ANDRÉIA OLIVEIRA LATORRE

**Efeitos imunotóxicos da *Pteridium aquilinum* em
células natural killer de camundongos e a reversão
destes efeitos com selênio**

**São Paulo
2010**

ANDRÉIA OLIVEIRA LATORRE

Efeitos imunotóxicos da *Pteridium aquilinum* em células natural killer de camundongos e a reversão destes efeitos com selênio

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak

São Paulo

2010

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.2342
FMVZ

Latorre, Andréia Oliveira
Efeitos imunotóxicos da *Pteridium aquilinum* em células natural killer de camundongos
e a reversão destes efeitos com selênio / Andréia Oliveira Latorre. -- 2010.
109 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak.

1. Ptaquilosídeo. 2. Imunoestimulação. 3. Metalotioneína. 4. Citometria de fluxo. 5.
Microarranjo de DNA. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos efeitos imunomodulatórios da *Pteridium aquilinum* na resposta imune celular. Estudo em camundongos", protocolado sob o nº1061/2007, utilizando 136 (cento e trinta e seis) camundongos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Evaluation of immunomodulatory effects of the *Pteridium aquilinum* on cellular immune response. Study in mice", protocol number 1061/2007, utilizing 136 (one hundred and thirty six) mice, under the responsibility Profa. Dra. Silvana Lima Górnaiak, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 23 de março de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LATORRE, Andréia Oliveira

Título: Efeitos imunotóxicos da *Pteridium aquilinum* em células natural killer de camundongos e a reversão destes efeitos com selênio

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a) Dr(a)_____

Instituição_____

Assinatura_____

Julgamento_____

Prof(a) Dr(a)_____

Instituição_____

Assinatura_____

Julgamento_____

Prof(a) Dr(a)_____

Instituição_____

Assinatura_____

Julgamento_____

Prof(a) Dr(a)_____

Instituição_____

Assinatura_____

Julgamento_____

Prof(a) Dr(a)_____

Instituição_____

Assinatura_____

Julgamento_____

Heídge obrigada por todo amor,
atenção, carinho, dedicação e
paciência em todos os momentos.
Por sempre fazer minha vida mais
feliz a cada dia, amo você.

Meus pais Ana e Miguel obrigada
por estarem sempre ao meu lado e
apoíarem incondicionalmente aos
meus sonhos.

Meu irmão Anselmo, minha
cunhada Amanda e principalmente
aos meus sobrinhos Lucas e
Gabriela obrigada por sempre serem
muito amáveis em todos os
momentos comigo.

A professora Dra. Silvana Lima Górnjak, minha orientadora desde a iniciação científica, pela sua dedicação ao longo de todos estes anos e por todos ensinamentos e amizade, imprescindíveis no meu aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Patologia (VPT), Laboratório de Farmacologia e Toxicologia e Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), locais onde foi desenvolvida a maior parte deste estudo.

A todos os professores do Departamento de Patologia (FMVZ-USP), pelo incentivo e auxílio.

Aos professores Frederico e Ramon Kaneno pelas sugestões na qualificação do doutorado.

Aos funcionários do CEPTOX pelo auxílio na coleta de samambaia e pela ótima convivência.

Aos funcionários do biotério: Claudia, Herculano, Idalina, Rosiris, Nelson e Mauro pela dedicação, auxílio e ótima convivência.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia: Priscila, Ricardo, Magali, Herculano e Vagner pelo auxílio no laboratório.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia: Cláudio e Luciano pela confecção das lâminas estudadas.

Aos meus colegas da pós-graduação que contribuíram diretamente no desenvolvimento desse trabalho: Ricardo, Beatriz, Heidge e Tereza.

A pesquisadora Dra. Mitsue Haraguchi e ao aluno de iniciação científica Harry Leo Wysochi Jr. do Instituto Biológico de São Paulo e ao pesquisador Dr. Dale R. Gardner do Poisonous Plant Research Laboratory pela colaboração no isolamento e quantificação do ptaquilosídeo.

A pesquisadora Dra. Patrícia Locosque Ramos e da pós-graduanda Beatriz Corradini do Laboratório de Genômica Pediátrica no Depto. de Pediatria da FMUSP pela colaboração na análise da qualidade do RNA e escaneamento das plataformas de microarranjo de DNA.

Ao Prof. Fabrício Martins Lopes (Universidade Tecnológica do Paraná) e doutorando no IME-USP pela colaboração nas análises dos dados de expressão gênica.

A Carolina Aoki e a Regina Maki da GE Healthcare por toda a ajuda nos experimentos de microarranjo de DNA.

Aos demais funcionários do Departamento de Patologia: Livia, Lucia, Marguiti, Marta e Shirley pela agradável convivência.

Aos funcionários da biblioteca pela correção da tese e auxílio sempre presentes.

A todos meus colegas da pós-graduação pela ótima convivência e principalmente aos meus amigos: Aline, Beatriz, Camila Lima, Camila Moreira, Felipe, Luciana Lippi, Luciana Cunha, Juliana Vieira, Fernando Pipole, Fernando Souza, Maiara, Fabiana Elias, Maria Izabel, Tereza, Lucas, Daniel Sanches, Tarso e Márcia Nagamine.

As minhas amigas da graduação por sempre me apoiarem: Cristina, Thaís e Carina.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento desta pesquisa.

RESUMO

LATORRE, A. O. **Efeitos imunotóxicos da *Pteridium aquilinum* em células natural killer de camundongos e a reversão destes efeitos com selênio.** [Immunotoxic effects of *Pteridium aquilinum* in natural killer cells from mice and the reversion of these effects by selenium]. 2010. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Os resultados obtidos no mestrado mostraram que a samambaia do campo (*Pteridium aquilinum*) reduz a citotoxicidade das células natural killer (NK) esplênicas e a resposta imune celular do tipo tardia (DTH) de camundongos. Entretanto, até aquele momento não era sabido qual a célula afetada pela planta causava a diminuição da DTH. Assim, o objetivo inicial deste estudo foi verificar qual a célula envolvida na diminuição da DTH. Além disto, buscou-se descobrir o mecanismo de ação imunotóxico da *P. aquilinum*, o princípio tóxico envolvido e se este efeito poderia ser revertido pelo selênio (Se). Para tal, camundongos C57BL/6 foram administrados com extrato de *P. aquilinum*, por gavagem, durante 30 dias e suplementados com Se por mais 30 dias e a análise histológica revelou redução significativa na área de polpa branca esplênica que foi completamente revertida pelo tratamento com Se. Ainda, foi possível verificar que a diminuição da DTH foi causada pela redução da produção de IFN γ pelas células NK durante a indução da resposta imune celular. Além disto, camundongos administrados com ptaquilosídeo, por gavagem, durante 14 dias mostraram a mesma redução na atividade das células NK causada pelo extrato de *P. aquilinum*, assim como a prevenção deste efeito pela co-administração de Se. Por fim, na análise da expressão gênica das células NK esplênicas dos camundongos tratados com ptaquilosídeo e/ou selênio pôde-se observar o aumento da expressão dos genes Mt1 e Mt2, possíveis responsáveis pelo mecanismo imunotóxico da planta, sendo posteriormente confirmado pelo aumento de metalotioneína e consequente redução de Zn²⁺ livre no espaço intracelular das células NK. Os resultados deste estudo claramente mostram que os efeitos imunossupressores da *P. aquilinum* são induzidos pelo ptaquilosídeo e são decorrentes do aumento da expressão dos genes da Mt1 e Mt2 e que a suplementação com Se pode prevenir e reverter estes efeitos tóxicos.

Palavras-chave: Ptaquilosídeo. Imunoestimulação. Metalotioneína. Citometria de fluxo. Microarranjo de DNA.

ABSTRACT

LATORRE. A. O. **Immunotoxic effects of *Pteridium aquilinum* in natural killer cells from mice and the reversion of these effects by selenium.** [Efeitos imunotóxicos da *Pteridium aquilinum* em células natural killer de camundongos e a reversão destes efeitos com selênio]. 2010. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The results obtained in the master showed that the bracken fern (*Pteridium aquilinum*) reduces both the cytotoxicity of splenic natural killer cells (NK) and the delayed-type hypersensitivity (DTH) from mice. However, it was not known until that time, which cell affected by the plant that caused a decrease in DTH. Thus, the initial goal of this study was to determine which cell was involved in the reduction of DTH. Moreover, we sought to discover the mechanism of action of the *P. aquilinum*, the toxic principle involved and whether this effect could be reversed by selenium (Se). For that, C57BL/6 mice were treated with extract of *P. aquilinum*, by gavage, for 30 days and supplemented with Se for following 30 days. The histological analysis revealed a significant reduction in the splenic white pulp area that was completely reversed by treatment with Se. Still, it was verified that the decrease in DTH was caused by reduced production of IFN γ by NK cells during the induction of cellular immune response. In addition, the mice administered with ptaquiloside, by gavage, for 14 days showed the same reduction in the NK cell activity caused by the extract of *P. aquilinum*, as well as the prevention of this effect by co-administration of Se. Finally, we could observe an increase in the expression of Mt1 and Mt2 genes in the gene expression analysis of splenic NK cells from mice treated with ptaquiloside and/or selenium. These genes were probably responsible for immunotoxic mechanism of the plant, which was confirmed later by the augment of metallothionein and consequent reduction of free Zn²⁺ into the intracellular space of NK cells. The results of this study clearly show that the immunosuppressive effects of *P. aquilinum* are induced by ptaquiloside and they are a consequence of the augment in the gene expression of Mt1 and Mt2 and that the supplementation with Se can prevent and reverse these toxic effects.

Keywords: Ptaquiloside. Immunostimulation. Metallothionein. Flow cytometry. DNA microarray.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Sobre a <i>Pteridium aquilinum</i>	18
1.2	Sobre as células <i>natural killer</i>	24
1.3	Resumo dos resultados obtidos na Dissertação de Mestrado	25
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Animais	30
3.2	Reagentes	30
3.3	Soluções	33
3.4	<i>Pteridium aquilinum</i> e ptaquilosídeo	34
3.4.1	<i>Análise no HPLC</i>	35
3.4.2	<i>Tratamento com P. aquilinum</i>	36
3.4.3	<i>Tratamento com ptaquilosídeo</i>	36
3.5	Extrato de <i>P. aquilinum</i> em RPMI	36
3.6	Suplementação com tiamina	37
3.7	Órgãos linfoides e avaliação histopatológica	37
3.7.1	<i>Análise morfológica</i>	37
3.8	Princípios da utilização do citômetro de fluxo	38
3.9	Avaliação da atividade dos macrófagos peritoneais por medida de <i>burst</i> oxidativo e fagocitose por citometria de fluxo	38
3.10	Indução da resposta imune celular	39
3.10.1	<i>Avaliação das células natural killer e dendríticas durante a indução da resposta imune celular</i>	40
3.10.2	<i>Avaliação da expansão de linfócitos T antígeno específica</i>	41
3.11	Avaliação da proliferação <i>in vivo</i> de células NK esplênicas	42
3.12	Quantificação das células NK esplênicas	43
3.13	Avaliação da citotoxicidade das células NK	43

3.14	Imunoestimulação com selênio	44
3.15	Teste de viabilidade celular MTT	44
3.16	Análise da ativação de caspase-3	45
3.17	Separação magnética de células NK por depleção	45
3.18	Extração do RNA Total das células NK	47
3.19	Avaliação da expressão gênica das células NK pela técnica de microarranjo de DNA	48
3.19.1	<i>Síntese do cRNA por transcrição in vitro</i>	49
3.19.2	<i>Hibridização</i>	51
3.19.3	<i>Lavagem pós-hibridização</i>	51
3.19.4	<i>Escaneamento</i>	52
3.20	Avaliação da expressão intracelular de metalotioneína em células NK por citometria de fluxo	52
3.21	Deteção e quantificação de Zn^{2+} livre intracelular por citometria de fluxo	53
3.22	Análise estatística	53
4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS	56
4.1	Quantificação de ptaquilosídeo nos brotos de <i>P. aquilinum</i>	56
4.1.1	<i>Resultados</i>	56
4.2	Experimento 1: Avaliação das atividades de macrófagos peritoneais por medida de <i>burst</i> oxidativo e fagocitose	57
4.2.1	<i>Resultados</i>	57
4.3	Experimento 2: Avaliação da capacidade da imunoestimulação com selênio reverter atrofia da polpa branca causada pela administração de <i>P. aquilinum</i>	58
4.3.1	<i>Resultados</i>	59
4.4	Experimento 3: Avaliação dos efeitos da imunoestimulação com selênio no hemograma, medula óssea, peso relativo de baço e relação CD4/CD8 de camundongos tratados com <i>P. aquilinum</i>	62
4.4.1	<i>Resultados</i>	62
4.5	Experimento 4: Avaliação do efeito da <i>P. aquilinum</i> na indução da	

	resposta imune celular pela verificação do fenótipo das células DC e NK e produção de citocinas	65
4.5.1	<i>Resultados</i>	65
4.6	Experimento 5: Avaliação dos efeitos da administração da <i>P. aquilinum</i> na expansão de linfócitos T antígeno específica	69
4.6.1	<i>Resultados</i>	69
4.7	Experimento 6: Avaliação para verificar se a diminuição da citotoxicidade das células NK causada pela <i>P. aquilinum</i> é devido à diminuição de atividade ou à diminuição de viabilidade celular e se a imunoestimulação com selênio pode prevenir e/ou reverter esta diminuição de atividade	71
4.7.1	<i>Resultados</i>	71
4.8	Experimento 7: Avaliar se a imunoestimulação com selênio <i>in vitro</i> induz a ativação da caspase-3	73
4.8.1	<i>Resultados</i>	73
4.9	Experimento 8: Avaliação se o ptaquilosídeo, principal principio ativo encontrado na <i>P. aquilinum</i> , é o responsável pela supressão da atividade das células NK	75
4.9.1	<i>Resultados</i>	75
4.10	Experimento 9: Avaliar se o tratamento com ptaquilosídeo interfere na proliferação das células NK esplênicas pela verificação da incorporação de BrdU administrado <i>in vivo</i>	77
4.10.1	<i>Resultados</i>	77
4.11	Experimento 10: Avaliação da expressão gênica das células NK esplênicas de camundongos tratados com ptaquilosídeo e/ou selênio	79
4.11.1	<i>Resultados</i>	79
4.12	Experimento 11: Quantificação da proteína metalotioneína no espaço intracelular das células NK esplênicas de camundongos tratados com ptaquilosídeo e/ou selênio <i>in vitro</i>	84
4.12.1	<i>Resultados</i>	84

4.13	Experimento 12: Avaliação da concentração intracelular de Zn^{2+} livre em células NK esplênicas de camundongos tratados com ptaquilosídeo e/ou selênio <i>in vitro</i>	86
4.13.1	<i>Resultados</i>	86
5	DISCUSSÃO	89
6	CONCLUSÕES	98
	REFERÊNCIAS	100

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O estudo da intoxicação por plantas é de grande interesse agropecuário mundial, por ser a causa de grandes perdas econômicas. Neste sentido, em um levantamento realizado em 17 estados do meio-oeste americano, estimou-se uma perda econômica acima de 340 milhões de dólares, relacionada aos prejuízos relativos à morte e falhas reprodutivas de animais de criação, devido a intoxicações por plantas (NIELSEN, 1988).

No Brasil, embora não haja levantamentos estatísticos como este realizado nos Estados Unidos, em uma pesquisa realizada por Riet-Correa e Medeiros (2001), verificaram que cerca de um milhão de bovinos morrem, anualmente, pela ingestão de plantas tóxicas, causando uma perda econômica acima de 160 milhões de dólares. Provavelmente estes valores são ainda mais elevados, uma vez que este levantamento foi baseado na mortalidade dos animais em estados do Sul do país, onde, por possuir melhor controle e manejo dos animais, muito provavelmente ocorra menor mortalidade de bovinos determinada pela intoxicação por plantas. Ainda considerando a região Sul do país, outro estudo mostrou que 10657 cabeças de gado foram perdidas por ano no estado de Santa Catarina, entre 1987 e 2001, somente devido à intoxicação pela *Pteridium aquilinum* (GAVA et al., 2002).

A *Pteridium aquilinum*, conhecida popularmente como “samambaia do campo” ou simplesmente “samambaia”, é considerada uma das plantas tóxicas mais importantes no mundo tanto pela sua distribuição cosmopolita e intoxicação de rebanhos em vários países quanto pelo seu alto potencial carcinogênico observado em animais e seres humanos que se alimentam com esta planta (SUGIMURA, 2000; ALONSO-AMELOT; AVENDANO, 2002). Desta maneira, estudos que visem um melhor entendimento da toxicidade da *P. aquilinum* são de fundamental importância.

1.1 Sobre a *Pteridium aquilinum*

A *Pteridium aquilinum* é uma planta tóxica de ampla distribuição pelo mundo, sendo restrita apenas em regiões de temperaturas extremas (FENWICK, 1988; DER et al., 2009). Pertence à família Dennstaedtiaceae e é conhecida popularmente como “samambaia do campo”. No Brasil, encontra-se a *P. aquilinum* variedade *arachnoideum* que ocorre em regiões montanhosas do Nordeste, Sul e Sudeste, desenvolvendo-se melhor em regiões frias com alta pluviosidade e solos bem drenados e ácidos; além disto, também pode ser encontrada em regiões não montanhosas do Brasil, incluindo algumas partes da Amazônia, Acre, Mato Grosso e Pernambuco (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2002). O estudo mais recente de filogenia do gênero *Pteridium* propõe alterações nesta classificação, que então compreenderia cinco espécies *P. aquilinum*, *P. arachnoideum*, *P. caudatum*, *P. esculentum* e *P. semibastatum*, sendo a espécie *P. arachnoideum* a encontrada no Brasil (DER et al., 2009).

Em relação às características botânicas, “é uma planta perene, herbácea, de rizoma subterrâneo muito alongado e ramificado, e folhas de 100 a 200 cm” (Figura 1). É uma das primeiras plantas a crescer em áreas recém queimadas, devido ao seu rizoma ser profundo e resistir ao fogo, e é comum também em regiões de solo pobre e ácido (MITICH, 1999).

A respeito de seus constituintes tóxicos, a samambaia contém diferentes princípios ativos, os quais podem causar doenças distintas, sendo a principal o desenvolvimento de cânceres no trato gastrintestinal e na vesícula urinária dos animais que consomem a planta. Este efeito carcinogênico foi demonstrado pela primeira vez por Evans e Mason (1965), que observaram que ratos alimentados com a samambaia desenvolveram adenocarcinomas intestinais, efeito este, comprovado posteriormente por outros autores (PAMUKCU; PRICE, 1969; SCHACHAM; PHILP; GOWDEY, 1970).

O princípio tóxico relacionado à carcinogênese é o ptaquilosídeo, um glicosídeo norsesquiterpeno, o qual é considerado o principal entre os encontrados nesta planta por estar relacionado também a outros efeitos tóxicos (DO NASCIMENTO FRANÇA; TOKARNIA; PEIXOTO, 2002). O ptaquilosídeo é um composto instável e tem sua ação dependente do pH local; assim, em pH ácido sofre aromatização e forma-se pterosin B e,

em pH alcalino, é convertido ao verdadeiro agente tóxico, a dienona (YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007). Esta substância, por sua vez, reage rapidamente com aminoácidos, nucleosídeos e nucleotídeos formando adutos no DNA (OJIKI et al., 1987) e, desta maneira, causa alterações irreversíveis nos genes afetados. Assim, se os produtos destes genes forem as proteínas responsáveis pelo controle da apoptose ou da divisão celular, estas alterações podem ocasionar uma proliferação celular descontrolada resultando, provavelmente, no desenvolvimento de cânceres (ALONSO-AMELOT; AVENDANO, 2002).

Outro princípio tóxico encontrado na planta é a tiaminase tipo 1, que se encontra em maior quantidade nos rizomas e está relacionada principalmente com quadros de intoxicação de animais monogástricos (FENWICK, 1988). Além destes princípios tóxicos também há, na samambaia, vários glicosídeos cianogênicos, principalmente na variedade *arachnoideum*, e por serem encontrados em pequenas quantidades não causam a morte dos animais, mas que segundo Alonso-Amelot (1999), podem causar inflamação gastrointestinal com hemorragias, congestão do fígado e rins; e também há o ácido shiquímico e a quercetina, que por certo tempo foram considerados tóxicos, mas depois foi demonstrado que não são (FENWICK, 1988; NGOMUO; JONES, 1996; AKINAGA et al., 2007; HARWOOD et al., 2007).

