UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da atividade imunomoduladora de *Alternanthera tenella* Colla e investigação de ações do extrato aquoso em modelo de artrite experimental

Carla de Agostino Biella

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da atividade imunomoduladora de *Alternanthera tenella* Colla e investigação de ações do extrato aquoso em modelo de artrite experimental

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Carla de Agostino Biella

Orientadora: Profa. Dra. Luciana S. Pereira Crott

Ribeirão Preto
2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Biella, Carla de Agostino
Avaliação da atividade imunomoduladora de *Alternanthera tenella* Colla e investigação de ações do extrato aquoso em modelo de artrite experimental. Ribeirão Preto, 2007.
106 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientador: Silva, Joaquim José.

1. *Alternanthera tenella*. 2. imunomodulação. 3. linfócito B. 4. atividade antiinflamatória. 5. artrite induzida por pristane

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno : Carla de Agostino Biella
Título do trabalho: Avaliação da atividade imunomoduladora de *Alternanthera tenella* Colla e investigação de ações do extrato aquoso em modelo de artrite experimental

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana S. Pereira Crott

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Aos meus pais Ivani e Carlos, que são

meus ídolos, meu alicerce,

minha vida!

Ao Plauto, meu amor,

que há 8 oito anos é parte

integrante da minha vida

À minha família,

em especial aos meus irmãos,

Vivian, Ian e Fernanda

e à minha avó Onélia

que eu tanto amo

"Dê-me, Senhor,
agudeza para entender, capacidade para reter, método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar
Dê-me, Senhor,
acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir"

São Tomás de Aquino

AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. Luciana S. Pereira Crott pela orientação e principalmente pela amizade desenvolvida ao longo desses anos

Aos meus pais pelo amor, dedicação e apoio

Ao Plauto pela paciência, carinho e amor com os quais sempre me amparou nos momentos de stress e cansaço, durante o desenvolvimento deste trabalho

À minha avó Onélia sempre torcendo e orando pelo meu sucesso

À toda minha família pelo amor e presença constante

À minha futura sogra, pessoa especial que me recebe e me ampara como filha

À Tânia pela colaboração fundamental no decorrer deste trabalho, mas principalmente pela amizade demonstrada nos momentos em que mais precisei de sua ajuda

Ao Rubens, pelo apoio técnico inestimável e amizade

Ao Daniel Callejon, não apenas pela importante colaboração nos experimentos mas principalmente pela amizade, fortalecida nos últimos anos

À todos os integrantes do Laboratório de Imunoglicobiologia pelo acolhimento e auxílio prestados

Ao Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan pelo fornecimento dos camundongos AIRmax e pelo apoio fundamental no decorrer deste trabalho

À profa. Dra. Ana Lúcia Darini pela atenção, auxílio e amizade

Aos laboratórios de pesquisa de Micologia Clínica, da profa. Regina Célia, de Citologia, da Profa. Regina Torquetti, pelo acolhimento e auxílio

Ao Laboratório de Bioquímica, professores, funcionários e alunos sempre prontos a nos ajudar

À prof. Fabíola por todas as vezes que nos socorreu nas pesquisas

Ao Carlos Armando, secretário do Programa de Biociências aplicadas à Farmácia por toda atenção e dedicação à nós alunos dispensadas

Aos funcionários do Biotério da FCFRP, Reynaldo, Cristiana e Aldo (ex-funcionário) pela amizade, carinho e dedicação à nós alunos, através do cuidado com os nossos animais experimentais

A todos os vigilantes da FCFRP, especialmente Henrique, Lima, Gilmar, Paulo Roberto, Paulo Henrique, Sr. Antonio, Clóvis e Wilson, que com um sorriso no rosto, estão sempre disposto a nos ajudar

