 27. Stevens KR, Gallo MA. Practical considerations in the conduct of chronic toxicity studies. *Principles and methods of toxicology*, Raven Press: New York, pp. 237-250, 1989.
 28. Lang TJ. Estrogen as an immunomodulator. *Clin Immunol* 2004; 113: 224-230.
 29. Walker SE. Estrogen and autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011; 40: 60-65.
 30. Kracker S, Radbruch A. Immunoglobulin class switching - In vitro induction and analysis. *Methods in Molecular Biology*, Human Press: Totowa. 271, 149-159, 2004.
 31. Nossal GJY, Szenberg A, Ada GL, Austin CM. Single cell studies on 19S antibody production. *J. Exp. Med* 2004; 11: 485-502.
 32. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesayre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 2000; 80: 617-653.
 33. Davies DT. Enzymology in preclinical safety evaluation. *Toxicol Pathol* 1992; 20: 501-505.
 34. Boone L, Meyer D, Cusick P, Ennulat D, Provencher Bolliger A, Everds N, Meador V, Elliott G, Honor D, Bounous D, Jordan H. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. *Vet Clin Pathol* 2005; 34: 182-188.
 35. Ahmad R, Hashim HM, Noor ZM, Ismail NH, Salim F, Lajis NH, Shaari, K. Antioxidant and antidiabetic potencial of *Malaysin Uncaria*. *Res J Med Plant* 2011; 5: 587-595.
 36. Domingues A, Sartori A, Golim MA, Valente LMM, Rosa LC, Ishikawa LLW, Siani AC, Viero RM. Prevention of experimental diabetes by *Uncaria tomentosa* extract: Th2 polarization, regulatory T cell preservation or both? *J Ethnopharmacol* 2011; 137: 635-342.
 37. Safayhi H, Sailer ER. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Med* 1997; 63: 487-493.
 38. McCrimmon RJ, Frier BM. Hypoglycemia, the most feared complication of insulin therapy. *Diabetes Metab* 1994; 20: 503-512.