O interesse pela toxicidade produzida pela *P. aquilinum* não se limita somente à criação animal; neste sentido, estudo epidemiológico, realizado em nosso país, associou o consumo de brotos e rizomas de samambaia com uma maior incidência de câncer de esôfago e estômago em humanos (SANTOS, 2001). O hábito de consumir os brotos da samambaia também é comum em outros países como: Japão, Coreia do Sul, Rússia, Austrália, Nova Zelândia, Estados Unidos e Canadá (FENWICK, 1988; SMITH, 2004). Além da ingestão direta dos princípios tóxicos da samambaia pela alimentação, os humanos podem ingeri-los de forma indireta, pois os animais que consomem a planta excretam o ptaquilosídeo no leite (EVANS; JONES; MAINWARING-BURTON, 1972; PAMUKCU; ERTURK; YALCINER, 1978; ALONSO-AMELOT et al., 1996; ALONSO-AMELOT, 1997), sendo que a fervura ou a pasteurização diminuem (74 e 48%, respectivamente), mas não eliminam totalmente este princípio tóxico (VILLALOBOS-SALAZAR et al., 1999).

Considera-se ainda que, pelo processo de lixiviação, a ingestão do princípio tóxico também possa ocorrer por meio do consumo de água de reservatórios localizados em áreas muito invadidas pela *P. aquilinum*. Corroborar com isto, estudos realizados na Dinamarca (RASMUSSEN et al., 2003; RASMUSSEN; HANSEN; LAUREN, 2005), nos quais foram mostradas a contaminação do solo e da água, por ptaquilosídeo, após a ocorrência de chuvas.

Já para os animais, a intoxicação ocorre principalmente pelo consumo da samambaia na época de escassez de forragens, quando a fome faz com que os animais se alimentem dos brotos que contêm altas concentrações de princípios tóxicos (RIET-CORREA, 2001). Além disso, há indícios de que os animais possam desenvolver vício e após as primeiras ingestões, continuam a comer a samambaia (Figura 2). Ainda, há indícios que animais com escassez de fibra bruta na dieta consumam a planta para compensar esta deficiência (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2002).

Nos animais monogástricos, principalmente equinos, a intoxicação leva ao desenvolvimento de sintomatologia nervosa, devido à presença de tiaminase do tipo 1, a qual destrói de forma efetiva a tiamina (vitamina B1) presente no trato digestivo do animal. Os sinais iniciais consistem de anorexia e ataxia, que evoluem para opistótono, convulsão e morte, com a presença de lesões de polioencefalomalácia (SMITH, 2004). Todavia, se a intoxicação é tratada no início da sintomatologia, pela reposição de tiamina, há completa recuperação do animal (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2000). Em geral, os ruminantes não são sensíveis a este tipo de intoxicação, devido a microbiota do rúmen produzir grandes quantidades de tiamina. No entanto, esta forma de intoxicação foi reproduzida experimentalmente em ovinos, alimentados com o rizoma da samambaia, por Evans et al. (1975) que observou lesões características de necrose cerebrocortical nestes animais. Por outro lado, não se pode descartar que estas alterações histológicas observadas por Evans et al. (1975) possam ter sido decorrentes de glicosídeos cianogênicos também presentes na *P. aquilinum*. De fato, em um estudo realizado por Tulsawani et al. (2005), induziram degeneração cerebrocortical em ratos após tratamento com cianeto de potássio, durante 14 dias.

Ainda, na espécie ovina foi descrita outra manifestação de intoxicação, na qual se verifica que os animais, ao se alimentarem com a *P. aquilinum*, desenvolvem degeneração progressiva de retina, resultando em cegueira (ALONSO-AMELOT, 1999). A lesão mais

precocemente detectável é o aumento da reflexão a partir do tapetum lúcido, o qual aparece como um espelho, ao ser feita a oftalmoscopia. Estes animais acabam morrendo de inanição por não serem mais capazes de se alimentar e manter-se no rebanho. Experimentalmente a degeneração progressiva de retina foi reproduzida em ovinos pela administração do ptaquilosídeo (HIRONO et al., 1993).

Já os bovinos apresentam três formas clínicas distintas de intoxicação com a *P. aquilinum*, dependendo da quantidade e do tempo de ingestão. Uma delas é a síndrome hemorrágica aguda que ocorre quando os animais, após serem submetidos a transportes por tempo prolongado, são colocados em pastos contaminados pela samambaia. Esta manifestação de intoxicação também pode aparecer após o fim do inverno, período no qual a pastagem ainda é pobre, e já ocorre a brotação da samambaia com vigor. Verifica-se que os animais com menos de dois anos são os mais afetados. As alterações aparecem quando os animais ingerem quantidades diárias maiores que 10 g/kg (até 30 g/kg) da planta, em um período relativamente pequeno de 3 a 8 semanas (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2002). Os sinais e a sintomatologia mais característicos são febre, anorexia, parada da ruminação, fezes com sangue, diarreia fétida, respiração ofegante, hemorragias cutâneas nas mucosas das narinas, vulva, reto e conjuntiva, e úlceras na boca. O hemograma revela anemia acentuada, leucopenia e trombocitopenia (RIET-CORREA, 2001; ANJOS et al., 2008). Geralmente, ocorre a morte uma a duas semanas após o início dos sintomas. À necropsia observa-se palidez de mucosas e vísceras, petéquias nas gengivas e conjuntivas, e equimoses e sufusões nas mucosas e serosas das cavidades torácica e abdominal. No intestino, podem ser encontradas ulcerações na mucosa intestinal. Na avaliação histopatológica podem-se observar hemorragias e focos de necrose no fígado, redução dos centros germinativos no baço e principalmente rarefação do tecido hematopoiético na medula óssea, que é substituído por tecido lipídico (TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1967). Esta alteração observada na medula óssea foi reproduzida experimentalmente em um bezerro tratado apenas com o ptaquilosídeo (HIRONO; KONO; TAKAHASHI, 1984), o que evidencia que este seja o princípio tóxico responsável pela indução da síndrome hemorrágica aguda.

Outra forma de intoxicação produzida pela *P. aquilinum* é a hematúria enzoótica bovina (HEB), demonstrada experimentalmente pela primeira vez por Rosenberger e Heeschen (1960). Esta afecção é de evolução crônica de meses a anos e vem sendo

relatada em rebanhos bovinos de vários países no mundo, como Grã-Bretanha (HOPKINS, 1990), China (XU, 1992), Bolívia (MARRERO et al., 2001), ilha de São Miguel (PINTO et al., 2001) e Brasil (PEIXOTO et al., 2003). Geralmente, os animais que manifestam esta forma da doença têm mais de dois anos e apresentam como alterações hematúria intermitente, anemia e emagrecimento. Estes sintomas podem persistir por tempo prolongado, seguindo-se o óbito por caquexia. À necropsia as principais lesões são encontradas na vesícula urinária, que se encontra com espessamento de parede, hematomas e nódulos firmes na mucosa. Os exames histopatológicos revelam diversos tipos de processos neoplásicos de origem epitelial e mesenquimal (PEIXOTO et al., 2003; CARVALHO; PINTO; PELETEIRO, 2006). Até o momento não se conhece tratamento eficaz para a HEB, ocorrendo, então, 100 % de letalidade.

Ainda, a ingestão crônica de *P. aquilinum*, em bovinos, pode promover o desenvolvimento de carcinomas de células escamosas (CCE) nas vias digestivas superiores, principalmente: língua, faringe, esôfago e rúmen. Animais com mais de seis anos são os mais acometidos após ingestão por tempo prolongado de pequenas quantidades da samambaia (TOKARNIA; DÖBEREINER; PEIXOTO, 2002). Além disso, há evidências de que os carcinógenos, presentes na *P. aquilinum*, interajam com o papiloma vírus bovino (BPV) tipo 4 e induzam o desenvolvimento do CCE (MOREIRA SOUTO et al., 2006). Animais infectados pelo BPV-4 desenvolvem papilomas nas vias digestivas superiores, que são auto-limitantes, já que estas formações podem involuir e até mesmo desaparecer. No entanto, quando associado ao consumo de *P. aquilinum* observa-se malignização e desenvolvimento de CCE (BORZACCHIELLO et al., 2003; BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008), o que sugere um efeito imunossupressor desta planta na resposta contra o vírus. Entretanto, em animais acometidos podem-se observar também lesões pré-neoplásicas, independentemente da presença de papilomas locais, o que demonstra que o CCE pode se iniciar a partir de epitélio normal pela ação direta carcinogênica da *P. aquilinum* (MOREIRA SOUTO et al., 2006).

Figura 1 - Campo infestado pela samambaia do campo

Figura 2 - Bovinos se alimentando de samambaia do campo

1.2 Sobre as células *natural killer*

As células *natural killer* (NK) foram assim descritas pela primeira vez em 1975 por Kiessling et al. (1975) que verificaram, em camundongos saudáveis e não imunizados, a presença de células esplênicas com capacidade de matar as células leucêmicas induzidas pelo vírus Moloney *in vitro*. Ainda em 1975, o grupo do Herberman et al. (1975) também publicou um estudo, no qual foi observada a presença de células com atividade citotóxica, em camundongos saudáveis e não imunizados, contra vários tumores alogênicos e singênicos *in vitro*.

Entretanto, o grande interesse em entender melhor estas células surgiu 10 anos depois, quando Kärre publicou a teoria de reconhecimento pela ausência do próprio (LJUNGGREN; KARRE, 1985). Nesta teoria ele propôs que a estratégia das células NK de reconhecimento seria primeiramente pela detecção da ausência do complexo de histocompatibilidade principal de classe-I (MHC-I) do que pela presença deste (KARRE, 2008). Assim, as células NK de hospedeiros não imunizados seriam capazes de matar as células com ausência de expressão de MHC-I em sua superfície.

No ano seguinte, em 1986, as células NK foram definidas como uma linhagem de linfócitos distinta das dos linfócitos T e B por Lanier et al. (1986), o que logo possibilitaria a descrição de outras funções destas células além da citotoxicidade. Assim, em 1988 Anegón et al. (1988) demonstraram que as células NK também produziam citocinas (IFN γ e TNF), as quais eram liberadas em resposta à incubação com IL2 e com ligantes do receptor CD16.

Poucos anos depois o funcionamento destas células começava então a ser desvendado, havia sido descoberto o primeiro receptor inibidor da ativação das células NK em camundongos, denominado Ly49 (KARLHOFFER; RIBAUDO; YOKOYAMA, 1992). Outros estudos foram publicados nos anos seguintes, os quais confirmavam a existência de receptores inibidores nas células de camundongos (MASON et al., 1995; STONEMAN et al., 1995) e de humanos (COLONNA; SAMARIDIS, 1995; WAGTMANN et al., 1995). Por conseguinte, descobriram-se posteriormente, os receptores ativadores nas células NK humanas (MORETTA et al., 2001; RAULET, 2003).

Até aquele momento as células NK eram conhecidas apenas como as principais efetoras da imunidade inata, cuja função era combater células cancerosas e infectadas por patógenos intracelulares. Contudo, no ano de 2004 foi demonstrado que estas células também desempenhavam importante papel na modulação da resposta imune celular adaptativa através da liberação de IFN γ , durante a indução da resposta imune celular, o qual seria importante na polarização dos linfócitos *Thelper* para *Thelper* 1 (Th1) (MARTIN-FONTECHA et al., 2004).

Atualmente, as funções conhecidas das células NK incluem também a função de reguladora da inflamação e das respostas imunes adaptativas (VIVIER et al., 2008).

1.3 Resumo dos resultados obtidos na Dissertação de Mestrado

No estudo anterior foram avaliados os efeitos da *P. aquilinum* sobre as respostas imune inata e adaptativa em camundongos tratados com as doses equivalentes a 1, 10 e 30 g de broto de samambaia/kg de peso vivo, por gavagem, durante 14 dias. Para tal, foram utilizados os seguintes protocolos: avaliação histológica e contagem da celularidade dos órgãos linfoides, produção e titulação de anticorpos T – dependente, proliferação de linfócitos T e B, resposta de hipersensibilidade tardia, fenotipagem linfocítica e citotoxicidade de células NK. Avaliou-se também a variação do peso, consumos de ração e água, a cada três dias, que mostraram ser semelhantes entre os grupos em todos os experimentos realizados.

Entre os efeitos imunotóxicos observados pode-se destacar na avaliação histológica a redução da polpa branca do baço e nas respostas imunes inata e adaptativa a diminuição da citotoxicidade das células NK e a redução da resposta imune celular do tipo hipersensibilidade tardia (DTH), respectivamente nos camundongos tratados com a maior dose 30 g/kg de broto de samambaia. Nos demais protocolos utilizados não se observaram alterações entre os grupos.

Com relação à resposta DTH, estes dados permitem sugerir que a diminuição observada não foi devido ao efeito direto sobre os linfócitos Th1, principal célula envolvida na modulação desta resposta (KOBAYASHI; KANEDA; KASAMA, 2001), já

que os demais parâmetros avaliados dos linfócitos *Thelper* não mostraram qualquer alteração. Contudo, ainda restava saber qual a célula afetada pela *P. aquilinum* que causaria diminuição da resposta imune celular. Desta maneira, o objetivo inicial deste estudo foi verificar a ação da *P. aquilinum* sobre as células que estão diretamente envolvidas na indução da resposta imune celular, ou seja, as células dendríticas (DC) e as células NK (KAPSENBERG, 2003) e também avaliar as células efetoras desta resposta, os macrófagos (KOBAYASHI; KANEDA; KASAMA, 2001). Além disto, buscou-se verificar se o ptaquilosídeo, principal constituinte tóxico da *P. aquilinum* (YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007), seria o responsável pelos seus efeitos imunotóxicos, uma vez que, um estudo anterior realizado por nosso grupo (AKINAGA et al., 2007) descartou a participação dos princípios quercetina e kaempferol, que também são encontrados nesta planta. Por fim, objetivou-se descobrir o mecanismo de ação imunotóxico da *P. aquilinum* e verificar se este efeito poderia ser revertido pela suplementação com selênio.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar o mecanismo de ação imunotóxico da *P. aquilinum* em camundongos C57BL/6 e sua possível reversão.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Verificar qual é a célula alvo da *P. aquilinum* responsável pela diminuição da resposta imune celular;
- ✓ Avaliar se a imunoestimulação com selênio pode reverter os efeitos imunotóxicos causados pela *P. aquilinum*;
- ✓ Verificar se o ptaquilosídeo, principal princípio ativo da *P. aquilinum*, é o responsável pelos seus efeitos imunotóxicos;
- ✓ Verificar alterações na expressão gênica das células NK de camundongos tratados com a *P. aquilinum* e/ou com selênio;
- ✓ Determinar o mecanismo de ação imunotóxico da *P. aquilinum* em células NK.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, com aproximadamente 60 dias de idade no início do experimento, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP). Os animais permaneceram durante todo o experimento em caixas plásticas medindo 19,5 x 29,5 x 13 cm, forradas com maravalha esterilizada, as quais foram mantidas em sala com aeração, exaustão, temperatura ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e umidade (45 % - 65 %) controladas por meio de aparelhos de ar condicionado central em um ciclo claro/escuro de 12 h; água e ração foram fornecidos *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da FMVZ-USP e estão protocolados sob o nº1061/2007.

3.2 Reagentes

- Acetato de forbol miristato (PMA) (Sigma) – utilizado para induzir burst oxidativo.
- Adjuvante Completo de Freund (FCA) (Sigma) – utilizado associado a um antígeno para induzir resposta imune celular.
- Anasedan (xilazina) (Vetbrands™) - sedativo de uso veterinário utilizado em associação com quetamina para anestesiá-los os camundongos.
- Anatoxina tetânica (AT) (título 3200 LF/mL) lote nº: IB – AnT/PAG 04/03 fornecida pelo Instituto Butantã. Utilizada como antígeno na indução da resposta imune celular.
- Azul de Tripán (Gibco™, Invitrogen cell culture) – utilizado para exclusão das células inviáveis na contagem celular.

- BD Cytofix/Cytoperm™ Plus (BD Biosciences) - kit para fixação e permeabilização celular.
- BD GolgiPlug™ (BD Biosciences) - brefeldina A proteína inibidora de transporte no complexo de Golgi.
- Bromodeoxiuridina (BrdU) (Sigma) - análogo da timidina, utilizado para avaliar proliferação celular.
- 5-(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes®, Invitrogen detection technologies) – utilizado para marcar as células alvo YAC-1 na técnica de citotoxicidade de células NK.
- Cromatografia de camada delgada Silica-Gel 60 F₂₅₄ (Merck) – utilizada para monitorar as frações que continham ptaquilosídeo.
- Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma) – utilizado para detecção da produção de burst oxidativo.
- 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio (MTT) (Sigma) – utilizado para avaliação de viabilidade celular.
- Dopalen (quetamina) (Vetbrands™) – anestésico de uso veterinário utilizado em associação com xilazina para anestesiá-los os camundongos.
- EDTA (Merck & Co) - anticoagulante utilizado para coleta de sangue.
- FluoZin™-3, AM ester – empregado para quantificar o zinco livre no espaço intracelular.
- Iodeto de propídeo (PI) (Sigma) - utilizado para avaliação de viabilidade das células alvo YAC-1 na técnica de citotoxicidade de células NK.
- Leite desnatado (Difco™ Skim Milk, BD Biosciences) – utilizado para inibir marcações inespecíficas de anticorpos.
- NK Cell Isolation Kit mouse (Miltenyi Biotec) – utilizado para separação magnética de células NK por depleção. Contem o NK Cell Biotin-Antibody Cocktail que contem anticorpos contra CD4, CD5, CD8a, CD19, Ly-6G e Ter-119.
- NucView™488 Caspase-3 (Biotium) – detecta ativação de caspase-3.
- Paraformaldeído (Sigma) – utilizado para fixar células.
- Penicilina/estreptomicina (Gibco™, Invitrogen cell culture) - antibiótico para meio de cultura celular.

- Pluronic® F-127 solução 20% em DMSO (Molecular Probes®, Invitrogen detection technologies) – detergente não iônico empregado para facilitar a dispersão do reagente FluoZin 3 em meio aquoso.
- Resina Diaion® (Nippon Rensui Co) – adsorve ptaquilosídeo.
- RNAspin Mini kit (GE Healthcare) – utilizado para isolamento do RNA total das células NK.
- RPMI-1640 (Gibco™, Invitrogen cell culture) – meio de cultura celular.
- Selenito de Sódio (Na_2SeO_3) (Labsynth) – utilizado para imunoestimulação.
- Soro fetal bovino (SFB) (Gibco™, Invitrogen cell culture) – enriquece o meio de cultura celular.
- Tiamina (vitamina B₁) (Labsynth) – vitamina B1 utilizada para suplementar os camundongos.
- Todos os solventes utilizados para isolamento e quantificação do ptaquilosídeo foram da Merck.

Os dados dos anticorpos utilizados, como sua especificidade e fabricante são descritos no quadro 1 a seguir.

Quadro 1 - Anticorpos

Especificidade	Clone	Origem	Marcação	Fabricante
Anti-CD11c	HL3	IgG1, λ 2, hamster	PE-Cy7	BD Biosciences
Anti-CD83	Michel-19	IgG1, k, rato	PE	BD Biosciences
Anti-IL12	C15.6	IgG1, rato	não marcado	Invitrogen
Anti-rat F(ab') ₂	—	IgG, cabra	FTTC	Invitrogen
Anti-IL10	JES5-16E3	IgG2b, rato	FTTC	BD Biosciences
Anti-NK1.1	PK136	IgG2a, k, murino	PerCP-Cy5.5	BD Biosciences

Continua

Continua

Especificidade	Clone	Origem	Marcação	Fabricante
Anti-NKG2D	CX5	IgG1, k, rato	PE	BD Biosciences
Anti-IFN γ	XMG1.2	IgG1, k, rato	FTTC	BD Biosciences
Anti-CD3	17A2	IgG2b, k, rato	PE	BD Biosciences
Anti-CD4	GK1.5	IgG2b, k, rato	PE	BD Biosciences
Anti-CD8a	53-6.7	IgG2a, k, rato	PE	BD Biosciences
Anti-CD3	145-2C11	IgG1, k, hamster	FTTC	BD Biosciences
Anti-BrdU	B44	IgG1, k, murino	FTTC	BD Biosciences
Anti-MT	UC1MT	IgG1, murino	não marcado	Abcam
Anti-IgG mouse	—	IgG, cabra	FTTC	Abcam

3.3 Soluções

PBS (salina tamponada com fosfato) – solução estoque 10x concentrada. Utilizada para cultura celular

Na ₂ PO ₄ .7H ₂ O	26,79 g
Na ₂ PO ₄ .H ₂ O	4,14 g
NaCl	82,0 g
H ₂ O milli-Q	1000 mL

Solução de Lise (cloreto de amônio)

Solução de cloreto de amônio 0,16 M:

Cloreto de amônio	8,56 g
H ₂ O milli-Q	1000 mL

Solução Tris 0,17 M (pH 7,5):

Tris	20,5 g/L
------	----------

H₂O milli-Q

1000 mL

Para uso misturar 9 partes da solução de cloreto de amônio e 1 parte de solução Tris.