À Capes, pela bolsa de estudos concedida

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho

RESUMO

BIELLA, C. A. Avaliação da atividade imunomoduladora de *Alternanthera tenella* Colla e investigação de ações do extrato aquoso em modelo de artrite experimental. 2007. 106f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Plantas do gênero *Alternanthera* (Amaranthaceae) vêm sendo estudadas por suas propriedades antiparasitária, antibacteriana e antiviral. No Brasil a planta *Alternanthera tenella* Colla*,* objeto de nossa investigação, é utilizada na medicina popular por possuir atividade antiinflamatória. Considerando a importância do sistema imunológico em infecções e em doenças auto-imunes sistêmicas que apresentam intensa reação inflamatória, o objetivo do atual estudo foi investigar a ação imunomoduladora de extratos de *A. tenella* no sistema imune de camundongos BALB/c e sua atividade em modelo de artrite experimental induzida pelo óleo mineral pristane (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) em camundongos AIRmax, obtidos por seleção genética para reação inflamatória aguda máxima. Extratos brutos orgânicos (etanólico e hexânico), aquosos, frações e flavonóides foram inoculados via intraperitoneal em camundongos BALB/c imunizados ou não com eritrócitos de carneiro (EC). Efeitos imunomoduladores e imunotóxicos foram avaliados através da determinação do peso corporal e dos órgãos linfóides, celularidade do baço e de ensaios funcionais como enumeração de células formadoras de placas (PFC, *plaque forming cells*), produção de anticorpos anti-EC e edema de pata induzido por carragenina. Posteriormente foram avaliados os efeitos dos extratos aquosos nas subpopulações de linfócitos esplênicos (CD3, CD4, CD8 e CD19), na expressão de marcadores de ativação de linfócitos (CD25, CD40, CD45RB e CD69) e na indução de apoptose nessas células. Os extratos avaliados não induziram alterações no peso dos animais e dos órgãos (baço, timo e fígado) após 4 e 14 dias. Animais imunizados com EC e tratados com o flavonóide 2''-O-α-L-ramnopiranosilvitexina (15 mg/kg), isolado de extrato bruto etanólico (E) ou com o extrato aquoso extraído a frio (AF - 100 mg/kg) apresentaram aumento significativo ($p<0,05$) no número de PFC anti-EC em comparação aos controles. Os extratos E e AF induziram aumento no título de anticorpos circulantes anti-EC das classes IgG e IgM. Estes resultados sugerem atividade imunoestimulante. Ambos os extratos aquosos, AF e extraído a quente (AQ), apresentaram atividade antiinflamatória no edema de pata induzido por carragenina, principalmente AF que demonstrou efeito dose-dependente (50% e 61% de inibição do edema nas doses de 200 mg/kg e 400 mg/kg, respectivamente). Estes extratos em camundongos BALB/c normais não induziram apoptose, alterações nas subpopulações de linfócitos e não modificaram a expressão de marcadores de ativação em linfócitos T e B. Com base nestes resultados, o extrato AF foi selecionado para utilização nos experimentos em camundongos AIRmax, para investigação de suas possíveis atividades moduladora e/ou terapêutica na artrite induzida por pristane. Os animais que foram tratados com seis doses de 200 mg/kg do extrato AF antes das injeções do pristane (G1, n=15) apresentaram menor incidência de artrite em comparação ao grupo controle positivo, composto por animais que receberam apenas pristane (G4, n=15) (54,5% e 70%, respectivamente). A porcentagem de animais que apresentaram deformidade nas articulações, também foi menor no grupo G1 (18,2%) em comparação ao G4 (30%). Os animais que receberam apenas o extrato (G3, n=14) não apresentaram artrite. Adicionalmente, AF conferiu atividade protetora ao desenvolvimento de ascite,

processo inflamatório que também pode ser induzido pelo óleo mineral. As taxas de incidência de ascite nos animais tratados previamente (G1) bem como nos animais tratados após (G2, n=16) as injeções de pristane foram menores do que a do grupo controle positivo (G1=18,2%, G2=6,7% e G4= 50%). Ressalta-se que os índices de sobrevivência nos grupos de animais que receberam o extrato foram superiores ao grupo controle positivo (G1= 86,7%; G2= 93,7%; G4= 60,0%). A taxa de sobrevivência do grupo G3 foi de 100% ao final do experimento. Esses efeitos moduladores do extrato no processo da artrite parecem não ser dependentes da modulação de marcadores de ativação de linfócitos T, nem de alterações nas subpopulações dessas células (CD4+, CD8+, T regulatórias). Tampouco dependeram da indução de apoptose nos linfócitos esplênicos, conforme avaliado pelas técnicas da anexina V e análise da fragmentação de DNA. Entretanto, aumentos na porcentagem de células B/CD69+ sugerem possível participação destas células no processo de modulação da doença. Analisados conjuntamente, os resultados apresentados sugerem que alguns dos produtos vegetais avaliados podem modular a função de linfócitos B, além de apresentarem importante atividade antiinflamatória em edema de pata induzido por carragenina. Adicionalmente, o extrato AF apresentou ação moduladora na artrite induzida por pristane. Esses resultados fornecem subsídios para o entendimento das atividades biológicas da *Alternanthera tenella* e para a validação científica do seu uso popular.

Palavras-chave: *Alternanthera tenella*, extratos vegetais; imunomodulação, linfócito B, imunoglobulinas, atividade antiinflamatória, artrite induzida por pristane

ABSTRACT

BIELLA, C. A. **Evaluation of the immunomodulatory activity of *Alternanthera tenella* Colla. Effects of the aqueous extract investigated in an experimental arthritis model.** 2007. 106f. Thesis (Doctorate). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Antiparasitic, antibacterial and antiviral activities in plants of the *Alternanthera* genus (Amaranthaceae) have been studied. In Brasil, *Alternanthera tenella* Colla are used in popular medicine as an anti-inflammatory agent. Considering the importance of the immune system in infectious and systemic autoimmune diseases showing intense inflammatory reaction, the objective of this study was to investigate the immunomodulatory activity of *A. tenella* extracts in BALB/c mice. The plant extracts were also tested in a mineral pristane oil (2,6,10,14-tetramethylpentadecane) induced arthritis model in AIRmax mice, genetically selected for maximal acute inflammatory reactions. Organic solvent crude extracts (ethanol and hexane), aqueous fractions and isolated flavonoids were intraperitoneally inoculated in BALB/c mice immunized or not with sheep red blood cells (SRBC). Immunomodulatory and immunotoxic effects were evaluated by determining body and lymphoid organ weights, splenic cellularity and through functional assays like plaque-forming cells (PFC), antibody anti-SRBC production and carrageenan-induced paw edema. The effects of aqueous extracts on splenic lymphocyte subtypes (CD3, CD4, CD8 and CD19) and apoptosis detection in these cells were further evaluated. The extracts tested did not induce changes in body and organ (spleen, thymus and liver) weights 4 and 14 days after administration. PFC numbers were significantly increased ($p<0,05$) in SRBC immunized animals treated with 15mg/kg 2''-O-α-L-ramnopiranosilvitexina, a flavonoid isolated from the etanolic (E) crude extract or with the cold aqueous extract (CAE – 100 mg/kg) when compared to the controls. The E and CAE extracts induced increased anti-SRBC IgG and IgM circulating antibody titers, suggesting immunostimulatory activity. Aqueous extracts, CAE and hot aqueous extract (HAE), had significant anti-inflammatory activity in the carrageenan paw edema, especially CAE, which showed a dose-related effect (50% and 61% edema inhibition in dosages of 200 mg/kg and 400 mg/kg, respectively). In normal BALB/c mice the extracts did not induce apoptosis or changes in lymphocyte subtypes and T and B activation markers. Based on these results, CAE was selected