3.4 *Pteridium aquilinum* e ptaquilosídeo

Uma exsicata da planta (Nº MH 513) foi depositada no laboratório de Química de Produtos Naturais no Centro de Saúde Animal do Instituto Biológico de São Paulo. *Pteridium aquilinum* var. *arachnoideum* foi identificada pelo Dr. Jefferson Prado especialista em identificação de Pteridophyta do Instituto de Botânica de São Paulo.

Os brotos de *P. aquilinum* foram coletados em Pirassununga, São Paulo, Brasil, em fevereiro de 2007 e janeiro de 2009. Os brotos foram mantidos congelados a -80 °C até a preparação do extrato ou o isolamento do ptaquilosídeo. O extrato foi preparado conforme descrito previamente por Latorre et al. (2009). Além disto, os brotos foram submetidos à quantificação de ptaquilosídeo por HPLC-UV pelo método de quantificação de pterosina B adaptado de Alonso-Amelot et al. (1992), conforme descrito a seguir.¹

O isolamento de ptaquilosídeo consistiu das seguintes etapas: brotos congelados de *P. aquilinum* (500 g) foram triturados com água destilada (2 L) e mantidos no escuro a 15 °C por 2 horas. O extrato aquoso obtido foi então filtrado em filtro de pano e, em seguida, misturado à resina Diaion®. Após 15 minutos de agitação, esta resina foi lavada com água até que esta saísse incolor e, então, foi eluída com metanol. O eluído, assim obtido, foi evaporado em rota-evaporador a 30 °C e 50 mBar (Rotavapor® R-210 BÜCHI) para obter o resíduo metanólico. Este resíduo foi adicionado à coluna de sílica gel sob pressão com fase móvel de clorofórmio: metanol: água (65: 35: 10). As frações que continham o ptaquilosídeo foram monitoradas por cromatografia de camada delgada de sílica gel 60 (Silica-Gel 60 F₂₅₄, Merck) desenvolvidas em fase móvel de clorofórmio: metanol: água (65: 35: 10). A identificação do ptaquilosídeo foi verificada pelas análises de MS e NMR (OELRICHS; NG; BARTLEY, 1995; JENSEN et al., 2008).

¹ Esta etapa de isolamento e quantificação do ptaquilosídeo foi realizada no Laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais no Instituto Biológico de São Paulo com a orientação e colaboração da pesquisadora Dra. Mitsue Haraguchi, do aluno de iniciação científica Harry Leo Wysochi Jr. e do pesquisador Dr. Dale R. Gardner do Poisonous Plant Research Laboratory.

3.4.1 Análise no HPLC

O método de análise foi adaptado de Alonso-Amelot et al. (1992). Brotos congelados de *P. aquilinum* (10 g) foram triturados com água destilada (200 mL) e mantidos no escuro a 15 °C por 2 horas. O extrato aquoso obtido foi filtrado e centrifugado para ajudar a remover as partículas finas. Depois desta etapa, foi adicionado 1 mL de NaOH 1 M a 25 mL do filtrado (para replicatas da análise foram repetidas as alíquotas 2 ou 3 vezes) para decomposição do ptaquilosídeo por 2 horas a 45 - 50 °C. Em seguida, este extrato foi extraído três vezes com 10 mL de diclorometano (DCM) e as emulsões resultantes foram quebradas por centrifugação. Os extratos DCM foram combinados, secos com sulfato de sódio anidro ou sulfato de magnésio e rota-evaporados (Rotavapor® R-210 BÜCHI). O resíduo obtido foi colocado na parte superior de uma pequena coluna de sílica gel (250 mg em uma pipeta Pasteur) e a coluna foi lavada com 2 mL de hexano/acetato de etila (9:1). A pterossina B foi eluída com 2 mL de hexano/acetato de etila (1:2) e o solvente foi evaporado sob um fluxo de nitrogênio. Por fim, 1 mL de metanol foi adicionado para análise no HPLC/UV.

Os padrões de pterossina B foram preparados a 5, 20, 50, 100 e 200 µg/mL para calibração curva. As análises no HPLC foram feitas utilizando uma coluna Shim-pack ODS (4 mm x 150 mm, Shimadzu) com coluna de guarda ou equivalente coluna de fase reversa C18 e detector UV a 260 nm. A fase móvel utilizada consistiu de água e metanol; 40 % metanol (0 - 2 min), 40 - 80 % metanol (2 - 15 min), 80 - 40 % metanol (15 - 16 min), equilibrado com 40 % metanol (16 - 25 min) em um fluxo de 1,0 mL/min.

A quantidade de ptaquilosídeo foi calculada como:

$$\frac{[(\text{Resultado medido } (\mu\text{g/mL}) \text{ pterossina B} \times 1 \text{ mL} \times 200 \text{ mL}) / 25 \text{ mL}]}{10 \text{ g}} = \mu\text{g/g pterossina B} \times 1,83 = \mu\text{g/g ptaquilosídeo}.$$

A equação para 10 g de amostra foi:

$$\text{resultado medido } (\mu\text{g/mL}) \times 1,46 = \text{ptaquilosídeo } (\mu\text{g/g}).$$

3.4.2 Tratamento com *P. aquilinum*

Os tratamentos foram feitos sempre na dose equivalente a 30 g de broto/kg de peso vivo, sendo que esta foi preparada diariamente a partir do extrato da planta. A administração do extrato da planta, em todos os experimentos, foi realizada por via oral, através de gavagem, uma vez ao dia, sempre no mesmo horário. Durante todo o tratamento os camundongos foram pesados a cada três dias para o ajuste da dose.

3.4.3 Tratamento com ptaquilosídeo

O ptaquilosídeo foi mantido a -80 °C em frascos âmbar, contendo de 2 a 3 mg, até o momento do uso. Imediatamente antes da administração o ptaquilosídeo foi diluído com água destilada a 4 °C e administrado por via oral, através de gavagem, uma vez ao dia, na dose de 5,3 mg/kg que foi a mesma concentração obtida com 30 g/kg de brotos de *P. aquilinum* no presente estudo. Durante todo o tratamento os camundongos foram pesados a cada três dias para o ajuste da dose.

Para o tratamento *ex vivo* o ptaquilosídeo foi diluído imediatamente antes do uso em meio RPMI suplementados com 10 % SFB e aplicado na concentração final de 4,4 µg/mL.

3.5 Extrato de *P. aquilinum* em RPMI

Para o preparo do extrato de brotos congelados de *P. aquilinum* em RPMI (RE) utilizou-se o método descrito por Burkhalter et al. (1996) com modificações. Resumidamente, os brotos congelados (20 g) foram extraídos com 20 mL de meio RPMI a 4 °C sob agitação por 1 h no escuro. Após filtração para remover as partículas maiores, o RE foi esterilizado por passagem em filtro 0.22 µm duas vezes e, em seguida, foi

mantido a -20 °C até o momento do uso. Para o tratamento *in vitro* foi feita diluição 1:250 obtendo a concentração final equivalente a 4 mg/mL de broto de *P. aquilinum*.

3.6 Suplementação com tiamina

A suplementação com tiamina (vitamina B₁) foi feita na água [10 mg/L] (SCHACHAM; PHILP; GOWDEY, 1970), para evitar os efeitos tóxicos da tiaminase do tipo 1 presente na planta (SMITH, 2001).

3.7 Órgãos linfoides e avaliação histopatológica

Para análise histológica foram feitas seções (5 µm) coradas com hematoxilina e eosina dos seguintes tecidos: timo, baço, fígado, linfonodos mesentéricos, placas de Peyer, medula óssea do esterno e rim. Além disto, para avaliação da celularidade de medula óssea foram preparadas suspensões celulares da medula óssea proveniente de um fêmur de cada camundongo.

3.7.1 Análise morfométrica

Seções representativas dos baços foram submetidas à análise morfométrica no sistema de imagem Image-Pro Plus system, Version 4.5 (Media Cybernetics Inc, Bethesda, MD). As polpas brancas foram definidas com uma caneta eletrônica e o programa calculou cada área automaticamente.

3.8 Princípios da utilização do citômetro de fluxo

Foi utilizado um citômetro de fluxo (Becton Dickison Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) conectado a um computador (Machintosh Apple, CA, USA), sendo os eventos adquiridos por meio de um programa denominado Cell Quest Pro® (Becton Dickison Immunocytometry System, San Jose, CA, USA).

As subpopulações celulares foram reconhecidas por meio das propriedades de FSC – *Forward Scatter* e SSC – *Side Scatter* que avaliam o tamanho e a complexidade interna, respectivamente. As fluorescências da diclorofluoresceína (DCFH-DA), do carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), do FluoZin™-3 e do isotiocianato de fluoresceína (FITC) foram detectadas pelo filtro FL-1 (530 nm), da ficoeritrina (PE) e do iodeto de propídeo (PI) foram detectadas pelo filtro FL-2 (585 nm) e da peridinin chlorophyll protein - cyanine dye 5.5 (PerCP-Cy5.5) e da ficoeritrina – cyanine dye 7 (PE-Cy7) foram detectadas pelo filtro FL-3 (> 650 nm).

Todos os dados foram analisados através do programa FlowJo 7.2.2® (Tree Star Inc, Ashland, USA), sendo as populações de interesse em cada experimento selecionadas por meio de *gates*, excluindo assim outros tipos celulares das amostras. Além disto, para todos os experimentos o aparelho foi calibrado com um tubo branco como controle de fluorescência basal da célula a ser analisada.

3.9 Avaliação da atividade dos macrófagos peritoneais por medida de *burst* oxidativo e fagocitose por citometria de fluxo

Foi utilizado o método proposto por Hasui et al. (1989) com modificações. Para elicitar macrófagos para cavidade peritoneal foi aplicado 1 mL de tioglicolato Brewer 10 % quatro dias antes do término do tratamento com a planta. Após este período os camundongos foram submetidos à eutanásia, por decapitação, sendo imediatamente coletados os macrófagos peritoneais através da lavagem desta cavidade com 5 mL de PBS

a 4 °C. A seguir, esta suspensão de células foi ajustada a uma concentração de 2×10^6 células/mL, sendo preparados cinco tubos por amostra da seguinte maneira:

Tubo 1: 2×10^5 células em 1 mL de PBS

Tubo 2: 2×10^5 células, 200 µL de DCFH-DA (0,3 µM) em 800 µL de PBS. O DCFH-DA reage com os radicais livres produzidos pelas células e emite fluorescência verde

Tubo 3: 2×10^5 células, 100 µL de *Staphylococcus aureus* conjugado com PI (SAPI). O PI se intercala ao DNA da célula e emite uma fluorescência vermelha

Tubo 4: 2×10^5 células, 200 µL de DCFH-DA (0,3 µM), 100 µL de SAPI em 700 µL de PBS

Tubo 5: 2×10^5 células, 200 µL de DCFH-DA (0,3 µM), 100 µL de acetato de forbol miristato (PMA) (1 ng/µL) em 700 µL de PBS.

O 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 min., sendo feita a análise por citometria de fluxo imediatamente após a incubação.

Cada amostra foi passada no citômetro de fluxo sendo adquiridos 10000 eventos. Os valores referentes ao *burst* oxidativo e a fagocitose foram avaliados através da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelos macrófagos. Este valor é dado pelo aparelho a partir do *gate* selecionado para a população celular de interesse e pela análise do histograma de fluorescência da população.

3.10 Indução da resposta imune celular

Foi utilizada anatoxina tetânica (AT) como antígeno. Resumidamente, os camundongos foram imunizados com 100 µL de AT [50 LF/mL] diluída 1:1 em PBS e adjuvante completo de Freund, por via subcutânea. Sete dias após a imunização, os camundongos foram sacrificados para coleta do baço, sendo os esplenócitos desafiados *ex vivo* com o mesmo antígeno.

3.10.1 Avaliação das células natural killer e dendríticas durante a indução da resposta imune celular

Para avaliação destas células durante a indução da resposta imune celular, foram utilizados camundongos previamente imunizados com anatoxina tetânica (AT), conforme descrito no item anterior. Assim, sete dias após a imunização, os camundongos foram sacrificados para coleta dos baços. Estes foram macerados para separação dos esplenócitos, que após a lise das hemácias foram mantidos por 2h em estufa (37 °C, 5 % CO₂ e atmosfera umidificada) para separar as populações de acordo com a aderência ao plástico. Após este período as populações de células não-aderentes e aderentes foram cuidadosamente separadas e depois foram co-cultivadas na proporção de 30:1 (não-aderentes:aderentes), ou seja $1,93 \times 10^5$ ($3,87 \times 10^6$ céls/mL, plaquia 50 µL) não-aderentes para $6,5 \times 10^3$ ($1,3 \times 10^5$ céls/mL, plaquia 50 µL) aderentes. Em seguida, fez-se o desafio em triplicata acrescentando-se 10 µL por poço dos seguintes estímulos: meio completo (basal) ou AT (20 LF/poço) para as análises de células NK e produção de IFN γ , células DC e produção de IL-12 e células DC e produção de IL-10. As placas foram então mantidas em estufa (37 °C, 5 % CO₂ e atmosfera umidificada) por 3 horas e após este período foi acrescentado brefeldina A (proteína inibidora de transporte do complexo de Golgi, BD GolgiPlug™) em todos os poços para acúmulo das citocinas produzidas no meio intracelular, sendo as placas novamente mantidas em estufa (37 °C, 5 % CO₂ e atmosfera umidificada) por mais 2h. Após este período de incubação as células foram transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugadas a 500 g/5 min, ressuspensas em leite desnatado 5 % em PBS a 4 °C/1h para bloqueio de ligações inespecíficas. Depois se procedeu a lavagem das células com PBS, sendo estas ressuspensas num volume de 50 µL de PBS e acrescidas dos respectivos anticorpos para marcação das moléculas de superfície de células NK (anti-NK1.1 e anti-NKG2D) e de células DC (anti-CD11c e anti-CD83), sendo mantidas em incubação por 30 min a 4 °C. Ao término do período de incubação as células foram lavadas com PBS duas vezes e ressuspensas em paraformaldeído 4 % a 4 °C/10 min para a fixação destas. Após a fixação as células foram lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em 100 µL de DMSO e PBS (1:9) a 4 °C e

congeladas a -80°C para posterior permeabilização e marcação das citocinas intracelulares.

Para marcação das citocinas intracelulares IFN γ , IL-12 e IL-10 foi utilizado o protocolo proposto no kit BD Cytofix/Cytoperm™ Plus, e após a permeabilização celular e a incubação com os anticorpos respectivos para cada citocina as células foram ressuspensas em 500 μL de PBS para aquisição de 20000 eventos por citometria de fluxo. A análise dos dados foi feita pelo programa FlowJo 7.2.2®.

3.10.2 Avaliação da expansão de linfócitos T antígeno específica

Para avaliação da expansão de linfócitos T antígeno específica foram utilizados os esplenócitos de camundongos previamente imunizados com AT conforme descrito anteriormente no item 3.10. Para tal, utilizou-se o protocolo idêntico àquele descrito no item anterior 3.10.1, exceto que após as 2 horas de incubação, para separar as células aderentes das células não-aderentes, o sobrenadante contendo as células não-aderentes foi ajustado para 1×10^7 céls/mL e incubado com 1 μL CFSE por 20 minutos a 37°C no escuro. Após a marcação estas células foram lavadas e ajustadas para $3,87 \times 10^6$ céls/mL. Para recuperar as células aderentes lavaram-se as placas com meio RPMI a 4°C e, em seguida, ajustou-se estas células para $1,3 \times 10^5$ céls/mL. As duas populações celulares foram então co-cultivadas na proporção de 30:1 (não-aderentes:aderentes), ou seja $1,93 \times 10^5$ ($3,87 \times 10^6$ céls/mL, plaqueia 50 μL) não-aderentes para $6,5 \times 10^3$ ($1,3 \times 10^5$ céls/mL, plaqueia 50 μL) aderentes. Em seguida, fez-se o desafio em triplicata acrescentando-se 10 μL por poço dos seguintes estímulos: meio completo (basal) ou AT (20 LF/poço). As placas foram então mantidas em estufa (37°C , 5 % CO_2 e atmosfera umidificada) por 72 horas e após este período 20000 eventos/amostra foram adquiridos pelo citômetro de fluxo (FACS Calibur). A análise dos dados foi feita pelo programa FlowJo 7.2.2® e a expansão dos linfócitos T antígeno específica foi expressa como demonstrado a seguir.

$$\text{Índice de proliferação} = \frac{\% \text{ linfócitos estimulados}}{\% \text{ linfócitos não estimulados}}$$

3.11 Avaliação da proliferação *in vivo* de células NK esplênicas

Para avaliação da proliferação das células NK esplênicas *in vivo* foi utilizada a administração de BrdU que é um análogo da timidina e, portanto é incorporado ao DNA das células que proliferaram. Para tal, o BrdU foi diluído em PBS na concentração de 10 mg/mL e, em seguida filtrado (<0,2 µm) para esterilização, sendo mantido aliquoteado a -20 °C até o momento do uso. Os camundongos receberam 100 µL de BrdU (1 mg), por via intraperitoneal, diariamente, durante 14 dias. Todos os camundongos foram pesados a cada três dias durante todo o período de tratamento. Após este período, os camundongos foram sacrificados para coleta do baço e preparação da suspensão celular. Assim, após a lise das hemácias as células foram plaqueadas em placas de 6 poços e mantidas por 2h em estufa (37 °C, 5 % CO₂ e atmosfera umidificada) para separar as populações de acordo com a aderência ao plástico. Após este período as populações de células não-aderentes foram cuidadosamente recuperadas, centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI completo. Em seguida, as células não-aderentes foram ajustadas para 1 x 10⁶ céls, transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugadas a 500 g/5 min, ressuspensas em leite desnatado 5 % em PBS a 4 °C/30 min para bloqueio de ligações inespecíficas. Depois se procedeu a lavagem das células com 1 mL de PBS, sendo estas ressuspensas num volume de 50 µL de PBS e acrescidas dos respectivos anticorpos para marcação das moléculas de superfície de células NK (CD3⁻ NK1.1⁺), sendo mantidas em incubação por 30 min a 4 °C. Ao término da marcação das moléculas de superfície iniciou-se a fixação e permeabilização celular conforme o protocolo proposto no kit BD Cytofix/Cytoperm™ Plus. Assim, as células foram acrescidas de 1 mL de Perm Wash, centrifugadas a 500 g/5 min e ressuspensas em 100 µL de Cytofix/Cytoperm, sendo mantidas a 4 °C por 30 min. Após esta etapa, as células foram novamente acrescidas de 1 mL de Perm Wash, centrifugadas a 500 g/5 min e ressuspensas em 100 µL de DMSO e PBS (1:9), sendo

mantidas a 4 °C por 10 min. Em seguida, procedeu-se mais uma lavagem com 1 mL de Perm Wash a 500 g/5 min e as células foram ressuspensas em 100 µL de Cytofix/Cytoperm, sendo mantidas a temperatura ambiente por mais 5 min, quando então foram lavadas mais uma vez com 1 mL de Perm Wash a 500 g/5 min. Após esta etapa, iniciou-se a marcação do BrdU, então as células foram ressuspensas em 20 µL de anti-BrdU com DNase, agitadas e mantidas a temperatura ambiente por 30 min. Ao término do período de incubação as células foram lavadas com 1 mL de PBS e ressuspensas em 300 µL de PBS para aquisição dos eventos por citometria de fluxo na velocidade máxima de 400 eventos por segundo.