for tests of modulatory and /or therapeutic activity in a model of pristane induced arthritis in AIRmax mice. Animals (G1, n=15) treated with six doses of CAE (200 mg/kg) before pristane injections showed smaller arthritis incidence when compared to the control positive group receiving pristane only (G4, n=15) (54,4% and 70%, respectively). Percentage of animals showing joint deformities was smaller in G1 (18,2%) in comparison to G4 (30%). The animals receiving extract only (G3, n=14) did not show signs of arthritis. In addition, CAE showed protective activity against ascites development, an inflammatory process that may be induced by the mineral oil. The arthritis incidence index, both in CAE previously treated animals (G1) and in animals treated after pristane injections (G2, n=16), was smaller than in the positive control group (G1=18,2% and G2=6,7% x G4= 50%). It is noteworthy that extract-treated animals, in both groups, also had a higher survival index when compared to the positive control group (G1= 81,9% and G2= 90,8% x G4= 40,2%). The survival index in the G3 group was 100% up to the end of the experiments. The extract modulatory effects in arthritis do not seem to be dependent on the modulation of T lymphocyte activation markers, or on changes in T cells subtypes (CD4+, CD8+, regulatory T cells). Also, they did not depend on apoptosis induction in splenic lymphocytes as evaluated by annexin V and analysis of DNA degradation techniques. However, the percentage increase of B/CD69+ cells suggest their participation in the modulatory process. Together, the results suggest that some of the evaluated plant-derived products may modulate B lymphocyte functions, besides showing important anti-inflammatory activity in carrageenan paw edema. In addition, CAE showed modulatory action in pristane induced arthritis. These results contribute to the understanding of *Alternanthera tenella* biological activities and provide scientific validation to its popular use.

Keywords: *Alternanthera tenella*, immunomodulation, B lymphocyte, antibodies, anti-inflammatory activity, pristane induced arthritis

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1 Esquema da preparação dos extratos brutos extraídos em solventes orgânicos 19
Figura 2 Esquema da preparação dos extratos aquosos a partir do vegetal fresco 20
Figura 3 Esquema da partição do extrato etanólico bruto e obtenção da fase butanólica 21
Figura 4 Esquema de isolamento dos constituintes químicos do extrato bruto etanólico 22
Figura 5 Esquema do tratamento dos camundongos AIRmax do G1 com o extrato AF na artrite induzida por pristane 30
Figura 6 Esquema do tratamento dos camundongos AIRmax do G2 com o extrato AF na artrite induzida por pristane 31
Figura 7 Efeito do extrato etanólico (E) sobre a celularidade do baço 36
Figura 8 Efeito da fase butanólica (FB) sobre a celularidade do baço 37
Figura 9 Efeito do extrato hexânico (H) sobre a celularidade do baço 38
Figura 10 Efeito do flavonóide A18 sobre a celularidade do baço 38
Figura 11 Efeito do flavonóide A19 sobre a celularidade do baço 39
Figura 12 Efeito do extrato aquoso frio (AF) sobre a celularidade do baço..... 40
Figura 13 Efeito do extrato aquoso quente (AQ) sobre a celularidade do baço 40
Figura 14 Número de PFC no baço de camundongos tratados ou não com o extrato etanólico (E) 41
Figura 15 Número de PFC no baço de camundongos tratados ou não com a fase butanólica (FB) 42
Figura 16 Número de PFC no baço de camundongos tratados ou não com o extrato hexânico (H) 42
Figura 17 Número de PFC no baço de camundongos tratados ou não com o flavonóide A18 43
Figura 18 Número de PFC no baço de camundongos tratados ou não com flavonóide A19 44
Figura 19 Número de PFC no baço de camundongos tratados ou não com o extrato aquoso frio (AF) 45

.

Figura 20 Número de PFC no baço de camundongos tratados ou não com o extrato aquoso quente (AQ) 45
Figura 21 Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC após 4 dias de imunização em camundongos tratados ou não com extrato etanólico (E) 47
Figura 22 Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC após 4 dias de imunização em camundongos tratados ou não com a fase butanólica (FB) 47
Figura 23 Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC no dia 0 e com 4 dias, 7dias e 14 dias após a imunização em camundongos tratados ou não com extrato etanólico (E) 48
Figura 24 Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC após 4 dias de imunização em camundongos tratados ou não com extrato hexânico (H) 49
Figura 25 Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC no dia 0 e com 4 dias, 7dias e 14 dias após a imunização em camundongos tratados ou não com o extrato hexânico (H) 50
Figura 26 Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC após 4 dias de imunização em camundongos tratados ou não com os flavonóides A18 e A19 51
Figura 27 Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC no dia 0 e com 4 dias, 7dias e 14 dias após a imunização em camundongos tratados ou não com o flavonóide A18 52
Figura 28 Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC no dia 0 e com 4 dias, 7dias e 14 dias após a imunização em camundongos tratados ou não com o flavonóide A19 53
Figura 29 Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC após 4 dias de imunização em camundongos tratados ou não com os extratos aquosos AF e AQ 55
Figura 30 Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC no dia 0 e com 4 dias, 7dias e 14 dias após a imunização em camundongos tratados ou não com o extrato aquoso 56

Figura 31 Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC no dia 0 e com 4 dias, 7dias e 14 dias após a imunização em camundongos tratados ou não com o extrato aquoso quente 57
Figura 32 Efeito dos extratos orgânicos no edema de pata induzido por carragenina..... 60
Figura 33 Efeito dos extratos aquosos no edema de pata induzido por carragenina. 61
Figura 34 Análise eletroforética do DNA de células do baço de camundongos BALB/c tratados ou não com os extratos aquosos AF e AQ 64
Figura 35 Incidência de artrite em camundongos AIRmax nos diferentes grupos avaliados..... 67
Figura 36 Pontuação atribuída às articulações dos camundongos AIRmax para avaliação do desenvolvimento de artrite nos diferentes grupos estudados 68
Figura 37 Incidência de deformidade nas articulações de camundongos AIRmax nos diferentes grupos avaliados 68
Figura 38 Incidência de ascite em camundongos AIRmax nos diferentes grupos avaliados..... 69
Figura 39 Índice de sobrevivência dos grupos de camundongos AIRmax dos grupos avaliados..... 69
Figura 40 Porcentagem de células T (CD3+) e celulas B (CD19+) e células T CD4+ e CD8+ de camundongos AIRmax nos diferentes grupos avaliados..... 71
Figura 41 Detecção de células B/CD69+ em camundongos AIRmax tratados ou não como extrato AF..... 72
Figura 42 Análise eletroforética do DNA de células do baço de camundongos AIRmax tratados ou não com extrato AF 73

LISTA DE TABELAS

pág.

Tabela 1 Efeito do extrato aquoso AF sobre o peso corporal e peso relativo dos órgãos de camundongos 35

Tabela 2 Efeito do extrato aquoso AQ sobre o peso corporal e peso relativo dos órgãos de camundongos 35

Tabela 3 Efeito de doses maiores de extratos de AF e AQ sobre o peso corporal e peso relativo dos órgãos de camundongos..... 35

Tabela 4 Resultados gerais dos extratos avaliados na primeira etapa..... 62

Tabela 5 Células do baço de camundongos BALB/c dos grupos tratados ou não com os extratos aquosos AF e AQ 63

Tabela 6 Células do baço de camundongos AIRmax expressando fosfatidilserina (AV+) ou iodeto de propídeo (PI+) em sua superfície 65

Tabela 7 Efeito dos extratos AF sobre a porcentagem de células esplênicas expressando os marcadores avaliados em camundongos AIRmax dos diferentes grupos 71

Tabela 8 Células do baço de camundongos AIRmax expressando fosfatidilserina (AV+) ou iodeto de propídeo (PI+) em sua superfície 74

SUMÁRIO

RESUMO ..... **i**

ABSTRACT ..... **iv**

LISTA DE FIGURAS ..... **vii**

LISTA DE TABELAS ..... **x**

1. INTRODUÇÃO **1**

1.1 A família Amaranthaceae e o gênero Alternanthera 3

1.2 O Sistema Imune e compostos vegetais imunomoduladores 6

1.3 Artrite Reumatóide 10

1.4 Modelos experimentais de Artrite Reumatóide 12

2. OBJETIVOS **15**

3. MATERIAIS E MÉTODOS **17**

3.1 Animais 18

3.2 Extratos de Alternanthera tenella Colla 18

3.3 Determinação do peso e dos pesos de órgãos linfóides 22

3.4 Avaliação da celularidade do baço e preparação das células 23

3.5 Enumeração de células formadoras de anticorpos (PFC) 23

3.6 Preparação do antígeno de hemácias de carneiro 24

3.7 Determinação do título de anticorpos circulantes (ELISA) 24

3.8 Edema de pata induzido por carragenina 25

3.9 Análises de subpopulações de linfócitos esplênicos e da ativação de linfócitos por citometria de fluxo 26

3.10 Avaliação da indução de apoptose 27

3.11 Indução e avaliação da presença de artrite induzida por pristane e investigação do efeito do extrato Aquoso Frio (AF) na PIA 28