3.12 Quantificação das células NK esplênicas

Para quantificação de células NK esplênicas (CD3⁻ NK1.1⁺), utilizou-se as células não-aderentes, separadas conforme descrito anteriormente no item 3.10.1, as quais foram ajustadas para 1×10^6 células e então incubadas com anti-CD3 e anti-NK1.1 durante 30 min a 4 °C no escuro. As células foram lavadas e ressuspensas em PBS para aquisição em citômetro de fluxo. Foram adquiridos 15000 eventos de cada amostra e os resultados foram expressos como porcentagem. Os dados foram analisados com o programa FlowJo 7.2.2® (Tree Star Inc, Ashland, KY).

3.13 Avaliação da citotoxicidade das células NK

Para avaliar a atividade das células NK esplênicas (células efetoras) foi utilizada a linhagem de linfoma murino YAC-1 como alvo, segundo descrito por Marcusson-Stahl e Cederbrant (2003) com algumas modificações. Resumidamente, após a separação das células não-aderentes conforme descrito anteriormente no item 3.10.1 foram feitas culturas em triplicata com 5×10^5 células efetoras e 5×10^3 células alvo marcadas com

CFSE (proporção 100:1) durante 4 horas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5 % CO₂. A morte espontânea foi determinada pela incubação de células YAC-1 somente em meio RPMI completo. Por fim, adicionou-se iodeto de propídeo para aquisição dos dados por citômetro de fluxo. Foram coletados 5000 eventos alvo de cada amostra. Os dados foram analisados pelo programa FlowJo 7.2.2®. A citotoxicidade das células NK foi expressa como:

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = \frac{\text{células alvo mortas (\%)} - \text{morte espontânea das células alvo (\%)}}{100 - \text{morte espontânea das células alvo (\%)}} \times 100$$

3.14 Imunoestimulação com selênio

Com base no estudo de Albers et al. (2003) foi utilizado selenito de sódio Na₂SeO₃ (Synth®) na dose 1,3 mg/kg de peso vivo (1,3 ppm), o qual será descrito ao longo do texto apenas como selênio. É importante ressaltar que os camundongos utilizados nos experimentos não eram deficientes deste elemento mineral uma vez que após o desmame sempre foram alimentados com ração apropriada para roedores a Ração Nuvilab CR1 (Nuvital®), que contem em sua composição Se 0,05 ppm. Para os experimentos *in vitro* foi utilizado o selênio na concentração de 0,1 mM.

3.15 Teste de viabilidade celular MTT

O MTT foi utilizado para verificar a viabilidade celular das células não-aderentes esplênicas (separação destas células está descrita no item 3.10.1) após o tratamento *in vitro* e 24 h de incubação (37 °C, 5 % CO₂ em atmosfera umidificada). Para isto, foram preparadas culturas em quadruplicata de cada tratamento *in vitro* com 5 x 10⁵ células/poço e após 21 h de incubação foram adicionados 10 µL/poço da solução de MTT (5 mg/mL MTT em PBS). Ao final do período de incubação foram adicionados 100 µL/poço de

isopropanol acidificado (0,04 M HCl em isopropanol absoluto) para dissolver os cristais de formazan e a placa mantida por 1 hora no escuro em temperatura ambiente. A absorbância foi mensurada a 570 nm em leitor de placa (PowerWave HT, BioTek®).

3.16 Análise da ativação de caspase-3

Para detecção de apoptose adicionou-se o substrato da caspase-3 NucView™ 488 (segundo as normas do fabricante) e as células foram incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Após esta incubação foram acrescentados 300 µL de PBS e 20000 eventos foram adquiridos por amostra pelo citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos em porcentagem e foram analisados pelo programa FlowJo 7.2.2®.

3.17 Separação magnética de células NK por depleção

Para separação magnética das células NK por depleção preparou-se suspensões dos esplenócitos de cada camundongo que após a lise das hemácias foram plaqueadas em placa de 6 poços e mantidas por 2 horas em estufa (37 °C, 5 % CO₂ e atmosfera umidificada) para separar as populações de acordo com a aderência ao plástico. Após este período as populações de células não-aderentes foram cuidadosamente recuperadas, centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI completo e filtradas para eliminação de grumos. Em seguida, estas células foram ajustadas para 2×10^7 e procedeu-se a separação magnética utilizando-se o protocolo proposto no manual do NK Cell Isolation Kit mouse (Miltenyi Biotec). Para tal, foi preparado uma solução tampão contendo PBS, 0,5 % SFB e 2 mM EDTA com pH 7,2, que foi degaseificado a temperatura ambiente por 15 min em sonicador e, em seguida, filtrado ($< 2 \mu\text{m}$) e mantido a 4 °C. As células foram então centrifugadas a 300 g/10 min e o sobrenadante pipetado completamente. A seguir as células foram ressuspensas em 80 µL do tampão e foram adicionados 20 µL do NK Cell

Biotin-Antibody Cocktail que vai marcar os outros tipos celulares e não as células NK, sendo misturadas bem e incubadas 4 °C por 10 min. Após este período, foram adicionados 60 µL do tampão e 40 µL de Anti-Biotin MicroBeads, misturou-se bem e manteve-se novamente a 4 °C por mais 15 min. Após o período de incubação as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de tampão e centrifugadas a 300 g/10 min, sendo o sobrenadante pipetado completamente. Por fim, as células foram ressuspensas em 500 µL de tampão.

Foram utilizadas as colunas de separação LS indicadas para separar até 2×10^8 células marcadas. Assim, para preparação das colunas estas foram colocadas no QuadroMacs™ (campo magnético) e adicionadas de 3 mL de tampão, que foram descartados após a completa passagem pela coluna. Após esta etapa, foram adicionadas as suspensões de células (500 µL) e após a completa passagem pela coluna acrescentou-se mais 3 mL de tampão, sendo coletadas as células não marcadas que não ficam retidas a coluna. Acrescentou-se 3 mL de tampão mais duas vezes coletando-se todo esse tampão contendo as células não marcadas, conforme demonstrado na figura 3 reproduzida do manual MACS® Separators user manual (Miltenyi Biotec). Esse tampão enriquecido de células NK foi centrifugado e preparado para extração de RNA total conforme mencionado no item a seguir.

Figura 3 - Separação magnética por depleção. Na primeira etapa é mostrada a marcação das células que não são de interesse por anticorpos primários ligados a biotina e a detecção destes por anticorpos secundários anti-biotina que estão ligados a beads. Na segunda etapa é mostrada a passagem livre das células de interesse que não foram marcadas com anticorpos e a retenção das outras células na coluna. Ilustração reproduzida a partir do MACS® Separators user manual (Miltenyi Biotec)

3.18 Extração do RNA Total das células NK

Imediatamente após a separação magnética das células NK esplênicas iniciou-se o processo de extração do RNA total. A extração do RNA foi feita de acordo com o protocolo proposto no RNAspin Mini kit conforme ilustrado na figura 4 reproduzida do manual RNAspin Mini RNA Isolation. Para avaliação da qualidade da RNA foi utilizado o RNA 6000 Nano chip (Agilent Technologies) e a leitura foi feita no Agilent 2100 Bioanalyser.² Após o isolamento o RNA total de cada camundongo foi mantido a -80 °C até o momento do uso.

² Este procedimento foi realizado no Laboratório de Genômica Pediátrica no Depto. de Pediatria da FMUSP com a colaboração da pesquisadora Dra. Patrícia Locosque Ramos e da pós-graduanda Beatriz Corradini.

Figura 4 - Etapas de extração de RNA total a partir da suspensão de 5×10^6 células e a utilização do kit RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare). Ilustração reproduzida a partir do manual deste kit

3.19 Avaliação da expressão gênica das células NK pela técnica de microarranjo de DNA

Foi utilizada a técnica de microarranjo com uma cor de acordo com o protocolo do kit One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Agilent Technologies)

conforme ilustrado na figura 5 reproduzida do manual deste kit.³ A primeira etapa consistiu na construção do cDNA. Para a síntese do cDNA, foi adicionada a cada amostra de RNA total uma alíquota do mix contendo os RNAm controles da reação (controles internos virais com cauda poli A, Agilent One-Color Spike-Mix, que contem uma mistura de 10 transcritos poliadenilados sintetizados *in vitro* derivados do gene E1A de adenovírus). Assim, foram acrescentados 2 µL do mix contendo os controles da reação e 1,2 µL de T7 promoter primer a 200 ng do RNA total e completados com água livre de nucleases até o volume 11,5 µL. Esta mistura foi incubada durante 10 minutos a 65 °C e, em seguida, mergulhada em banho de gelo por 5 minutos. Após este período foi acrescentado 8,5 µL do cDNA Master Mix (composta de 4 µL do 5X First Strand Buffer, 2 µL de 0,1 M DTT, 1 µL de 10 mM dNTP mix, 1 µL de MMLV-RT e 0,5 µL de RNaseInhibitor) a cada amostra e manteve-se a 40 °C por 2 horas. Em seguida, as amostras foram colocadas em banho-maria a 65 °C por 15 minutos e depois mantidas a -20 °C até a realização da próxima etapa.

3.19.1 Síntese do cRNA por transcrição in vitro

Nesta etapa foi utilizado todo cDNA obtido na reação anterior. Assim, para cada amostra foram acrescentados 60 µL do Transcription Master Mix que contem 15,3 µL de água livre de nucleases, 20 µL do tampão de transcrição 4X, 6 µL de 0,1 M DTT, 8 µL NTP mix, 6,4 µL de 50 % PEG, 0,5 µL RNaseInhibitor, 0,6 µL de pirofosfatase inorgânica, 0,8 µL de T7 RNA Polymerase e 2,4 µL de Cyanine 3-CTP e, em seguida, as amostras foram mantidas em banho-maria a 40 °C por 2 horas resultando no cRNA amplificado e marcado com Cy-3. Para purificação deste cRNA foi utilizado o RNAspin Mini kit segundo as normas do fabricante. Para quantificar a incorporação de Cy-3 ao

³ Este experimento foi feito no Laboratório de Oncologia Experimental do Depto. de Patologia da FMVZ-USP.

cRNA utilizou-se o espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare).⁴ Após esta etapa o cRNA foi mantido a -80 °C até o momento da hibridização.

Figura 5 - Etapas do protocolo de microarranjo de DNA utilizando o kit One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Agilent Technologies). Ilustração reproduzida a partir do manual deste kit

⁴ Este aparelho foi gentilmente emprestado pela Carolina Aoki representante da GE Healthcare.

3.19.2 Hibridização

Foi utilizado o Whole Mouse Genome Microarray Kit 4x44K (Agilent Technologies) que contem cinco lâminas com 4 arranjos de 44000 genes em cada para detecção do genoma completo de camundongo. Antes da hibridização fez-se a fragmentação do cRNA. Para tal, as amostras foram preparadas com 1,65 µg do cRNA amplificado e marcado com Cy-3, 11 µL do agente de bloqueio 10X, água livre de nucleases para ajustar o volume em 52,8 µL e, por fim, 2,2 µL do tampão de fragmentação 25X, sendo incubadas a 60 °C por 30 minutos. Para interromper a reação de fragmentação foram acrescentados a cada amostra 55 µL do 2x GE tampão de hibridização HI-RPM em 55 µL da mistura de cRNA fragmentado. Desta mistura utilizou-se 100 µL que foram imediatamente pipetados sobre cada arranjo contendo os 44000 genes. Para que ocorresse a hibridização as lâminas foram seladas com outra lâmina e colocadas em forno de hibridização a 65 °C com agitação circular a 10 rpm por 17 horas.

3.19.3 Lavagem pós-hibridização

As lâminas ainda seladas (“sanduíche”) foram mergulhadas no tampão de lavagem 1 em temperatura ambiente e foram desagrupadas. Em seguida, as lâminas contendo os arranjos foram transferidas para outro banho contendo o tampão de lavagem 1 em temperatura ambiente e foram mantidas sob agitação por 1 min. Após esta lavagem as lâminas foram transferidas para um banho a 37 °C com o tampão de lavagem 2 e foram mantidas sob agitação por 1 min, sendo imediatamente transferidas para um banho de acetronitrila sob agitação por 10 segundos em temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram mergulhadas por 30 segundos no tampão de estabilização e secagem, sendo retiradas completamente secas. Até o momento do escaneamento as lâminas foram mantidas protegidas da luz e em dessecador a temperatura ambiente.

3.19.4 Escaneamento

As lâminas foram escaneadas no Agilent Microarray Scanner e os dados extraídos com o programa Agilent Feature Extraction versão 9.5.3.1.⁵

3.20 Avaliação da expressão intracelular de metalotioneína em células NK por citometria de fluxo

A primeira etapa foi a separação das células não-aderentes esplênicas de cada camundongo conforme descrito anteriormente no item 3.10.1. Em seguida, as células foram ajustadas para 1×10^6 células em 50 μ L de PBS contendo os anticorpos anti-CD3 e anti-NK1.1 e foram incubadas a 4 °C durante 30 min protegidas da luz. Após a marcação extracelular das células NK (CD3⁻ NK1.1⁺) procedeu-se a fixação e permeabilização celular conforme recomendações do fabricante do BD Cytofix/Cytoperm™ Plus. Assim, as células foram ressuspensas em 100 μ L de Cytofix/Cytoperm e foram incubadas 4 °C durante 20 min protegidas da luz. Em seguida, as células foram lavadas com 2 mL de Perm Wash e ressuspensas em 50 μ L de Perm Wash contendo o anticorpo primário anti-Mt e foram incubadas a 4 °C durante 30 min protegidas da luz. Após a marcação com o anticorpo primário procedeu-se novamente a lavagem das células com 2 mL de Perm Wash e, em seguida, iniciou-se a marcação com o anticorpo secundário marcado em FITC, sendo as células incubadas novamente a 4 °C durante 30 min protegidas da luz. Ao final da marcação intracelular, as células foram lavadas com Perm Wash e ressuspensas em 300 μ L de PBS para aquisição de 70000 eventos pelo citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência e foram analisados pelo programa FlowJo 7.2.2®.

⁵ Este procedimento foi feito no Laboratório de Genômica Pediátrica no Depto. de Pediatria da FMUSP com a colaboração da pesquisadora Dra. Patrícia Locosque Ramos.

3.21 Detecção e quantificação de Zn^{2+} livre intracelular por citometria de fluxo

Para quantificação do Zn^{2+} livre no espaço intracelular de células NK esplênicas ($CD3^-$ $NK1.1^+$), utilizou-se o protocolo adaptado de Haase et al. (2006), conforme descrito a seguir. A primeira etapa foi a separação das células não-aderentes esplênicas de cada camundongo conforme descrito anteriormente no item 3.10.1. Em seguida, as células foram ajustadas e plaqueadas 1×10^6 células em 90 μ L de meio RPMI completo, de cada amostra, em placas de 96 poços de fundo em U. Após o plaqueamento foram adicionados 10 μ L por poço da solução de FluoZinTM-3 e Pluronic (1:1) em meio RPMI na concentração final 1 μ M/mL de FluoZinTM-3 e as células mantidas em estufa por 30 min (37 °C, 5 % CO_2 e atmosfera umidificada). Depois desta incubação as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 50 μ L de PBS contendo os anticorpos anti-CD3 e anti-NK1.1 e incubadas por mais 30 min a temperatura ambiente e protegidas da luz. Ao final deste período, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 300 μ L de PBS para aquisição de 70000 eventos pelo citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência e foram analisados pelo programa FlowJo 7.2.2®.

3.22 Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).⁶ Para verificar a homocedasticidade dos dados utilizou-se o teste de Bartlett. Para dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA seguida do teste de Dunnett para comparação de 3 ou mais grupos e teste T para 2 grupos. Para dados não paramétricos e não homocedásticos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn quando comparados 3 ou mais grupos e o teste de Mann-Whitney para 2 grupos. Os dados foram expressos com média $\pm$ desvio

⁶ Todas as análises dos dados de expressão gênica foram feitas com a colaboração do Prof. Fabrício Martins Lopes (Universidade Tecnológica do Paraná) e doutorando no IME-USP.

padrão (SD) ou mediana (mínimo - máximo) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$.

Delíneamento Experimental e Resultados

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4.1 Quantificação do ptaquilosídeo nos brotos de *P. aquilinum*

Foram utilizadas oito amostras de brotos de *P. aquilinum* para quantificação do ptaquilosídeo, conforme descrito no item 3.4.

4.1.1 Resultados

Obteve-se a média de 178,5 µg de ptaquilosídeo por grama de broto de *P. aquilinum* (Tabela 1).

Tabela 1 – Quantificação do ptaquilosídeo em oito amostras de brotos de *P. aquilinum*

Amostra	Pterosina B (µg/mL)	Média das repetições	Ptaquilosídeo (µg/g)
1	97,52	98,10	143,23
1'	98,69		
2	180,00	180,00	262,80
3	72,51	72,51	105,86
4	85,53	85,53	124,87
5	132,11	132,85	193,97
5'	133,60		
6	117,30	117,30	171,26
7	107,60	107,60	157,10
8	184,11	184,11	268,80
Média ± desvio-padrão			178,5 ± 60,2

4.2 Experimento 1: Avaliação das atividades de macrófagos peritoneais por medida de *burst* oxidativo e fagocitose

Foram utilizados 18 camundongos separados em 2 grupos: 10 controles e 8 experimentais. Os camundongos do grupo experimental receberam, por gavagem, durante 14 dias a dose de 30 g/kg/dia do equivalente ao broto de *P. aquilinum*, conforme descrito no item 3.4.2. Os camundongos do grupo controle receberam apenas água pelo mesmo período e via de administração. Todos os animais foram suplementados com tiamina [10 mg/L] na água durante todo o período de tratamento, conforme item 3.6. Após este período, os camundongos foram sacrificados e o lavado peritoneal coletado, a partir do qual foram realizadas as técnicas de *burst* oxidativo e fagocitose, conforme descrito no item 3.9.

4.2.1 Resultados

Ao analisar os resultados de *burst* oxidativo e fagocitose dos macrófagos peritoneais dos camundongos tratados com a planta pôde-se verificar que esta não interferiu nas atividades destas células (Tabela 2).

Tabela 2 – Porcentagem e intensidade de fagocitose e intensidade de *burst* oxidativo basal e induzido de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com *P. aquilinum* (30 g/kg/dia) e suplementados com tiamina [10 mg/L] por 14 dias

	Fagocitose			<i>Burst</i> oxidativo	
	% de macrófagos	intensidade	basal	induzido pela fagocitose	induzido por PMA
Co	77,5	64,9 ± 4,7	239,3 ± 17,9	259,1 ± 27,4	428,7 ± 112,3
P	75,2	64,3 ± 9,4	228,3 ± 11,1	246,1 ± 32,4	412,3 ± 166,2

Os dados são apresentados como mediana da % do nº células ou média ± desvio padrão da média geométrica da intensidade de fluorescência

4.3 Experimento 2: Avaliação da capacidade da imunoestimulação com selênio reverter atrofia da polpa branca causada pela administração de *P. aquilinum*

Foram utilizados 50 camundongos separados em 5 grupos iguais: Co, P, PW, PSe e WSe. O grupo Co recebeu apenas água, por gavage, durante 30 dias; o grupo P recebeu 30 g/kg/dia de *P. aquilinum*, por gavage, durante 30 dias, conforme esquema demonstrado na figura 6A. O grupo PW recebeu 30 g/kg/dia de *P. aquilinum*, por gavage, durante 30 dias e apenas água, por gavage, nos 30 dias subseqüentes; o grupo PSe recebeu 30 g/kg/dia de *P. aquilinum*, por gavage, durante 30 dias e foi imunoestimulado com selênio 1,3 mg/kg, por gavage, nos 30 dias subseqüentes; o grupo WSe recebeu água, por gavage, durante 30 dias e foi imunoestimulado com selênio 1,3 mg/kg, por gavage, nos 30 dias subseqüentes, conforme ilustrado na figura 6B e descrito no item 3.14. Todos os camundongos foram suplementados com tiamina [10 mg/L] na água durante os 30 primeiros dias de tratamento, conforme item 3.6. Durante todo o período experimental foram feitas avaliação da variação de peso a cada três dias para ajuste das doses de planta ou Se, consumo semanal de ração e água. Ao final do período de tratamento os camundongos foram sacrificados para coleta de órgãos e avaliação morfométrica do baço, conforme descrito nos itens 3.7 e 3.7.1, respectivamente.