3.12 Análise dos resultados 32

4. RESULTADOS 33
4.1 Efeito dos extratos brutos orgânicos, aquosos, frações e flavonóides no peso relativo dos órgãos dos camundongos 34
4.1.1 Extrato aquoso frio (AF) e extrato aquoso quente (AQ) 34
4.2 Efeito dos extratos brutos orgânicos, aquosos, frações e flavonóides na celularidade do baço dos camundongos 36
4.2.1 Extrato orgânico etanólico (E) e fase butanólica (FB) 36
4.2.2 Extrato orgânico hexânico (H) 37
4.2.3 Flavonóides A18 e A19 37
4.2.4 Extrato aquoso frio (AF) e extrato aquoso quente (AQ) 39
4.3 Efeito dos extratos brutos orgânicos, aquosos, frações e flavonóides nas células formadoras de placas (PFC) 41
4.3.1 Extrato orgânico etanólico (E) e fase butanólica (FB) 41
4.3.2 Extrato orgânico hexânico (H) 42
4.3.3 Flavonóides A18 e A19 43
4.3.4 Extrato aquoso frio (AF) e extrato aquoso quente (AQ) 44
4.4 Efeito dos extratos brutos orgânicos, aquosos, frações e flavonóides no título de anticorpos circulantes – ELISA 46
4.4.1 Extrato orgânico etanólico (E) e fase butanólica (FB) 46
4.4.2 Extrato orgânico hexânico (H) 49
4.4.3 Flavonóides A18 e A19 49
4.4.4 Extrato aquoso frio (AF) e extrato aquoso quente (AQ) 54
4.5 Efeito dos extratos brutos orgânicos, aquosos e frações no edema de pata induzido por carragenina 58
4.6 Resumo dos resultados 59
4.7 Efeito do extrato aquoso frio (AF) e extrato aquoso quente (AQ) sobre as subpopulações de linfócitos esplênicos e sobre a ativação de linfócitos 63
4.8 Efeito do extrato aquoso frio liofilizado (AF) e extrato aquoso quente liofilizado (AQ) na indução da apoptose 64
4.9 Investigação do efeito do extrato Aquoso Frio (AF) na artrite induzida por pristane (PIA) em camundongos AIRmax 66
4.10 Efeito do extrato aquoso frio (AF) sobre as subpopulações de linfócitos esplênicos e sobre a ativação de linfócitos na artrite induzida por pristane (PIA) em camundongos AIRmax 70

4.11 Efeito do extrato aquoso frio (AF) na indução da apoptose na artrite induzida por pristane (PIA) em camundongos AIRmax 73

5. DISCUSSÃO 75

6. CONCLUSÕES 86

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 88

ANEXO 103

1. INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e é amplamente difundido por todo o mundo. Por um longo período, minerais, plantas e produtos animais foram a principal fonte de drogas (De Pasquale, 1984).

Produtos naturais e seus derivados têm sido, tradicionalmente, a fonte mais comum de novos agentes terapêuticos para doenças infecciosas, câncer, desordens lipídicas e imunomodulação (Altmann, 2001) e representam mais de 30% do mercado farmacêutico (Kirkpatrick, 2002). Muitos deles foram isolados e suas estruturas foram caracterizadas no último século (Basso, *et al*., 2005). Plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando os constituintes da planta são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como materiais iniciais para a síntese de drogas ou como modelos para compostos farmacologicamente ativos (World Health Organization, 1998).

Estima-se que em 1997, o mercado mundial para produtos fitomedicinais foi de U$ 10 bilhões, com crescimento anual de 6,5% (Soldati, 1997). Muitos países como China e Índia, que possuem uma indústria de ervas medicinais consolidada, e países da América Latina têm investido em programas de pesquisa com plantas medicinais, seguindo o exemplo dos paises europeus (Rates, 2001). Por estes motivos a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere procedimentos básicos para a validação de drogas extraídas de plantas em países em desenvolvimento (Vulto e Smet, 1998; OMS, 1991).

Para a maioria das plantas, há dados insuficientes que garantam sua qualidade, eficácia e segurança (Calixto, 2000). No Brasil, as plantas medicinais são muito utilizadas, a maioria de acordo com as tradições populares (Rates, 2001),

práticas que podem levar a intoxicações agudas ou crônicas, pois não são amparadas pelo conhecimento científico necessário (Arnason *et al*., 1994). Considerando a diversidade da flora brasileira que contém 22% das plantas superiores existentes no planeta (Elizabetsky e Costa-Campos, 1996), ainda são pouco conhecidos os estudos científicos sobre os aspectos fitoquímicos e farmacológicos dos seus diversos gêneros de plantas. Atualmente, cientistas de diversas áreas estudam as substâncias naturais produzidas pelas diferentes espécies de vegetais, principalmente no que se refere às substâncias micromoleculares, devido a sua atividade biológica, valor terapêutico ou toxicidade (Balandrin *et al*., 1985; Alarcon *et al.*, 1990; Carvalho *et al.*, 1991; Da Costa *et al.,* 1998; Liu *et al.,* 2001; Damre *et al.,* 2003).

1.1 A família Amaranthaceae e o gênero *Alternanthera*

A família Amaranthaceae, estabelecida por A. L. Jussieu em 1789 (Siqueira, 1994/1995), é uma das famílias de vegetais da flora brasileira ainda pouco explorada quimicamente. Pertencente à classe Magnoliopsida e à ordem Caryophyllales (Cronquist, 1968) é constituída por aproximadamente 65 gêneros, dos quais 14 ocorrem no Brasil e 1000 espécies. São ervas anuais ou perenes, raramente subarbustos, que ocorrem em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Está dividida em quatro tribos: Celosieae, Amarantheae [alguns autores alteram o nome desta tribo para Achyrantheae (Furlan, 1986)], Braylineae e Gomphreneae. Os gêneros que ocorrem no Brasil estão distribuídos em três tribos: Celosieae, Achyrantheae e Gomphreneae. O gênero *Alternanthera* possui 180 espécies, sendo que destas, 30 ocorrem no Brasil (Siqueira e Guimarães, 1984). Juntamente com os

gêneros Blutaparon e Gomphrena, o gênero Alternanthera, apresenta espécies exclusivas do ecossistema de restinga, aparecendo tanto nos cordões arenosos e rochosos como também nas dunas, sendo portanto, espécies indicadoras pioneiras da ante-praia (Siqueira, 1987[a, b]). No entanto, outras espécies apresentam caráter cosmopolita, sendo encontradas em diferentes ambientes como o cerrado, campos rupestres, beiras de rio e centros urbanos (Siqueira e Guimarães, 1984).

Os estudos fitoquímicos realizados com algumas espécies de Amaranthaceae (Ferreira e Dias, 2000) e do gênero *Alternanthera* (Patterson *et al.,* 1991; Ferreira e Dias, 2000; Macedo *et al.,* 1999, Salvador et al, 2006) mostraram a ocorrência de alcalóides, antraquinonas, betalaínas, ecdisteróides, esteróides, terpenóides, flavonóides, saponinas e sapogeninas. O estudo de espécies dessa família pode ser justificado pela diversidade de constituintes químicos encontrados (Salvador e Dias, 2004), complexidade taxonômica, importância alimentícia (Gorinstein et al., 1991) e medicinal (Siqueira, 1987a/1987b). Entre as espécies descritas que foram avaliadas quanto à sua atividade biológica podemos citar *Amaranthus viridis* (Gorinstein *et al.,* 1991) que possui alto valor proteico comparável ao trigo, milho e soja; *Gomphrena martiana* apresenta atividade antitumoral (Pomilio *et al.*, 1994); *Gomphrena globosa* e *Alternanthera brasiliana* apresentam atividade analgésica (Macedo *et al.*, 1999) e anti-neoplásica (Meyer *et al.,* 1997); *Alternanthera philoxeroides* tem apresentado atividade inibidora do desenvolvimento do vírus HIV (Si-Man *et al.,* 1988); *Blutaparon portulacoides* possui alto teor de S, Ca, Fe, Cu, e Zn, apresenta atividade antibacteriana e diminuição na viabilidade de formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* (Zucchi *et al.,* 2000; Salvador *et al.,* 2000; Salvador *et al.,* 2001a; Salvador *et al,* 2002); *Gomphrena martiana* e *Gomphrena bolivia* possuem atividade

antimicrobiana (Pomilio *et al.,* 1994) e *Alternanthera sessilis* apresenta também propriedades hepatoprotetoras (Lin *et al.*, 1994).

Recentemente, nosso grupo avaliou o potencial imunomodulatório de extratos e flavonóides isolados da espécie *Alternanthera maritima*, demonstrando sua ação estimulatória no sistema imune humoral (Uecker *et al.*, 2002; Uecker *et al.*, 2003; Uecker, 2003). Atividades biológicas de extratos brutos e frações foram avaliadas por Salvador *et al* (1999) e Salvador e Dias (2004), que detectaram atividade antibacteriana, bem como de redução da viabilidade celular de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, e de formas amastigotas de cultura de *L. amazonensis* (Salvador *et al,* 1999; 2001b). Sabe-se que estes parasitas apresentam estreita inter-relação com o hospedeiro, sendo, portanto, importante se estudar como estes extratos bioativos interagem com o sistema imune do mesmo. As atividades biológicas se mostraram mais pronunciadas para os extratos brutos hexânicos e etanólicos, bem como as fases das partições dos extratos etanólicos e as substâncias identificadas.

Entre as várias espécies do gênero *Alternanthera* que vêm sendo estudadas, encontra-se a *Alternanthera tenella Colla*, uma planta herbácea, comumente conhecida como “enxuga” ou “perpétua do mato”, utilizada na medicina popular para tratar febre, infecções e inflamação (Rego, 1995). Frequentemente encontrada no norte do Brasil (Rego, 1995; Guerra *et al.*, 2003), é também encontrada na região urbana de Ribeirão Preto, estado de São Paulo (Salvador, 2005). Algumas propriedades desta espécie são descritas. Moraes *et al.* (1994) demonstraram que uma sub-fração do extrato aquoso, extraído das folhas de *Alternanthera tenella*, inibiu a proliferação de linfócitos vinte vezes mais que o extrato bruto onde a mesma função foi previamente observada. Guerra e colaboradores (2003) verificaram

aumento significante na produção de IgM e IgG2a em camundongos tratados com LPS após inoculação intraperitoneal de extratos de *A. tenella* e que extratos aquosos possuem atividade antitumoral. Estudos realizados na Universidade Federal do Maranhão (Silveira, 2000; Gallegos *et al.*, 2000) demonstraram atividade antibacteriana de *Alternanthera tenella* em ensaios *in vitro*.