Figura 6 – Esquema de tratamento dos camundongos. **A** – tratamento com *P. aquilinum* (30 g/kg/dia), por gavage, e suplementação com tiamina [10 mg/L] na água durante 30 dias. **B** - posterior imunoestimulação com selênio (1,3 mg/kg/dia), por gavage, durante 30 dias

4.3.1 Resultados

Pôde-se observar que a alteração do período de tratamento com a planta de 14 para 30 dias não influenciou na variação de peso e consumo de ração e água, assim como, a administração de selênio (Figura 7). Quanto à análise morfométrica da polpa branca de baço pôde-se observar que a administração da *P. aquilinum* reduz a polpa branca quando comparado ao grupo controle ($p=0,0284$ teste Kruskal-Walis; $p<0,05$ Co *vs* P pós-teste Dunn) e que está se mantém reduzida mesmo após um período de 30 dias sem administração da planta (PW). Além disso, demonstrou-se que a imunoestimulação com selênio foi capaz de reverter completamente a atrofia da polpa branca quando comparado ao grupo tratado apenas com a planta ($p=0,0284$ teste Kruskal-Walis; $p<0,05$ P *vs* PSe pós-teste Dunn) e que administração de selênio isoladamente não causou nenhum efeito tóxico (Figuras 8 e 9). Com relação aos demais órgãos coletados não foram observadas alterações.

Figura 7 – Avaliação da variação de peso e consumos ração e água no período total de tratamento. **A** – Consumo total de água no período de 30 dias de tratamento dos grupos Co e P. **B** - Consumo total de água no período de 60 dias de tratamento dos grupos PW, PSe e CSe. **C** - Consumo total de ração no período de 30 dias de tratamento dos grupos Co e P. **D** - Consumo total de ração no período de 60 dias de tratamento dos grupos PW, PSe e CSe. **E** - Variação total de peso no período de 30 dias de tratamento dos grupos Co e P. **F** - Variação total de peso no período de 30 dias de tratamento dos grupos PW, PSe e CSe. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (n=10)

Figura 8 – Porcentagem de polpa branca de baço de camundongos tratados com *P. aquilinum* (30 g/kg/dia), por gavagem, durante 30 dias e posteriormente imunoestimulados com Se (1,3 mg/kg/dia), por gavagem, durante 30 dias. A administração de *P. aquilinum* diminuiu a polpa branca, a qual foi completamente recuperada pela administração de selênio (* $p < 0,05$ pós-teste Dunn). Os dados são apresentados como mediana (mín. - máx.) (n=10)

Figura 9 - Baço: **Co** camundongo controle, **P** camundongo tratado com *P. aquilinum* (30 g/kg/dia) durante 30 dias, **PW** camundongo tratado com *P. aquilinum* (30 g/kg/dia) durante 30 dias e apenas água, por gavagem, nos 30 dias subsequentes, **PSe** camundongo tratado com *P. aquilinum* (30 g/kg/dia) durante 30 dias e imunoestimulados com selênio 1,3 mg/kg, por gavagem, nos 30 dias subsequentes, **WSe** camundongo tratado com apenas com água durante 30 dias e imunoestimulados com selênio 1,3 mg/kg, por gavagem, nos 30 dias subsequentes. Observa-se redução da polpa branca do baço, nos regiões indicadas pelas setas pretas e a recuperação completa da área de polpa branca na região indicada pela seta branca. H&E. Barra = 100 µm

4.4 Experimento 3: Avaliação dos efeitos da imunoestimulação com selênio no hemograma, medula óssea, peso relativo de baço e relação CD4/CD8 de camundongos tratados com *P. aquilinum*

Foram utilizados 25 camundongos separados em cinco grupos iguais: Co, P, PW, PSe e WSe. O esquema de tratamento foi exatamente o mesmo descrito anteriormente para o experimento 2 e está ilustrado na figura 6A-B. Ao final do período de tratamento todos os camundongos foram anestesiados com xilazina e quetamina para, em seguida, ser feita punção cardíaca para coleta de sangue em seringa com EDTA e posteriormente proceder-se as coletas de baço e fêmur. O hemograma foi realizado em aparelho automatizado (Vet ABC™ Animal Blood Counter, Horiba ABX Diagnostics). Para a avaliação da celularidade de medula óssea fez-se a lavagem do fêmur coletado com 5 mL de meio RPMI gelado, após o corte das epífises, e contagem em câmara de Neubauer (diluição 1:10 em azul de tripan). Para a avaliação da relação CD4/CD8 esplênica macerou-se o baço logo após a pesagem em meio RPMI enriquecido com 10 % SFB estéril. As células foram diluídas em azul de tripan (diluição 1:10) e contadas em câmara de Neubauer, sendo ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/tubo em um volume de 100 μ L. Para marcação das moléculas de superfície foram empregados os seguintes anticorpos: anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8. As amostras foram incubadas durante 1 hora a 4 °C com os diferentes anticorpos, centrifugadas e ressuspensas em 300 μ L de PBS para aquisição de 10000 eventos pelo citômetro de fluxo (FACScan Becton Dycson®).

4.4.1 Resultados

O hemograma não revelou diferenças entre os grupos conforme se observa nas tabelas 3 e 4. Da mesma maneira, a celularidade de medula óssea e o peso relativo de baço mostraram-se iguais entre todos os grupos (Tabelas 3 e 4). A quantificação dos linfócitos T *helper* (CD3⁺ e CD4⁺) e linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) foi feita pelo programa FlowJo

7.2.2® e a proporção destas células no baço dos camundongos de todos os grupos também mostrou-se inalterada (Tabela 5).

Tabela 3 – Dados de ganho de peso, peso relativo de baço, celularidade de medula óssea e contagem de eritrócitos e leucócitos no sangue periférico de camundongos tratados durante 30 dias com 30 g/kg de *P. aquilinum*

Grupos	Ganho de Peso (g)	Peso relativo baço (g/100 g p.v.)	Celularidade medulla óssea x 10 ⁷	Eritrócitos (10 ⁶ céls/mm ³)	Leucócitos (10 ³ céls/mm ³)
Co	0,83±0,61	0,26±0,05	4,4±0,6	9,3±0,5	5,5±1,0
P	1,29±0,92	0,29±0,04	5,4±0,7	9,2±0,5	5,9±1,3

Dados estão apresentados como media ± desvio-padrão (n=5)

Tabela 4 – Dados de ganho de peso, peso relativo de baço, celularidade de medula óssea e contagem de eritrócitos e leucócitos no sangue periférico de camundongos tratados durante 30 dias com 30 g/kg de *P. aquilinum* e posteriormente imunoestimulados com 1,3 mg/kg de selênio durante 30 dias

Grupos	Ganho de Peso (g)	Peso relativo baço (g/100 g p.v.)	Celularidade medulla óssea x 10 ⁷	Eritrócitos (10 ⁶ céls/mm ³)	Leucócitos (10 ³ céls/mm ³)
PW	1,96±1,70	0,29±0,02	5,1±1,4	9,7±0,3	6,5±1,2
PSe	2,17±1,07	0,28±0,04	4,6±0,8	9,7±0,2	6,9±1,4
WSe	1,71±0,95	0,28±0,02	4,2±0,3	9,4±0,4	6,5±1,9

Dados estão apresentados como media ± desvio-padrão (n=5)

Tabela 5 – Porcentagem de linfócitos T *helper* (CD3⁺ e CD4⁺) e linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) e proporção entre estes linfócitos no baço de camundongos tratados durante 30 dias com 30 g/kg de *P. aquilinum*

Grupos	Linfócitos T <i>helper</i>	Linfócitos T citotóxicos	Proporção CD4/CD8
Co	14,07 (12,24 – 17,12)	10,62 (8,94 – 13,78)	1,33±0,24
P	16,09 (13,68 – 16,47)	10,90 (9,99 – 11,89)	1,42±0,22

Dados estão apresentados como mediana (mín. – máx.) da % do n° de linfócitos e media ± desvio-padrão da proporção (n=5)

Tabela 6 – Porcentagem de linfócitos T *helper* (CD3⁺ e CD4⁺) e linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) e proporção entre estes linfócitos no baço de camundongos tratados durante 30 dias com 30 g/kg de *P. aquilinum* e posteriormente imunoestimulados com 1,3 mg/kg de selênio durante 30 dias

Grupos	Linfócitos T <i>helper</i>	Linfócitos T citotóxicos	Proporção CD4/CD8
PW	23,31 (18,60 – 25,56)	17,70 (10,43 - 19,69)	1,39±0,26
PSe	21,63 (18,17 – 22,44)	17,00 (15,81 - 17,94)	1,26±0,15
WSe	21,12 (16,73 – 22,00)	17,81 (13,51 – 19,10)	1,18±0,07

Dados estão apresentados como mediana (mín. – máx.) da % do n° de linfócitos e media ± desvio-padrão da proporção (n=5)

4.5 Experimento 4: Avaliação do efeito da *P. aquilinum* na indução da resposta imune celular pela verificação do fenótipo das células DC e NK e produção de citocinas

Foram utilizados 50 camundongos separados em 5 grupos iguais: Co, P, PW, PSe e WSe. O esquema de tratamento foi exatamente o mesmo descrito anteriormente para o experimento 2, com exceção de que ao final do período de tratamento os camundongos foram imunizados com anatoxina tetânica conforme descrito no item 3.10. Sete dias após a imunização, os camundongos foram sacrificados para coleta dos baços e indução da resposta imune celular *ex vivo* para avaliação das células DC e NK durante a ativação de linfócitos Th1 conforme descrito no item 3.10.1.

4.5.1 Resultados

Pôde-se observar neste experimento que a administração da *P. aquilinum* não alterou a quantidade das células DC presentes no baço dos camundongos tratados, assim como, não interferiu nos seus processos de maturação (CD11c⁺ CD83⁺) e polarização para indução da resposta tipo Th1 (CD11c⁺ CD83⁺ IL12⁺) (Tabela 7). Da mesma maneira, não se observou nenhuma diferença nestes parâmetros quando da interrupção do tratamento com a planta (grupo PW) ou com a imunoestimulação por selênio (grupos PSe e CSe). Por outro lado, observou-se aumento na porcentagem de células DC regulatórias (CD11c⁺ CD83⁺ IL10⁺) no grupo CSe ($p = 0,0087$ teste Kruskal-Wallis; $p < 0,05$ CSe x PW pós-teste Dunn) (Tabela 8).

Tabela 7 - Porcentagem de células DC maduras (CD11c⁺ CD83⁺) e polarizadas para induzir resposta tipo Th1 (IL12⁺) ou regulatórias (IL10⁺) no baço de camundongos tratados com *P. aquilinum* (30 g/kg/dia) e suplementados com tiamina [10 mg/L] na água por 30 dias, previamente imunizados com anatoxina tetânica (AT) e desafiados *ex vivo* com o mesmo antígeno

Grupos	% CD11c ⁺ CD83 ⁺	% DC IL12 ⁺	% DC IL10 ⁺
Co	10,62 (5,81 - 12,23)	9,75 (5,00 - 11,36)	0,13 (0,07 - 0,17)
P	9,40 (8,45 - 11,03)	8,73 (7,99 - 10,41)	0,13 (0,04 - 0,16)

Dados estão expressos como mediana (mín. – máx.) (n=10)

Tabela 8 - Porcentagem de células DC maduras (CD11c⁺ CD83⁺) e polarizadas para induzir resposta tipo Th1 (IL12⁺) ou regulatórias (IL10⁺) no baço de camundongos tratados com *P. aquilinum* (30 g/kg/dia) e suplementados com tiamina [10 mg/L] na água durante 30 dias e imunoestimulados com selênio por mais 30 dias, previamente imunizados com anatoxina tetânica (AT) e desafiados *ex vivo* com o mesmo antígeno

Grupos	% CD11c ⁺ CD83 ⁺	% DC IL12 ⁺	% DC IL10 ⁺
PW	13,10 (11,36 - 14,89)	12,29 (10,83 - 14,18)	1,23 (0,71 - 1,53)
PSe	12,24 (10,94 - 14,04)	11,68 (10,49 - 13,20)	1,44 (0,98 - 1,57)
CSe	12,83 (10,73 - 13,40)	12,16 (10,24 - 12,73)	1,71 (1,34 - 2,34)*

Dados estão expressos como mediana (mín. – máx.) (n=10). * p<0,05 CSe *vs* PW pós-teste Dunn

Em relação às células NK, pôde-se observar que o tratamento com a *P. aquilinum* diminuiu a porcentagem destas células (NK1.1⁺ NKG2D⁺) presentes no baço dos camundongos tratados (p = 0,029 Co *vs* P two-tailed teste de Mann Whitney) (Figura 10), assim como, reduziu a porcentagem de células produzindo IFN γ (NK1.1⁺ NKG2D⁺ IFN γ ⁺) (p = 0,049 Co *vs* P two-tailed teste de Mann Whitney) (Figura 11). Por outro lado, observou-se que estes parâmetros voltaram ao normal quando da interrupção do tratamento com a planta (grupo PW) e não foram alterados pela imunoestimulação com selênio (grupos PSe e CSe) (Tabela 9).

Figura 10 - Quantificação de células NK (NK1.1⁺ NKG2D⁺) esplênicas de camundongos tratados com *P. aquilinum* (30 g/kg/dia) e suplementados com tiamina [10 mg/L] na água durante 30 dias, previamente imunizados com anatoxina tetânica (AT) e desafiados *ex vivo* com o mesmo antígeno. A administração de *P. aquilinum* diminuiu a porcentagem de células NK (*p= 0,029 Co *vs* P two-tailed teste de Mann Whitney). Dados estão expressos como mediana (mín. – máx.) (n=10)

Figura 11 - Quantificação de células NK (NK1.1⁺ NKG2D⁺) esplênicas produzindo IFN γ ⁺, de camundongos tratados com *P. aquilinum* (30 g/kg/dia) e suplementados com tiamina [10 mg/L] na água durante 30 dias, previamente imunizados com anatoxina tetânica (AT) e desafiados *ex vivo* com o mesmo antígeno. A administração de *P. aquilinum* diminuiu a porcentagem de células NK produzindo IFN γ durante a indução de resposta imune celular (*p= 0,049 Co *vs* P two-tailed teste de Mann Whitney). Dados estão expressos como mediana (mín. – máx.) (n=10)

Tabela 9 – Porcentagem de células NK ativadas (IFN γ ⁺) do baço de camundongos tratados com *P. aquilinum* (30 g/kg/dia) e suplementados com tiamina [10 mg/L] na água durante 30 dias e imunoestimulados com selênio por mais 30 dias, previamente imunizados com anatoxina tetânica (AT) e desafiados *ex vivo* com o mesmo antígeno

Grupos	% NK1.1 ⁺ NKG2D ⁺	% NK IFN γ ⁺
PW	2,57 (1,57 - 3,97)	0,91 (0,68 - 1,17)
PSe	2,13 (1,18 - 3,85)	0,80 (0,49 - 1,31)
CSe	2,09 (1,40 - 5,42)	0,86 (0,55 - 1,62)

Dados estão expressos como mediana (mín. – máx.) (n=10)

4.6 Experimento 5: Avaliação dos efeitos da administração da *P. aquilinum* na expansão de linfócitos T antígeno específica

Para avaliação da expansão de linfócitos T antígeno específica foram utilizados os esplenócitos coletados dos mesmos camundongos utilizados para avaliação das células DC e NK durante a indução da resposta imune celular (experimento 4), conforme descrito no item 3.10.2.

4.6.1 Resultados

A administração da *P. aquilinum* diminuiu a expansão dos linfócitos T antígeno específica ($p=0,0039$ two-tailed teste de Mann Whitney), conforme ilustrado a seguir na figura 12. Além disto, observou-se que a proliferação destes linfócitos voltou ao normal quando da interrupção do tratamento com a planta (grupo PW) e não se alterou pela imunoestimulação com selênio (grupos PSe e CSe), da mesma maneira que foi observado na análise das células NK (Tabela 10).

Figura 12 - Avaliação da expansão de linfócitos T antígeno específica de camundongos tratados com *P. aquilinum* (30 g/kg/dia) e suplementados com tiamina [10 mg/L] na água por 30 dias, previamente imunizados com anatoxina tetânica

(AT) e desafiados *in vitro* com o mesmo antígeno. A administração de *P. aquilinum* diminuiu a expansão clonal dos linfócitos T (*p=0,0039 two-tailed teste de Mann Whitney). Dados estão expressos como média $\pm$ SD (n = 10)

Tabela 10 – Expansão de linfócitos T antígeno específica de camundongos tratados com *P. aquilinum* (30 g/kg/dia) e suplementados com tiamina [10 mg/L] na água por 30 dias e imunoestimulados com selênio por mais 30 dias, previamente imunizados com anatoxina tetânica (AT) e desafiados *ex vivo* com o mesmo antígeno

Grupos	Índice de proliferação
PW	1,18 $\pm$ 0,03
PSe	1,19 $\pm$ 0,03
CSe	1,19 $\pm$ 0,03
Dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=10)	

4.7 Experimento 6: Avaliação para verificar se a diminuição da citotoxicidade das células NK causada pela *P. aquilinum* é devido à diminuição de atividade ou à diminuição de viabilidade celular e se a imunoestimulação com selênio pode prevenir e/ou reverter esta diminuição de atividade

Para o tratamento *in vitro* foi preparado um extrato a partir dos brotos de *P. aquilinum* em RPMI (RE), conforme o item 3.5. Assim, foram preparadas suspensões de esplenócitos de oito camundongos C57BL/6 que após a lise das hemácias foram mantidas por 2 h em estufa (37 °C, 5 % CO₂ e atmosfera umidificada) para separar as populações de acordo com a aderência ao plástico. Após este período as populações de células não-aderentes foram plaqueadas em placas de 6 poços e tratadas da seguinte maneira: meio, Se 0,1 mM, RE 4 mg/mL, RE 4 mg/mL + Se 0,1 mM (co-incubação) e RE 4 mg/mL /Se 0,1 mM (incubação com RE 4 mg/mL por 1 h, centrifugação e incubação com selênio 0,1 mM por mais 1 h), os esplenócitos ficaram incubados por 1 h em estufa (37 °C, 5 % CO₂ e atmosfera umidificada), com exceção do último tratamento que totalizou 2 h de incubação. Após os tratamentos as células foram lavadas e ajustadas em meio RPMI completo para 5 x 10⁶ céls/mL para determinação da atividade citotóxica das células NK e avaliação da viabilidade celular, conforme descrito nos itens 3.13 e 3.15, respectivamente.

4.7.1 Resultados

Conforme esperado, foi observada diminuição significativa na citotoxicidade das células NK esplênicas tratadas com RE ($p=0,0401$, não tratado *vs* RE, two-tailed teste de Mann Whitney). Além disto, os resultados mostraram que a suplementação com selênio não só impediu (grupo RE+Se), mas também reverteu (grupo RE/Se) este efeito imunotóxico nas células NK esplênicas ($p=0,0003$ teste Kruskal-Wallis, $p<0,001$ RE *vs* RE+Se e $p<0,05$ RE *vs* RE/Se pós-teste Dunn) (Figura 13). O teste de MTT foi feito 24

h após o tratamento *in vitro* com RE e/ou selênio para determinar a viabilidade celular. Foi observada redução significativa na viabilidade das células co-tratadas com selênio, mas não nas células tratadas somente com RE ($p=0,049$ ANOVA de medidas repetidas, $p<0,05$ não tratado *vs* RE+Se e RE *vs* RE+Se pós-teste Tukey) (Tabela 11).