1.2 O Sistema Imune e compostos vegetais imunomoduladores

O sistema imune é composto por redes complexas e altamente reguladas de várias células linfóides e outros tipos celulares que interagem por contato direto célula-célula e se comunicam através de mediadores solúveis, como as citocinas (Herzyk e Gore, 2004).

Plantas são uma fonte potencial de medicamentos tradicionais e substâncias químicas com propriedades úteis na modulação do sistema imune (Basso et al, 2005). Atividades imunoestimuladoras, imunossupressoras ou imunorregulatórias vem sendo investigadas utilizando-se grande número de plantas e seus constituintes isolados (Patwardhan; Manish, 2005), e esses estudos tem despertado interesse em todo o mundo como alternativa aos métodos terapêuticos tradicionais (Mehrotra *et al*., 2003). Várias plantas medicinais tem demonstrado efeitos antiinflamatórios, antiinfecciosos, anti-stress, anti-cancerígenos, entre outros, modulando as respostas imunes (Bin-Hafeez *et al*., 2003). Estes compostos que modificam as respostas imunológicas são denominados imunomoduladores.

Propriedades imunomoduladoras de várias plantas tem sido avaliadas (Sai-Ram et al, 1997; Borchers et al, 2000; Davis e Kuttan, 2000; Smit *et al*., 2000; Ross et al, 2001; Bin-Hafeez *et al*., 2003), visto que o sistema imune está envolvido na

etiologia e nos mecanismos fisiopatológicos de muitas doenças (Gokhale *et al.,* 2003). Com relação às Amaranthaceae, além dos trabalhos já mencionados com *A. tenella*, poucos são os estudos que investigam propriedades imunomoduladoras de plantas dessa família. *Amaranthus spinosus* (amaranto), utilizado como medicamento tradicional na China ou como vegetal cru para tratar diabetes, mostrou atividade imunoestimulante direta em linfócitos B de camundongos (Lin et al, 2005). Extrato hidroalcoólico de *Pfaffia glomerata* (ginseng brasileiro, fáfia) apresentou efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos em modelos utilizando ratos e camundongos (Neto et al, 2005). *Alternanthera brasiliana* exibiu potente atividade analgésica (Souza et al, 1998), e compostos isolados desta planta inibiram significantemente a proliferação de linfócitos humanos *in vitro* (Brochado et al, 2003).

A avaliação da segurança e eficácia de novas drogas e medicamentos, incluindo fitoterápicos e outros compostos botânicos, deve incluir a realização de ensaios pré-clinicos para avaliação de potenciais efeitos imunomoduladores e imunotóxicos (Putman et al., 2002, World Health Organization, 1998). A imunotoxicologia compreende o estudo do sistema imune como alvo de toxicidade de drogas e substâncias químicas (Descotes, 1992) e os métodos utilizados nestas avaliações muitas vezes são os mesmos empregados para o estudo da imunomodulação, inclusive para produtos naturais derivados de plantas.

Esses agentes imunomoduladores, avaliados por vários estudos in vitro, in vivo e em ensaios clínicos, podem estimular macrófagos, promover a formação de anticorpos, ativar o sistema complemento, aumentar a proliferação de linfócitos T, modular e a secreção de citocinas. Podem, por outro lado, agir como imunossupressores, alguns deles sendo usados clinicamente para o tratamento de artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e várias outras doenças inflamatórias

e infecciosas (Li, 1991; Benencia *et al.,* 2000; Davis e Kuttan, 2000; Plaeger, 2003). Vários testes podem ser utilizados para avaliar a imunomodulação e imunotoxicidade de substâncias ou compostos, como drogas, produtos químicos e extratos de vegetais, brutos ou derivados (Luster *et al.*, 1992). Ensaios de proliferação de linfócitos frente a mitógenos, reação mista de linfócitos e reações de hipersensibilidade retardada podem ser usados para avaliar o potencial sobre a imunidade mediada por células; ensaios de células produtoras de anticorpos, ou células formadoras de placas (PFC, *plaque forming cells*) e ensaios para produção de anticorpos específicos avaliam os efeitos sobre a imunidade humoral; e testes de função de macrófagos, neutrófilos e modelos de reação inflamatória avaliam os efeitos sobre a imunidade inata ou inespecífica. Desta forma, todos os compartimentos da resposta imune podem ser investigados. Três ensaios em particular possuem sensibilidade e especificidade suficientes para serem considerados como testes de triagem: o ensaio de PFC, a determinação do fenótipo de células do sistema imune e a anergia induzida (Hastings *et al.*, 1997).

A resposta primária de anticorpos contra um antígeno T-dependente, que pode ser avaliada pela enumeração de PFC ou pela quantificação de imunoglobulinas séricas, é considerada como uma avaliação geral da função imune por analisar, concomitantemente, vários componentes do sistema imune (por exemplo, macrófagos, células T *helper* e linfócitos B) envolvidos na resposta a um antígeno específico. Qualquer alteração induzida pelo agente testado (composto vegetal, droga, substância isolada) no processamento e apresentação do antígeno, síntese e liberação de interleucinas, proliferação celular, diferenciação e/ou secreção de mediadores provavelmente modificará a resposta esperada (Herzyk e Gore, 2004; Luster, 1992).