Figura 13 - Citotoxicidade (%) e viabilidade (abs) de esplenócitos tratados *in vitro* com extrato de brotos de *P. aquilinum* em RPMI (RE) e imunoestimulados ou não com selênio (Se) por 1 h. O extrato RE causou a diminuição da citotoxicidade das células NK sem causar diminuição da viabilidade destas células (* $p=0,0401$, não tratado *vs* RE, two-tailed teste de Mann Whitney). Dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n=8$)

Tabela 11 – Citotoxicidade (%) e viabilidade (abs) de esplenócitos tratados *in vitro* com extrato de brotos de *P. aquilinum* em RPMI (RE) e imunoestimulados ou não com selênio (Se) por 1 h

	Meio	RE	RE +Se	RE /Se	Se
Citotoxicidade	19,32	16,09 ^a	23,57 ^b	20,65 ^c	22,92
(%)	(14,68-24,28)	(6,70-19,43)	(20,58-26,09)	(18,26-30,58)	(19,73-25,06)
Viabilidade					
(abs)	0,044 $\pm$ 0,015	0,045 $\pm$ 0,013	0,027 $\pm$ 0,008 ^d	0,042 $\pm$ 0,011	0,030 $\pm$ 0,011

Dados em porcentagem estão expressos como mediana (mín. – máx.) e os demais como média $\pm$ desvio padrão ($n=8$). ^a $p=0,0401$ Meio *vs* RE two-tailed teste Mann Whitney; ^b $p<0,001$ RE *vs* RE +Se e ^c $p<0,05$ RE *vs* RE/Se pós-teste Dunn; ^d $p<0,05$ Meio *vs* RE +Se e RE *vs* RE +Se pós-teste Tukey

4.8 Experimento 7: Avaliar se a imunoestimulação com selênio *in vitro* induz a ativação da caspase-3

Foram preparadas suspensões de esplenócitos de cinco camundongos C57BL/6 que após a lise das hemácias foram mantidas por 2 h em estufa (37 °C, 5 % CO₂ e atmosfera umidificada) para separar as populações de acordo com a aderência ao plástico. Após este período as populações de células não-aderentes foram plaqueadas em placas de 6 poços e submetidas a dois tratamentos: meio RPMI completo ou selênio 0,1 mM. Os esplenócitos ficaram incubados por 1 h em estufa (37 °C, 5 % CO₂ e atmosfera umidificada). Após os tratamentos as células foram lavadas e ajustadas em meio RPMI completo para 5 x 10⁶ céls/mL e mantidas em estufa por mais 4 h (37 °C, 5 % CO₂ e atmosfera umidificada) antes da determinação da atividade de caspase-3, conforme descrito no item 3.16.

4.8.1 Resultados

Os resultados mostraram aumento bastante expressivo na ativação da caspase-3 nas células não aderentes esplênicas quatro horas após o tratamento *in vitro* com selênio comparado as células não tratadas (p=0,0079, two-tailed teste de Mann Whitney) (Fig. 14).

Figura 14 - Porcentagem de esplenócitos com a caspase-3 ativada após tratamento *in vitro* com selênio (Se) 0,1 mM ou apenas meio de cultura por 1 h. O tratamento com selênio induziu aumento expressivo na ativação de caspase-3 (* $p=0,0079$, two-tailed teste de Mann Whitney). Dados estão expressos como mediana (mín. – máx.) ($n=5$)

4.9 Experimento 8: Avaliação se o ptaquilosídeo, principal princípio ativo encontrado na *P. aquilinum*, é o responsável pela supressão da atividade das células NK

Foram utilizados 20 camundongos separados em 4 grupos iguais: Co, Pt, PtSe e Se. O grupo Co recebeu apenas água, por gavagem, durante 14 dias. O grupo Pt recebeu 5,3 mg/kg de ptaquilosídeo (concentração esta equivalente a obtida em 30 g/kg de brotos de *P. aquilinum* no presente estudo), por gavagem, durante 14 dias e o grupo Se recebeu 1,3 mg/kg de selênio pelo mesmo período e via de administração, conforme o item 3.14. Já o grupo PtSe foi tratado com ptaquilosídeo e selênio com as mesmas doses utilizadas nos demais grupos, com intervalo de pelo menos 20 minutos entre as administrações, pelo mesmo período e via de administração. No dia 15 do experimento todos os camundongos foram mortos para coleta do baço e preparação de suspensões de esplenócitos para posterior quantificação das células NK esplênicas e avaliação da atividade citotóxica das células NK, conforme os itens 3.12 e 3.13, respectivamente.

4.9.1 Resultados

A quantificação das células NK foi feita para determinar a porcentagem das células CD3⁻ NK1.1⁺ no baço dos camundongos tratados com ptaquilosídeo e/ou selênio. Foi observado que a porcentagem destas células permaneceu inalterada em todos os grupos comparados ao grupo controle (Tabela 12). Além disto, a citotoxicidade das células NK esplênicas foi feita para verificar se o ptaquilosídeo reduziria a atividade destas células conforme observado com o tratamento com a *P. aquilinum* no nosso estudo anterior (LATORRE et al., 2009). Os camundongos do grupo Pt mostraram redução significativa na citotoxicidade das células NK comparados aos camundongos do grupo Co ($p=0,0314$, teste Kruskal-Wallis, $p<0.05$, Co *vs* Pt, pós-teste Dunn). Além disto, observou-se que o co-tratamento com selênio impediu completamente a redução da citotoxicidade nas células NK causada pelo ptaquilosídeo (grupo PtSe) (Figura 15).

Tabela 12 – Porcentagem de células NK esplênicas (CD3⁺ NK1.1⁺) de camundongos tratados com ptaquilosídeo (5,3 mg/kg/dia) e/ou selênio (1,3 mg/kg/dia) durante 14 dias

Grupos	% CD3 ⁺ NK1.1 ⁺
Co	2,27 (1,80 – 3,71)
Pt	2,54 (2,02 – 2,66)
PtSe	2,64 (2,16 – 4,36)
Se	2,64 (2,15 – 3,87)

Dados estão expressos como mediana (mín. – máx.) (n=5)

Figura 15 - Citotoxicidade de células NK esplênicas de camundongos tratados com ptaquilosídeo (5,3 mg/kg/dia) e/ou selênio (1,3 mg/kg/dia) durante 14 dias. O tratamento com ptaquilosídeo reduziu a citotoxicidade das células NK (* $p < 0.05$, Co *vs* Pt, pós-teste Dunn) e o co-tratamento com selênio impediu completamente este efeito (grupo PtSe). Dados estão expressos como mediana e máx. (n=5)

4.10 Experimento 9: Avaliar se o tratamento com ptaquilosídeo interfere na proliferação das células NK esplênicas pela verificação da incorporação de BrdU administrado *in vivo*

Foram utilizados 20 camundongos separados em 4 grupos iguais: Co, Pt, PtSe e Se. O grupo Co recebeu apenas água, por gavagem, durante 14 dias. O grupo Pt recebeu 5,3 mg/kg de ptaquilosídeo (concentração esta equivalente a obtida em 30 g/kg de brotos de *P. aquilinum* no presente estudo), por gavagem, durante 14 dias e o grupo Se recebeu 1,3 mg/kg de selênio pelo mesmo período e via de administração, conforme o item 3.14. Já o grupo PtSe foi tratado com ptaquilosídeo e selênio com as mesmas doses utilizadas nos demais grupos, com intervalo de pelo menos 20 minutos entre as administrações, pelo mesmo período e via de administração. Além disto, todos os camundongos receberam aplicação diária de BrdU (1 mg) durante 14 dias, conforme o item 3.11. No dia 15 do experimento todos os camundongos foram mortos para coleta do baço e preparação de suspensões de esplenócitos para posterior marcação extracelular das moléculas CD3 e NK1.1 e intracelular de BrdU, conforme o item 3.11.

4.10.1 Resultados

A maioria das células NK esplênicas (CD3⁻ NK1.1⁺) incorporou BrdU ao DNA e nenhuma diferença foi observada entre os grupos (Tabela 13).

Tabela 13 – Porcentagem de células NK esplênicas, que incorporaram BrdU (CD3⁻ NK1.1⁺ BrdU⁺), de camundongos tratados com ptaquilosídeo (5,3 mg/kg/dia) e/ou selênio (1,3 mg/kg/dia) e receberam aplicações diárias de BrdU (1 mg) durante 14 dias

Grupos	% CD3⁻ NK1.1⁺ BrdU⁺
Co	85,84 (73,89 - 90,84)
Pt	90,97 (62,82 - 93,94)
PtSe	92,68 (58,19 - 96,13)
Se	89,89 (82,98 - 91,39)
Dados estão expressos como mediana (mín. – máx.) (n=5)	

4.11 Experimento 10: Avaliação da expressão gênica das células NK esplênicas de camundongos tratados com ptaquilosídeo e/ou selênio

Foram utilizados 20 camundongos separados em 4 grupos iguais: Co, Pt, PtSe e Se. O grupo Co recebeu apenas água, por gavagem, durante 14 dias. O grupo Pt recebeu 5,3 mg/kg de ptaquilosídeo (concentração esta equivalente a obtida em 30 g/kg de brotos de *P. aquilinum* no presente estudo), por gavagem, durante 14 dias e o grupo Se recebeu 1,3 mg/kg de selênio pelo mesmo período e via de administração, conforme o item 3.14. Já o grupo PtSe foi tratado com ptaquilosídeo e selênio com as mesmas doses utilizadas nos demais grupos, com intervalo de pelo menos 20 minutos entre as administrações, pelo mesmo período e via de administração. No dia 15 do experimento todos os camundongos foram mortos para coleta do baço e posterior separação magnética das células NK por depleção, conforme o item 3.17 e, então se procedeu à extração do RNA total destas células de acordo com o item 3.18. O RNA de cada camundongo foi utilizado para realização da técnica de microarranjo de DNA conforme descrito nos itens 3.19, 3.19.1, 3.19.2, 3.19.3 e 3.19.4.

4.11.1 Resultados

Ao analisar os perfis de expressão (intensidades) e verificar que estes podiam cobrir uma ampla escala de valores eles foram transformados para escala logarítmica ($\log_2$) para amenizar as grandes diferenças entre valores das expressões, preservando as pequenas variações de intensidades. Essa transformação de escala também contribuiu para amenizar o ruído inerente ao processo de aquisição dos dados. Na etapa seguinte buscou-se verificar a distribuição dos experimentos de expressão através de gráficos boxplots, os quais apresentaram cinco medidas: valores mínimos, primeiro quartil, segundo quartil ou mediana, terceiro quartil e valores máximos. Nesta etapa foram identificados que o camundongo 1 do grupo controle apresentou distribuição muito

concentrada e com presença significativa de *outliers* (Figura 16) e, portanto foi substituído pelas médias dos outros 4 camundongos disponíveis: 2, 3, 4 e 5 (Figura 17).

Figura 16 - Perfis de expressão dos camundongos do grupo controle tratados apenas com água, por gavage, durante 14 dias

Figura 17 - Perfis de expressão dos camundongos do grupo controle tratados apenas com água, por gavage, durante 14 dias. Perfil de expressão do camundongo 1 substituído pela média de expressão dos demais

O mesmo foi observado com o camundongo 4 do grupo Pt (Figura 18), sendo adotado o mesmo procedimento (Figura 19). A distribuição dos valores de expressão dos camundongos dos outros grupos (PtSe e Se) foi homogênea e, portanto mantida sem ajustes para a etapa seguinte da análise.

Figura 18 - Perfis de expressão dos camundongos do grupo Pt tratados apenas com ptaquilosídeo (5,3 mg/kg/dia), por gavagem, durante 14 dias

Figura 19 - Perfis de expressão dos camundongos do grupo Pt tratados apenas com ptaquilosídeo (5,3 mg/kg/dia), por gavagem, durante 14 dias. Perfil de expressão do camundongo 4 substituído pela média de expressão dos demais

O passo seguinte foi à identificação dos genes diferencialmente expressos. Os conjuntos testados para a identificação dos diferencialmente expressos foram os dados dos camundongos tratados com ptaquilosídeo (grupo Pt), com selênio (grupo Se) e com ambos (grupo PtSe) *versus* os dados dos camundongos controle. Nesta etapa foram adotadas as medidas de Fold change, teste T e False Discovery Rate (FDR) control, os quais são descritos em Cui e Churchill (2003). Resumidamente, o Fold change é uma das mais simples medidas para a identificação dos genes diferencialmente expressos. Esta medida avalia a razão (log) entre duas condições, para a qual se pode aplicar um cut-off para dizer se o transcrito está ou não diferencialmente expresso (DRAGHICI, 2002). O teste T é um teste estatístico de hipóteses que pode ser aplicado na detecção dos genes diferencialmente expressos (hipótese) contra uma condição controle (hipótese nula). Para esta medida foi adotado o teste T com duas amostras com objetivo de para avaliar os genes diferencialmente expressos a partir de duas condições experimentais, conforme descrito em Cui e Churchill (2003). Dado que o volume de dados (genes) é muito grande, apenas dizer que o p-valor, obtido pelo teste T, é 0,05 significa que são aceitos uma quantidade grande de erros (numero de erros = $0,05 * \text{tamanho da amostra}$). Com objetivo de guiar a análise de forma mais cautelosa é proposto o uso da medida de False Discovery Rate (FDR). A medida FDR, descrita em Storey e Tibshirani (2003), representa a proporção de falsos positivos entre todos os genes inicialmente identificados como sendo diferencialmente expressos, por exemplo, pelo teste T. Em outras palavras, pode-se dizer que ao adotar a medida FDR, os genes identificados como diferencialmente expressos tem mais chances de o serem, em geral, reduzindo o número de candidatos.

Foram observados 931 genes diferencialmente expressos quando comparado os dados dos camundongos Pt ao dos camundongos Co, sendo 841 genes pelo menos duas vezes menos expressos e 90 genes pelo menos duas vezes mais expressos que o observado no grupo Co. Ao analisar a função biológica das proteínas geradas pela expressão destes genes selecionamos apenas dois que estão super expressos no grupo Pt e acreditávamos estarem diretamente relacionados ao mecanismo de ação imunotóxico da *P. aquilinum*, os genes Mt1 e Mt2, que codificam a proteína metalotioneína (Tabela 14). A expressão destes dois genes não se mostrou alterada nos grupos PtSe e Se (dados não mostrados).

Tabela 14 – Dados de aumento da expressão dos genes Mt1 e Mt2 obtidos com as análises teste T, Fold change e False Discovery Rate (FDR) ao comparar os dados dos camundongos do grupo Pt aos do grupo Co, de camundongos tratados com ptaquilosídeo (5,3 mg/kg/dia) durante 14 dias

Probe Name	Gene Name	Gene Index	P value cut-off=0,05	Fold change threshold=2	FDR
A_51_P294979	Mt1	39526	0,002189	2,635024	0,199682
A_51_P294979	Mt1	717	0,002351	2,713588	0,198620
A_51_P294979	Mt1	12410	0,002872	2,733188	0,206988
A_51_P294979	Mt1	1741	0,002783	2,737289	0,207872
A_51_P294979	Mt1	24036	0,002808	2,745220	0,207724
A_51_P294979	Mt1	6447	0,002741	2,755313	0,208202
A_51_P294979	Mt1	28619	0,002215	2,756619	0,200842
A_51_P294979	Mt1	21548	0,002343	2,822942	0,199601
A_51_P294979	Mt1	23927	0,002028	2,853555	0,199723
A_51_P294979	Mt1	16413	0,001758	2,908220	0,192791
A_51_P246317	Mt2	13331	0,025148	3,094365	0,356016

São apresentadas todas as réplicas dos genes presentes na plataforma One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Agilent Technologies)

4.12 Experimento 11: Quantificação da proteína metalotioneína no espaço intracelular das células NK esplênicas de camundongos tratados com ptaquilosídeo e/ou selênio *in vitro*

Foram preparadas suspensões de esplenócitos de seis camundongos C57BL/6 que após a lise das hemácias foram mantidas por 2 h em estufa (37 °C, 5 % CO₂ e atmosfera umidificada) para separar as populações de acordo com a aderência ao plástico. Após este período as populações de células não-aderentes foram plaqueadas em placas de 6 poços e tratadas da seguinte maneira: Co (meio RPMI), Pt (ptaquilosídeo 4,4 µg/mL), PtSe (ptaquilosídeo 4,4 µg/mL / Se 0,1 mM, sendo as células inicialmente incubadas com ptaquilosídeo por 1 h, centrifugadas e, em seguida, incubadas com selênio 0,1 mM por mais 1 h) e Se (0,1 mM). Os esplenócitos ficaram incubados por 1 h em estufa (37 °C, 5 % CO₂ e atmosfera umidificada). Após os tratamentos as células foram lavadas e ajustadas em meio RPMI completo para 5 x 10⁶ céls/mL para posterior marcação extracelular das moléculas CD3 e NK1.1 e intracelular de Mt, conforme o item 4.10.

4.12.1 Resultados

Conforme esperado foi observado aumento da proteína Mt no espaço intracelular das células NK esplênicas (CD3⁻ NK1.1⁺) das células tratadas com ptaquilosídeo (p=0,0006 ANOVA de uma via, p<0,01 Co *vs* Pt pós-teste Dunnett), o qual foi acompanhado de aumento também na porcentagem total das células CD3⁻ NK1.1⁺ Mt⁺ esplênicas (p=0,0121 Co *vs* Pt two-tailed teste T) (Figura 20 e Tabela 15). Entretanto, observou-se aumento da presença de Mt também nas células tratadas com selênio (p=0,0006 ANOVA de uma via, p<0,01 Co *vs* Pt pós-teste Dunnett), porém com diminuição da porcentagem total destas células CD3⁻ NK1.1⁺ Mt⁺ esplênicas (p=0,0048 Co *vs* Se two-tailed teste T) (Figura 20 e Tabela 15). Ainda, se pôde verificar que o tratamento com selênio após o tratamento com ptaquilosídeo (grupo PtSe) equiparou os valores ao do grupo Co tanto em relação a presença da proteína Mt no espaço intracelular

quanto em relação a porcentagem total de células NK expressando esta proteína (Figura 20 e Tabela 15).

Figura 20 - Porcentagem de células NK esplênicas, tratadas com ptaquilosídeo (4,4 $\mu\text{g/mL}$) e/ou selênio (0,1 mM) por 1 h, expressando Mt no espaço intracelular e a intensidade de expressão desta proteína. Observa-se o aumento da intensidade de Mt nas células tratadas com ptaquilosídeo ou selênio (^a $p < 0,01$ Co *vs* Pt e Co *vs* Se pós-teste Dunnett), porém acompanhadas do aumento na porcentagem das células NK expressando Mt causado pelo tratamento com ptaquilosídeo e diminuição das mesmas pelo tratamento com selênio (^b $p = 0,0121$ Co *vs* Pt; ^c $p = 0,0048$ Co *vs* Se two-tailed teste T). Dados estão expressos como mediana ($n=6$)

Tabela 15 – Porcentagem de células NK esplênicas, tratadas com ptaquilosídeo (4,4 $\mu\text{g/mL}$) e/ou selênio (0,1 mM) por 1 h, expressando Mt no espaço intracelular e a intensidade de expressão desta proteína

Grupos	% CD3 ⁺ NK1.1 ⁺ Mt ⁺	Intensidade de fluorescência Mt
Co	2,27 (2,02 - 2,40)	33,47 $\pm$ 2,46
Pt	2,45 (2,08 - 2,85) ^b	38,25 $\pm$ 2,93 ^a
PtSe	2,27 (2,03 - 2,31)	33,31 $\pm$ 1,46
Se	2,05 (1,91 - 2,85) ^c	37,58 $\pm$ 1,32 ^a

Os dados são apresentados como mediana (mín. - máx.) da % do n° células e média $\pm$ desvio padrão da média geométrica da intensidade de fluorescência ($n=6$). ^a $p < 0,01$ Co *vs* Pt e Co *vs* Se pós-teste Dunnett; ^b $p = 0,0121$ Co *vs* Pt two-tailed teste T; ^c $p = 0,0048$ Co *vs* Se two-tailed teste T

4.13 Experimento 12: Avaliação da concentração intracelular de Zn^{2+} livre em células NK esplênicas de camundongos tratados com ptaquilosídeo e/ou selênio *in vitro*

Para avaliação do Zn^{2+} livre no espaço intracelular das células NK esplênicas foram utilizados os mesmos esplenócitos tratados para quantificação de Mt (experimento 11). Assim, após o tratamento as células foram lavadas e ajustadas para determinação do Zn^{2+} livre no espaço intracelular e, em seguida, fez-se a marcação extracelular das moléculas CD3 e NK1.1, conforme descrito nos itens 4.11 e 4.10, respectivamente.

4.13.1 Resultados

Aqui se pode observar a redução na concentração de Zn^{2+} livre no espaço intracelular das células NK esplênicas tratadas com ptaquilosídeo ($p=0,0217$ Co *vs* Pt two-tailed teste T) e o aumento deste elemento químico nas células tratadas com selênio, embora não significativo estatisticamente (Figura 21 e Tabela 16).

Figura 21 - Porcentagem de células NK esplênicas, tratadas com ptaquilosídeo (4,4 µg/mL) e/ou selênio (0,1 mM) por 1 h, contendo Zn²⁺ livre no espaço intracelular e a intensidade de concentração deste elemento. Observa-se a redução na concentração de Zn²⁺ livre no espaço intracelular das células NK tratadas com ptaquilosídeo (*p=0,0217 Co *vs* Pt two-tailed teste T) e o aumento deste elemento químico nas células tratadas com selênio, embora não significativo estatisticamente. Dados estão expressos como mediana (n=6)

Tabela 16 – Porcentagem de células NK esplênicas, tratadas com ptaquilosídeo (4,4 µg/mL) e/ou selênio (0,1 mM) por 1 h, contendo Zn²⁺ livre no espaço intracelular e a intensidade de concentração deste elemento

Grupos	% CD3 ⁺ NK1.1 ⁺ Zn ⁺	Intensidade de fluorescência Zn
Co	4,24 (3,10 - 5,07)	36,74 ± 11,57
Pt	4,71 (3,70 - 5,83)	21,24 ± 7,83*
PtSe	3,74 (3,23 - 5,06)	28,83 ± 7,05
Se	3,64 (2,82 - 4,29)	92,29 ± 76,88

Os dados são apresentados como mediana (mín. - máx.) da % do n° células e média ± desvio padrão da média geométrica da intensidade de fluorescência (n=6). *p=0,0217 Co *vs* Pt two-tailed teste T

Díscussão

5 DISCUSSÃO

No estudo anterior, o qual foi realizado como nosso projeto de mestrado, intitulado: “Estudo dos efeitos imunotóxicos da *Pteridium aquilinum*. Avaliação em camundongos”, foram avaliados os efeitos da *P. aquilinum* sobre as respostas imune inata e adaptativa dos camundongos. Entre os efeitos imunotóxicos observados pode-se destacar na avaliação histopatológica a redução da polpa branca do baço e nos dados relativos às respostas imunes, inata e adaptativa, a diminuição da citotoxicidade das células NK e a redução da resposta imune celular do tipo hipersensibilidade tardia (DTH), respectivamente.

Sabe-se que a resposta DTH, é mediada por linfócitos Th1 e tem como principais eventos três etapas: (1) a ativação de linfócitos Th1 inflamatórios antígeno-específico através de sua interação com células DC em hospedeiro previamente sensibilizado, (2) a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos linfócitos Th1 antígeno-específico e (3) o recrutamento e ativação de leucócitos não específicos ao antígeno, principalmente os macrófagos (KOBAYASHI; KANEDA; KASAMA, 2001). Com base nestas informações, e com a finalidade de verificar o porquê da diminuição da resposta imune celular do tipo tardia induzida pela *P. aquilinum*, procedeu-se à avaliação da atividade dos macrófagos como objetivo inicial na continuidade deste estudo.

Os macrófagos, também denominados de fagócitos, têm como principal função remover bactérias e parasitas do corpo (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2007). Assim, no presente estudo, procurou-se avaliar as atividades destas células através de protocolos que verificam a produção de *burst* oxidativo e a fagocitose. Contudo, nenhuma diferença foi observada entre os camundongos dos grupos controle e aqueles tratados com a planta, em ambas as avaliações, sugerindo deste modo que a diminuição da resposta imune celular causada pela *P. aquilinum* não seja devido à sua ação em macrófagos.

Por conseguinte, com intuito de elucidar o porquê da diminuição da DTH, os próximos passos deste estudo objetivaram verificar a ação da *P. aquilinum* sobre as células que sabidamente estão envolvidas na indução da resposta imune celular, ou seja, as células DC e as células NK (KAPSENBERG, 2003).

Em estudo paralelo, procurou-se avaliar se a suplementação com selênio promoveria a reversão dos efeitos imunotóxicos da planta, haja vista que este elemento mineral é essencial ao funcionamento do sistema imune e vários estudos mostraram a melhora da resposta de diferentes tipos celulares, como neutrófilos, macrófagos, células NK e linfócitos, quando da suplementação com selênio (MCKENZIE; RAFFERTY; BECKETT, 1998; HOFFMANN, 2007).

Sabe-se que a resposta DTH é mediada por linfócitos Th1 e que a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ ou *Thelper* para Th1 é estimulada por bactérias intracelulares, vírus e pela administração de antígenos (Ag) com adjuvantes fortes (ABBAS et al., 2007). Assim, células apresentadoras de antígeno (APC) presentes na periferia, como as DC, infectadas ou ativadas pela fagocitose do Ag, tornam-se maduras e migram para os órgãos linfoides secundários, aonde vão então interagir com os linfócitos T CD4⁺ pela apresentação do Ag via complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II). Após a ligação do receptor da célula T (TCR) a este complexo Ag:MHC-II e a outras moléculas co-estimulatórias a DC produz IL12, citocina esta responsável por ativar a diferenciação para Th1 (KAPSENBERG, 2003). Além disto, as células NK são atraídas para o linfonodo onde está ocorrendo o início de uma resposta imune, e aí liberam IFN γ , que atua tanto sobre as DC, aumentando a liberação de IL12, quanto diretamente sobre os linfócitos *Thelper*, favorecendo a diferenciação destes para Th1 (MARTIN-FONTECHA et al., 2004; VIVIER et al., 2008).

Portanto, no presente estudo, com a finalidade de avaliar as células DC, verificou-se a quantidade e a maturação destas durante a indução da resposta imune celular, que foi determinada pela expressão da molécula CD83 em sua superfície, sendo a presença desta molécula considerada um dos melhores marcadores de maturação destas células (FUJIMOTO; TEDDER, 2006). Além disto, avaliou-se se as células DC estavam polarizadas para induzir a resposta do tipo Th1, ou seja, se estas estariam produzindo a citocina IL12. Da mesma maneira que o observado em macrófagos, verificou-se aqui que o tratamento com a planta não alterou a atividade, bem como não diminuiu a quantidade das células DC.

Assim, partiu-se para etapa seguinte, objetivando-se verificar os efeitos da *P. aquilinum* em células NK. Em relação a estas células, foram avaliadas sua quantidade e produção da citocina IFN γ . E, com efeito, pôde-se constatar que naqueles camundongos

que receberam a planta houve diminuição do número das células NK esplênicas, bem como da produção de IFN γ (Figuras 10 e 11). Entretanto, uma questão surgiu: será que esta alteração seria suficiente para diminuir a expansão clonal de linfócitos T e, por conseguinte, acarretar em um déficit na resposta celular devido à menor ativação de células efectoras?

Para responder tal questão, realizou-se um experimento paralelo ao da avaliação das células DC e NK, com esplenócitos coletados dos mesmos camundongos tratados e posteriormente imunizados com anatoxina tetânica (AT). Assim, analisou-se a capacidade de proliferação destas células, desafiando-as *ex vivo* com o mesmo antígeno (AT) por 72h. Este experimento permitiu confirmar que, de fato, a diminuição da produção de IFN γ pelas células NK, causada pelo tratamento com a *P. aquilinum* foi suficiente para promover a diminuição da resposta imune celular, pois observou-se menor proliferação dos linfócitos esplênicos dos camundongos tratados com a planta (Figura 12). Além disto, deve-se ressaltar que nestes experimentos não foi observada diferença decorrente da imunoestimulação com selênio, pois a interrupção da administração da planta durante 30 dias foi suficiente para reverter a atividade das células NK. Desta maneira, pode-se afirmar que esta recuperação ocorreu devido ao *turnover* destas células, que acontece ao redor de 17 dias na espécie murina (JAMIESON et al., 2004; WALZER et al., 2007) e, portanto evidencia que a administração da *P. aquilinum* não alterou a atividade dos precursores das células NK.

Considerando que as células NK são as principais efectoras da imunidade inata para combater células infectadas por vírus e também células cancerosas; é plausível supor que a diminuição das atividades destas células (citotoxicidade e produção de IFN γ) causada pela *P. aquilinum* afetariam não somente a resposta contra infecção viral, mas também a imunovigilância ao câncer. Na interação entre as células do hospedeiro e as células cancerosas são propostas três fases essenciais, as quais são conhecidas por imunoedição do câncer: eliminação, equilíbrio e escape (KIM; EMI; TANABE, 2007). Assim, a imunovigilância ao câncer corresponde à fase de eliminação, na qual as primeiras células transformadas que aparecem no organismo são inicialmente eliminadas por células efectoras da imunidade inata como as células NK. Portanto, presume-se que a redução das atividades das células NK, causada pela *P. aquilinum*, poderia contribuir para que maior número de células cancerosas não fosse eliminado e, por conseguinte, atingiriam a fase de

escape, na qual as células cancerosas “sobreviventes” são resistentes ao sistema imune e frequentemente produzem fatores imunossupressores no microambiente tumoral (KIM; EMI; TANABE, 2007). Corroborar esta hipótese um estudo realizado pelo nosso grupo (CANICEIRO et al., 2009), que demonstrou que camundongos tratados com a *P. aquilinum* e com o carcinógeno etil carbamato desenvolveram maior número de lesões pulmonares que os camundongos tratados somente com o carcinógeno.

Um dos estudos iniciais com a *P. aquilinum* (TOKARNIA; DÖBEREINER; CANELLA, 1967), revelou que bovinos intoxicados naturalmente com a planta apresentaram atrofia da polpa branca de baço. Tal quadro também foi aqui verificado em camundongos; portanto objetivou-se constatar se a suplementação com o selênio poderia reverter este efeito tóxico, uma vez que é amplamente conhecido que este mineral possui ação imunoestimulante (HOFFMANN, 2007). E, de fato, verificou-se que este mineral foi capaz de reverter totalmente a atrofia da polpa branca nos camundongos causada pela administração da *P. aquilinum* (Figuras 8 e 9). Tal resultado pode ter grande importância na criação animal, haja vista que a administração deste mineral poderia prevenir, ou mesmo reverter algum dos efeitos tóxicos produzidos pela planta. Portanto, futuramente, será objetivo deste grupo de pesquisa avaliar se também na espécie bovina, se verifica o mesmo efeito. Vale ainda ressaltar que, embora se saiba que o selênio possa causar efeitos tóxicos (MCKENZIE; RAFFERY; BECKETT, 1998), a administração no período e dose aqui empregada, não promoveu alteração nos camundongos que indicassem toxicidade.

Entre os efeitos conhecidos da suplementação com selênio sobre o sistema imune é sabido que este atua sobre linfócitos aumentando a proliferação e a diferenciação destas células em resposta a um estímulo antigênico, sendo este efeito relacionado ao aumento da expressão do receptor de IL2 de alta afinidade (cadeia α); assim, por meio deste processo, os linfócitos respondem de forma mais eficiente à presença da citocina IL2 (HOFFMANN, 2007). Assim sendo, poder-se-ia teorizar que este seria o mecanismo que explicaria os efeitos do selênio aqui encontrados; entretanto, como os camundongos deste estudo não foram desafiados com nenhum estímulo antigênico, o mecanismo envolvido com a recuperação da polpa branca do baço é qualquer outro que não a expansão clonal de linfócitos; deste modo esta hipótese foi descartada.

Outro efeito atribuído ao selênio é a sua capacidade de induzir a proliferação e maturação de timócitos (SHIPP; MORRIS; BLAYLOCK, 1996; STOFFEL; KRAMER;

BEUTH, 1996). Desta forma, a suplementação com selênio promoveria maior número de linfócitos T saindo do timo e indo povoarem órgãos linfoides secundários, como o baço. Portanto, este seria o provável mecanismo de ação relacionado aos resultados obtidos neste estudo. Corrobora esta hipótese, os dados obtidos no último experimento realizado aqui nesta mesma pesquisa, no qual foi observada maior porcentagem de linfócitos T (CD3⁺) esplênicos (25,10%) em camundongos tratados durante 14 dias com selênio comparados aqueles do grupo controle (18,10%) (dados não mostrados).

Com a finalidade de explicar se a diminuição da citotoxicidade das células NK, observada nos camundongos tratados com a samambaia, seria consequente à redução do número de células NK ou se seria devido à redução de sua atividade citotóxica, realizou-se um experimento *in vitro*. Ainda, procurou-se verificar se a imunoestimulação com selênio seria capaz de prevenir ou reverter a diminuição de atividade destas células. Uma vez que os resultados mostraram que o tratamento com extrato de brotos de *P. aquilinum* em RPMI *in vitro* reduziu a citotoxicidade das células NK esplênicas, mas não alterou a viabilidade destas, pode-se ratificar a hipótese de que a *P. aquilinum* promove a diminuição da atividade citotóxica das células NK (Figura 13). Este experimento permitiu ainda verificar que a presença de selênio *in vitro* promoveu efeito contrário, ou seja, tanto preveniu quanto reverteu esta diminuição da citotoxicidade. No entanto, deve-se considerar que este elemento também causou a diminuição da viabilidade dos esplenócitos na ausência do extrato de brotos de *P. aquilinum* em RPMI.

A respeito desta diminuição de viabilidade, sabe-se que o selênio na forma de selenito de sódio (forma utilizada no presente estudo) pode induzir quebras na fita de DNA das células expostas *in vitro* (WILSON et al., 1992). Este dano ao DNA pode induzir a expressão de FasL (CD95L) em linfócitos e subsequente apoptose por ativação de caspases (KASIBHATLA et al., 1998). Deste modo, é razoável supor que a estimulação das células do sistema imune com selenito possa induzir apoptose. Para esclarecer esta hipótese, realizou-se a avaliação da atividade da caspase-3, uma das principais executoras da apoptose, quatro horas após o tratamento *in vitro* com selênio. E, de fato, conforme o suposto, foi observado aumento bastante expressivo na ativação da caspase-3 nas células esplênicas tratadas com selênio (Figura 14).

Até este momento do estudo havia sido demonstrado que o principal efeito imunotóxico da *P. aquilinum* é sobre as atividades das células NK, porém ainda não havia

sido determinado o princípio ativo responsável por tais efeitos. Entre os princípios tóxicos da *P. aquilinum* destaca-se o ptaquilosídeo, considerado o principal entre os princípios encontrados na planta (YAMADA; OJIKI; KIGOSHI, 2007). Assim, nesta etapa da pesquisa realizou-se o isolamento e a quantificação desta substância em brotos da *P. aquilinum*, os quais foram coletados no mesmo local que as demais amostras de planta utilizadas neste estudo. A análise química revelou a média de 178,5 µg de ptaquilosídeo/g de broto. Interessante verificar que os níveis desta substância está aquém daqueles apresentados em outros estudos, como na região norte da América do Sul, 234 µg/g de broto seco (ALONSO-AMELOT et al., 1992) ou na Ilha de São Miguel em Portugal, 2533 µg/g de broto e folhas jovens (PINTO; PELETEIRO, 2010).

A partir da determinação da quantidade do ptaquilosídeo nas amostras de broto, calculou-se o quanto deste princípio conteria na dose de 30 g/kg de broto, utilizada nos experimentos anteriores, sendo obtido o valor de 5,3 mg/kg de ptaquilosídeo, dose esta empregada para os experimentos subsequentes.

Assim, na etapa seguinte, buscou-se avaliar se da mesma maneira que o observado com os brotos da *P. aquilinum*, a administração do ptaquilosídeo promoveria redução da citotoxicidade das células NK. Os resultados obtidos aqui mostraram que, de fato, o ptaquilosídeo é o responsável pela diminuição da citotoxicidade das células NK e do mesmo modo que os brotos da planta não alterou a viabilidade e nem a proliferação destas células conforme evidenciado pela porcentagem de células NK esplênicas que incorporam BrdU ao seu DNA. Ainda, este experimento permitiu observar que a administração de selênio, concomitantemente ao ptaquilosídeo, também preveniu a redução da citotoxicidade das células NK (Figura 15).

Na etapa seguinte deste estudo foi objetivo avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na redução das atividades das células NK esplênicas, causada pelo ptaquilosídeo. Além disto, procurou-se também determinar a maneira pela qual o selênio promoveria a reversão destes efeitos. Para tal, fez-se a avaliação do perfil de expressão gênica das células NK esplênicas de camundongos tratados com ptaquilosídeo e selênio. Os resultados aqui obtidos comparando-se a expressão gênica dos camundongos controle com aqueles tratados com ptaquilosídeo mostraram 841 genes pelo menos duas vezes menos expressos e 90 genes pelo menos duas vezes mais expressos. Destes, apenas dois

foram selecionados, pois de acordo com sua função biológica poderiam estar diretamente relacionados à diminuição da atividade das células NK, os genes Mt1 e Mt2, os quais encontravam-se mais expressos no grupo tratado com a planta.

Sabe-se que os genes Mt1 e Mt2 codificam a proteína metalotioneína, cuja principal função é a homeostase do zinco intracelular (KREZEL; HAO; MARET, 2007). Com o total de 20 resíduos cisteína, a metalotioneína, embora também se ligue a outros metais tem maior afinidade pelo zinco, sendo capaz de quelar até sete íons deste metal (HAQ; MAHONEY; KOROPATNICK, 2003; KREZEL; HAO; MARET, 2007). O zinco, por sua vez, é um elemento essencial para várias funções biológicas, incluindo o funcionamento do sistema imune, sendo que a sua diminuição está relacionada, entre outros efeitos, às respostas imunes alteradas, que incluem a diminuição das atividades das células NK (IBS; RINK, 2003; MOCCHEGIANI et al., 2010). Assim, considerando-se os efeitos promovidos pelo zinco no sistema imune, e associando-os com os dados aqui obtidos, é possível teorizar que o mecanismo de ação tóxico do ptaquilosídeo no sistema imune se deva ao aumento da expressão dos genes Mt1 e Mt2, induzido por esta toxina. Neste sentido, haveria um consequentemente aumento da quantidade de metalotioneína nas células NK, o que acarretaria na redução do zinco livre intracelular e, por conseguinte, na diminuição da atividade destas células.

A partir deste raciocínio, é possível supor que a reversão dos efeitos imunotóxicos produzidos pelo ptaquilosídeo, isto é da diminuição de atividade das células NK, pelo selênio, seja devido à sua ação oxidante sobre a metalotioneína, que culmina com a liberação do zinco no espaço intracelular. Suporta esta hipótese o estudo realizado por Jacob et al. (1999), o qual demonstrou que diferentes compostos de selênio, mesmo em pequenas concentrações, reagem prontamente com a metalotioneína liberando zinco para o espaço intracelular.

A partir destas evidências, foi realizada a quantificação intracelular da metalotioneína em células NK esplênicas tratadas com o ptaquilosídeo e o selênio *in vitro*. E, de fato, pôde-se confirmar, não só o aumento da quantidade desta proteína por célula NK, mas também o aumento da porcentagem de células NK expressando a metalotioneína após o tratamento com ptaquilosídeo. Ainda, este estudo revelou que o contrário ocorreu quando do tratamento com selênio, ou seja, observou-se a diminuição da porcentagem de células NK expressando metalotioneína, embora houvesse aumento

da quantidade de metalotioneína por célula NK (Figura 20). Ainda, os dados provenientes da quantificação do zinco livre no espaço intracelular naquelas células NK esplênicas, tratadas com o ptaquilosídeo e o selênio *in vitro*, mostraram haver a diminuição da concentração de zinco livre nas células tratadas com ptaquilosídeo e a reversão completa na concentração deste elemento após o tratamento com selênio (Figura 21). Portanto, mais uma vez, os resultados corroboram a hipótese levantada.

Considerando que a *P. aquilinum* é uma planta tóxica de grande importância não só para a criação animal, mas também para saúde pública, haja vista que vários estudos vêm mostrando que o ptaquilosídeo pode ser veiculado em produtos de origem animal como no leite (ALONSO-AMELOT, 1997), ou diretamente como, por exemplo, na água de bebida (JENSEN et al., 2008) e devido ao seu alto potencial carcinogênico, certamente este estudo se reveste de grande importância. Vale salientar que a presente pesquisa foi aquela que primeiro mostrou que o ptaquilosídeo também induz falha na atividade das células NK, favorecendo, assim, o desenvolvimento de cânceres de maneira indireta. Portanto, este estudo abre uma nova perspectiva para pesquisas relativas à compreensão da carcinogenicidade promovida pela *P. aquilinum*. Além disto, mostrou-se aqui que há reversão de algum dos efeitos tóxicos quando da utilização do selênio, o que propicia o desenvolvimento de pesquisas que permitirão atenuar ou mesmo prevenir os efeitos tóxicos desta planta nos animais de criação.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Concluiu-se que o efeito imunotóxico da *P. aquilinum* sobre as células NK de camundongos é causado pelo princípio ativo ptaquilosídeo devido à indução do aumento de metalotioneína nestas células com consequente redução da concentração de zinco livre no espaço intracelular e é revertido pela suplementação com selênio devido à redução da metalotioneína causando a liberação de zinco.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LITCHMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007. 566 p.
- AKINAGA, R. M.; LATORRE, A. O.; CANICEIRO, B. D.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S. L. Avaliação da participação da quercetina e do kaempferol na imunossupressão induzida pela *Pteridium aquilinum* em camundongos. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 20, p. 219, 2007. Suplemento n. 3. Trabalho apresentado ao XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, Búzios - Resumo n. PO362.
- ALBERS, R.; BOL, M.; BLEUMINK, R.; WILLEMS, A. A.; PIETERS, R. H. H. Effects of supplementation with vitamins A, C, and E, selenium, and zinc on immune function in a murine sensitization model. **Nutrition**, v. 19, n. 11-12, p. 940-946, 2003.
- ALONSO-AMELOT, M. E.; PÉREZ-MENA, M.; CALCAGNO, M. P.; JAIMES-ESPINOZA, R. Quantitation of pterosins A and B, and ptaquiloside, the main carcinogen of *Pteridium aquilinum* (L. Kuhn), by high pressure liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 3, p. 160-164, 1992.
- ALONSO-AMELOT, M. E.; CASTILLO, U.; SMITH, B. L.; LAUREN, D. R. Bracken ptaquiloside in milk. **Nature**, v. 382, n. 6592, p. 587, 1996.
- ALONSO-AMELOT, M. E. The link between bracken fern and stomach cancer: Milk. **Nutrition**, v. 13, n. 7-8, p. 694-696, 1997.
- ALONSO-AMELOT, M. E. Bracken fern, animal health and human health. **Revista Faculdade de Agronomia (LUZ)**, v. 16, p. 528-547, 1999.
- ALONSO-AMELOT, M. E.; AVENDANO, M. Human carcinogenesis and bracken fern: A review of the evidence. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 6, p. 675-686, 2002.
- ANEGON, I.; CUTURI, M. C.; TRINCHIERI, G.; PERUSSIA, B. Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, n. 2, p. 452-472, 1988.

ANJOS, B. L.; IRIGOYEN, L. F.; FIGHERA, R. A.; GOMES, A. D.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 10, p. 501-507, 2008.

BORZACCHIELLO, G.; AMBROSIO, V.; ROPERTO, S.; POGGIALI, F.; TSIRIMONAKIS, E.; VENUTI, A.; CAMPO, M.; ROPERTO, F. Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas of cattle from the south of Italy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, n. 2-3, p. 203-206, 2003.

BORZACCHIELLO, G.; ROPERTO, F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Veterinary Research**, v. 39, n. 5, p., 2008.

BURKHALTER, P. W.; GROUX, P. M. J.; CANDRIAN, U.; HÜBNER, P.; LÜTHY, J. Isolation, determination and degradation of ptaquiloside - A bracken fern (*Pteridium aquilinum*) carcinogen. **Journal of Natural Toxins**, v. 5, n. 2, p. 141-160, 1996.

CANICEIRO, B. D.; LATORRE, A. O.; FUKUMASU, H.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S. L. O papel da imunotoxicidade causada pela *Pteridium aquilinum* na carcinogênese pulmonar induzida em camundongos. In: SEMANA CIENTÍFICA BENJAMIN EURICO MALUCELLI, 18., 2009, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, 2009. p. 18-19.

CARVALHO, T.; PINTO, C.; PELETEIRO, M. C. Urinary bladder lesions in bovine enzootic haematuria. **Journal of Comparative Pathology**, v. 134, n. 4, p. 336-346, 2006.

COLONNA, M.; SAMARIDIS, J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. **Science**, v. 268, n. 5209, p. 405-408, 1995.

CUI, X.; CHURCHILL, G. A. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. **Genome Biology**, v. 4, n. 4, p. 1-10, 2003.

DER, J. P.; THOMSON, J. A.; STRATFORD, J. K.; WOLF, P. G. Global chloroplast phylogeny and biogeography of bracken (*Pteridium*; Dennstaedtiaceae). **American Journal of Botany**, v. 96, n. 5, p. 1041-1049, 2009.

DO NASCIMENTO FRANÇA, T.; TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. Diseases caused by the radiomimetic principle of *Pteridium aquilinum* (Polypodiaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 85-96, 2002.

DRAGHICI, S. Statistical intelligence: Effective analysis of high-density microarray data. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 11, p., 2002.

EVANS, I. A.; MASON, J. Carcinogenic Activity of Bracken. **Nature**, v. 208, n. 13, p. 913-914, 1965.

EVANS, I. A.; JONES, R. S.; MAINWARING-BURTON, R. Passage of bracken fern toxicity into milk. **Nature**, v. 237, n. 5350, p. 107-108, 1972.

EVANS, W. C.; EVANS, I. A.; HUMPHREYS, D. J.; LEWIN, B.; DAVIES, W. E. J.; AXFORD, R. F. E. Induction of thiamine-deficiency in sheep, with lesions similar to those of cerebrocortical necrosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 85, n. 2, p. 253-267, 1975.

FENWICK, G. R. Bracken (*Pteridium aquilinum*) - Toxic effects and toxic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 46, n. 2, p. 147-173, 1988.

FUJIMOTO, Y.; TEDDER, T. F. CD83: A regulatory molecule of the immune system with great potential for therapeutic application. **Journal of Medical and Dental Sciences**, v. 53, n. 2, p. 85-91, 2006.

GAVA, A.; DA SILVA NEVES, D.; GAVA, D.; DE MOURA SALIBA, T.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) poisoning in cattle in Southern Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 362-365, 2002.

HAASE, H.; HEBEL, S.; ENGELHARDT, G.; RINK, L. Flow cytometric measurement of labile zinc in peripheral blood mononuclear cells. **Analytical Biochemistry**, v. 352, n. 2, p. 222-230, 2006.

HAQ, F.; MAHONEY, M.; KOROPATNICK, J. Signaling events for metallothionein induction. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 533, n. 1-2, p. 211-226, 2003.

HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; BORZELLECA, J. F.; FLAMM, G. W.; WILLIAMS, G. M.; LINES, T. C. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 11, p. 2179-2205, 2007.

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.

HERBERMAN, R. B.; NUNN, M. E.; LAVRIN, D. H. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. **International Journal of Cancer**, v. 16, n. 2, p. 216-229, 1975.

HIRONO, I.; KONO, Y.; TAKAHASHI, K. Reproduction of acute bracken poisoning in a calf with ptaquiloside, a bracken constituent. **Veterinary Record**, v. 115, n. 15, p. 375-378, 1984.

HIRONO, I.; ITO, M.; YAGYU, S.; HAGA, M.; WAKAMATSU, K.; KISHIKAWA, T.; NISHIKAWA, O.; YAMADA, K.; OJIKAWA, M.; KIGOSHI, H. Reproduction of progressive retinal degeneration (bright blindness) in sheep by administration of ptaquiloside contained in bracken. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 55, n. 6, p. 979-983, 1993.

HOFFMANN, P. R. Mechanisms by which selenium influences immune responses. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 289-297, 2007.

HOPKINS, A. Bracken (*Pteridium aquilinum*): its distribution and animal health implications. **British Veterinary Journal**, v. 146, n. 4, p. 316-326, 1990.

IBS, K. H.; RINK, L. Zinc-altered immune function. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 5 SUPPL. 2, p., 2003.

JACOB, C.; MARET, W.; VALLEE, B. L. Selenium redox biochemistry of zinc-sulfur coordination sites in proteins and enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 5, p. 1910-1914, 1999.

JAMIESON, A. M.; ISNARD, P.; DORFMAN, J. R.; COLES, M. C.; RAULET, D. H. Turnover and Proliferation of NK Cells in Steady State and Lymphopenic Conditions. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 2, p. 864-870, 2004.

JENSEN, P. H.; JACOBSEN, O. S.; HANSEN, H. C. B.; JUHLER, R. K. Quantification of Ptaquiloside and Pterosin B in Soil and Groundwater Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 9848-9854, 2008.

KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 12, p. 984-993, 2003.

KARLHOFFER, F. M.; RIBAUDO, R. K.; YOKOYAMA, W. M. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49⁺ IL-2-activated natural killer cells. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 66-70, 1992.

KARRE, K. Natural killer cell recognition of missing self. **Nature Immunology**, v. 9, n. 5, p. 477-480, 2008.

KASIBHATLA, S.; BRUNNER, T.; GENESTIER, L.; ECHEVERRI, F.; MAHBOUBI, A.; GREEN, D. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. **Molecular Cell**, v. 1, n. 4, p. 543-551, 1998.

KIESSLING, R.; KLEIN, E.; WIGZELL, H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. **European Journal of Immunology**, v. 5, n. 2, p. 112-117, 1975.

KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. **Immunology**, v. 121, n. 1, p. 1-14, 2007.

KOBAYASHI, K.; KANEDA, K.; KASAMA, T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. **Microscopy Research and Technique**, v. 53, n. 4, p. 241-245, 2001.

KREZEL, A.; HAO, Q.; MARET, W. The zinc/thiolate redox biochemistry of metallothionein and the control of zinc ion fluctuations in cell signaling. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 463, n. 2, p. 188-200, 2007.

LANIER, L. L.; PHILLIPS, J. H.; HACKETT JR, J. Natural killer cells: Definition of a cell type rather than a function. **Journal of Immunology**, v. 137, n. 9, p. 2735-2739, 1986.

LATORRE, A.; FURLAN, M.; SAKAI, M.; FUKUMASU, H.; HUEZA, I.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S. Immunomodulatory effects of *Pteridium aquilinum* on natural killer cell activity and select aspects of the cellular immune response of mice. **Journal of Immunotoxicology**, v. 6, n. 2, p. 104-114, 2009.

LJUNGGREN, H. G.; KARRE, K. Host-resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants - analysis of the mechanism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 162, n. 6, p. 1745-1759, 1985.

MARCUSON-STAHN, M.; CEDERBRANT, K. A flow-cytometric NK-cytotoxicity assay adapted for use in rat repeated dose toxicity studies. **Toxicology**, v. 193, n. 3, p. 269-279, 2003.

MARRERO, E.; BULNES, C.; SANCHEZ, L. M.; PALENZUELA, I.; STUART, R.; JACOBS, F.; ROMERO, J. *Pteridium aquilinum* (bracken fern) toxicity in cattle in the humid Chaco of Tarija, Bolivia. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 43, n. 3, p. 156-158, 2001.

MARTIN-FONTECHA, A.; THOMSEN, L. L.; BRETT, S.; GERARD, C.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. **Nature Immunology**, v. 5, n. 12, p. 1260-1265, 2004.

MASON, L. H.; ORTALDO, J. R.; YOUNG, H. A.; KUMAR, V.; BENNETT, M.; ANDERSON, S. K. Cloning and functional characteristics of murine large granular lymphocyte-1: A member of the Ly-49 gene family (Ly-49G2). **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 2, p. 293-303, 1995.

MCKENZIE, R. C.; RAFFERTY, T. S.; BECKETT, G. J. Selenium: An essential element for immune function. **Immunology Today**, v. 19, n. 8, p. 342-345, 1998.

MITCHELL, L. W. Bracken fern, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. **Weed Technology**, v. 13, n. 2, p. 429-432, 1999.

MOCCHEGIANI, E.; MALAVOLTA, M.; COSTARELLI, L.; GIACCONI, R.; CIPRIANO, C.; PIACENZA, F.; TESEI, S.; BASSO, A.; PIERPAOLI, S.; LATTANZIO, F. Zinc, metallothioneins and immunosenescence. **Proceedings of the Nutrition Society**, 2010. 10 p. Pré-print.

MOREIRA SOUTO, M. A.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L.; PIAZER, J. V. M.; RECH, R. R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Neoplasms of the upper digestive tract of cattle associated with spontaneous ingestion of bracken fern (*Pteridium aquilinum*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 112-122, 2006.

MORETTA, A.; BOTTINO, C.; VITALE, M.; PENDE, D.; CANTONI, C.; CRISTINA, M.; BIASSONI, R.; MORETTA, L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 197-223, 2001.

NGOMUO, A. J.; JONES, R. S. Genotoxicity studies of quercetin and shikimate in vivo in the bone marrow of mice and gastric mucosal cells of rats. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 176-180, 1996.

NIELSEN, D. B. Economic impact of poisonous plants on the rangeland livestock industry. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 9, p. 2330-2333, 1988.

OELRICHS, P. B.; NG, J. C.; BARTLEY, J. Purification of ptaquiloside, a carcinogen from *Pteridium-aquilinum*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 53-56, 1995.

OJIKI, M.; WAKAMATSU, K.; NIWA, H.; YAMADA, K. Ptaquiloside, a potent carcinogen isolated from bracken fern *Pteridium-aquilinum* var *latiusculum* - structure elucidation based on chemical and spectral evidence, and reactions with amino-acids, nucleosides, and nucleotides. **Tetrahedron**, v. 43, n. 22, p. 5261-5274, 1987.

PAMUKCU, A. M.; PRICE, J. M. Induction of intestinal and urinary bladder cancer in rats by feeding bracken fern (*Pteris aquilina*). **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 1, p. 275-281, 1969.

PAMUKCU, A. M.; ERTURK, E.; YALCINER, S. Carcinogenic and mutagenic activities of milk from cows fed bracken fern (*Pteridium aquilinum*). **Cancer Research**, v. 38, n. 6, p. 1556-1560, 1978.

PEIXOTO, P. V.; FRANCA, T. D.; BARROS, C. S. L.; TOKARNIA, C. H.
Histopathological aspects of bovine enzootic hematuria in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 65-81, 2003.

PINTO, C. A.; LOUZÃ, A. C.; ALMEIDA, V.; MELO, M.; VAZ, Y.; PELETEIRO, M. C.; SMITH, B. L. Caracterização epidemiológica da ocorrência de tumores da bexiga em populações de bovinos leiteiros da ilha de São Miguel. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 96, n. 537, p. 11-19, 2001.

PINTO, C. A.; PELETEIRO, M. C. Risk factors associated with cattle bracken diseases on São Miguel Island, Azores. In: WORKSHOP ON PTAQUILOSIDE TOXICITY, 2010, Ilha de São Miguel. **Proceedings...** Ilha de São Miguel: Furnas, 2010. resumo 4.

RASMUSSEN, L. H.; KROGHSSBO, S.; FRISVAD, J. C.; HANSEN, H. C. B.
Occurrence of the carcinogenic Bracken constituent ptaquiloside in fronds, topsoils and organic soil layers in Denmark. **Chemosphere**, v. 51, n. 2, p. 117-127, 2003.

RASMUSSEN, L. H.; HANSEN, H. C. B.; LAUREN, D. Sorption, degradation and mobility of ptaquiloside, a carcinogenic Bracken (*Pteridium* sp.) constituent, in the soil environment. **Chemosphere**, v. 58, n. 6, p. 823-835, 2005.

RAULET, D. H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 10, p. 781-790, 2003.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: Importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 38-42, 2001.

RIET-CORREA, F. Plantas de ação mutagênica e anti-hematopoiética. In: RIET-CORREA, F.; SHILD, A. L. MENDEZ, M. C. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. v. 2, p. 265-267.

ROSENBERGER, G.; HEESCHEN, W. Alderfarn (*Pteris aquilina*) die ursache des song. Stallrotes der ringer (haematuria vesicalis bovis chronica). **Deutsche Tierarzliche Wochenschrift**, v. 67, n. 8, p. 201-208, 1960.

SANTOS, R. C. Avanços na pesquisa com o broto de samambaia usado como alimento em Minas Gerais. **Revista da Pesquisa & Pós-Graduação**, p. 1-6, 2001.

SCHACHAM, P.; PHILP, R. B.; GOWDEY, C. W. Antihematopoietic and carcinogenic effects of bracken fern (*Pteridium aquilinum*) in rats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 31, n. 1, p. 191-197, 1970.

SHIPP, B. K.; MORRIS, B. J.; BLAYLOCK, B. L. A selenium-enriched diet alters the thymic atrophy induced by oral exposure to t-2 toxin in Balb/c mice. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 344, 1996.

SMITH, B. L. Bracken Fern (genus *Pteridium*) Toxicity - a Global Problem. In: _____. **Poisonous Plants and Related Toxins**. Cambridge: CABI, 2004, p. 227-240.

STOFFEL, B.; KRAMER, K.; BEUTH, J. Murine thymocyte proliferation, maturation and emigration in response to selenium. **Drug Research**, v. 46, n. 8, p. 829-831, 1996.

STONEMAN, E. R.; BENNETT, M.; AN, J.; CHESNUT, K. A.; WAKELAND, E. K.; SCHEERER, J. B.; SICILIANO, M. J.; KUMAR, V.; MATHEW, P. A. Cloning and characterization of 5E6(Ly-49C), a receptor molecule expressed on a subset of murine natural killer cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 2, p. 305-313, 1995.

STOREY, J.; TIBSHIRANI, R. SAM Thresholding and False Discovery Rates for Detecting Differential Gene Expression in DNA Microarrays. In: PARMEGIANI, G.; GARRETT, E.; IRIZARRY, R.; ZEGER, S.; STOREY, J.; TIBSHIRANI, R. **The Analysis of Gene Expression Data**. London: Springer, 2003, p. 272-290.

SUGIMURA, T. Nutrition and dietary carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 387-395, 2000.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; CANELLA, C. F. The acute poisoning occurrence by the bracken fern (*Pteridium aquilinum* [L.] Kuhn) in cattle in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 2, p. 329-336, 1967.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Plantas que causam perturbações nervosas. In: _____. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000, p. 142-143.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1635-1660, 2002.

TULSAWANI, R. K.; DEBNATH, M.; PANT, S. C.; KUMAR, O.; PRAKASH, A. O.; VIJAYARAGHAVAN, R.; BHATTACHARYA, R. Effect of sub-acute oral cyanide administration in rats: Protective efficacy of alpha-ketoglutarate and sodium thiosulfate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 156, n. 1, p. 1-12, 2005.

VILLALOBOS-SALAZAR, J.; HERNANDEZ, H.; MENESES, A.; SALAZAR, G. Factors which may affect ptaquiloside levels in milk: effects of altitude, bracken fern growth stage, and milk processing. In: INTERNATIONAL BRACKEN CONFERENCE, 4., 1999, Manchester. **Proceedings...** Manchester: University of Manchester, 1999. p. 68-74.

VIVIER, E.; TOMASELLO, E.; BARATIN, M.; WALZER, T.; UGOLINI, S. Functions of natural killer cells. **Nature Immunology**, v. 9, n. 5, p. 503-510, 2008.

WAGTMANN, N.; BIASSONI, R.; CANTONI, C.; VERDIANI, S.; MALNATI, M. S.; VITALE, M.; BOTTINO, C.; MORETTA, L.; MORETTA, A.; LONG, E. O. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. **Immunity**, v. 2, n. 5, p. 439-449, 1995.

WALZER, T.; BLÉRY, M.; CHAIX, J.; FUSERI, N.; CHASSON, L.; ROBBINS, S. H.; JAEGER, S.; ANDRÉ, P.; GAUTHIER, L.; DANIEL, L.; CHEMIN, K.; MOREL, Y.; DALOD, M.; IMBERT, J.; PIERRES, M.; MORETTA, A.; ROMAGNÉ, F.; VIVIER, E. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 9, p. 3384-3389, 2007.

WILSON, A. C.; THOMPSON, H. J.; SCHEDIN, P. J.; GIBSON, N. W.; GANTHER, H. E. Effect of methylated forms of selenium on cell viability and the induction of DNA strand breakage. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 5, p. 1137-1141, 1992.

XU, L. R. Bracken poisoning and enzootic haematuria in cattle in China. **Research in Veterinary Science**, v. 53, n. 1, p. 116-121, 1992.

YAMADA, K.; OJIKI, M.; KIGOSHI, H. Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 4, p. 798-813, 2007.