A determinação do fenótipo de células do sistema imune por citometria de fluxo, embora não seja um teste adequado quando usado isoladamente para avaliar efeitos de substâncias no sistema imune, apresenta uso ótimo quando em combinação com ensaios funcionais, como o PFC (Burchiel et al, 1999). Além da imunofenotipagem, a citometria de fluxo tem sido aplicada para investigação de parâmetros funcionais, como por exemplo a avaliação da ativação de linfócitos pela medida da expressão de marcadores de superfície nas diferentes subpopulações. Marcadores de ativação de linfócitos são glicoproteínas de superfície celular expressas como marcadores fenotípicos ou identificadores de diferentes estágios de maturação da célula. Moléculas envolvidas na ativação ou regulação de linfócitos B incluem CD40 e CD69, e de linfócitos T incluem CD45, CD25 e CD69. CD40 representa um papel central na ativação e proliferação de células B, dependentes de célula T, via interação com ligante de CD40 (CD40L). CD69 é um marcador de ativação precoce expresso em linfócitos B e T e células NK seguindo a estimulação por agentes mitogênicos. CD45 é uma tirosina-fosfatase de membrana envolvida na sinalização do receptor de células T, que podem expressar múltiplas isoformas desta proteína dependendo do estado de ativação e diferenciação da célula (Biella et al, 2006). CD25 (cadeia α do receptor de IL-2) é expresso em células T convencionais após estimulação e tem sido utilizado para definir subpopulações de células T regulatórias ou supressoras, importantes na manutenção da auto-tolerância imunológica (Sakaguchi, 2005).

A avaliação da capacidade de indução de apoptose também pode ser aplicada como indicador de citotoxicidade e/ou imunomodulação induzida por compostos vegetais nos diferentes órgãos linfóides (Elmore, 2006a; Elmore, 2006b).

1.3 Artrite Reumatóide

Na medicina popular é bastante freqüente o uso de plantas e seus derivados para auxílio no tratamento de doenças reumáticas, como a artrite e outras formas de reumatismo. Entre as doenças auto-imunes sistêmicas, que apresentam intensa reação inflamatória, a artrite reumatóide (AR) acomete as articulações e alguns tecidos (Arnett et al., 1988). A terapia visa frequentemente a diminuição desta resposta e o tratamento das seqüelas da inflamação descontrolada (Sundy & Haynes, 1998). A AR é uma doença crônica de causa desconhecida que afeta cerca de 0,5 a 1% da população mundial, sendo diagnosticada clinicamente por sintomas típicos de doença articular e extra-articular, segundo critérios estabelecidos pela American Rheumatism Association e revisados em 1987 (Arnett et al., 1988). É uma doença inflamatória que afeta as pequenas articulações das extremidades, como também ombros, cotovelos, joelhos e tornozelos (Abbas, 2003), causando dor, inchaço, deformidade, rigidez e eventualmente perda das funções das articulações (Soeken, *et al.,* 2003). Anormalidades típicas da doença incluem altos títulos de anticorpos IgM contra IgG (fator reumatóide), hipergamaglobulinemia policlonal e anemia das doenças crônicas (Sundy e Haynes, 1998), sendo a presença de fatores reumatóides utilizada como teste diagnóstico para artrite (Abbas, 2003). A AR é caracterizada pela inflamação do tecido sinovial, associada à destruição da cartilagem das articulações e dos ossos (Abbas, 2003), destruição das articulações que suportam os ligamentos e tendões e formação de pannus (Carson, 1993; Hale & Haynes, 1997; Sundy e Haynes, 1998).

Embora muito se conheça sobre a etiologia e patogênese da AR, o entendimento das vias imunológicas envolvidas permanece incompleto. Esse entendimento é ainda mais complicado quando se considera o envolvimento de

genes de susceptibilidade, etiologias ligadas a fatores ambientais e exposição a agentes infecciosos. As manifestações clínicas e patológicas da AR resultam da interrelação dessas diferentes vias. Conceitos atuais sobre a patogênese da AR, suportados por modelos animais, estudos laboratoriais e observação clínica, restabeleceram e revisaram alguns dos paradigmas originais, que enfatizavam a importância de auto-anticorpos e imunocomplexos na iniciação da doença, sugeriam um papel para células T na resposta inflamatória característica da AR e baseavam a perpetuação da doença no desequilíbrio das redes de citocinas (FIRENSTEIN, 2005). Embora considerada por décadas como uma doença mediada predominantemente por linfócitos T e macrófagos, mais recentemente tem-se obtido evidências crescentes de um papel fundamental das células B na desregulação imune que ocorre na AR. Esta visão renovada da importância do linfócito B foi impulsionada pela constatação de melhoras clínicas em pacientes com AR que foram submetidos a depleção de células B por anticorpo monoclonal anti-CD20 (rituximab), e seu potencial terapêutico tem sido avaliado em várias outras doenças auto-imunes, como LES, Síndrome de Sjögren, esclerose múltipla, entre outras (Looney, 2007).

Vários estudos na última década revelaram funções extraordinariamente diversas para os linfócitos B no sistema imune, além da produção de anticorpos. Hoje reconhece-se que estas células são importantes no desenvolvimento, regulação e ativação da arquitetura linfóide, na regulação de funções de células dendríticas e subpopulações de células T através da produção de citocina (Browning, 2006; Martinez-Gamboa *et al.,* 2006).

1.4 Modelos experimentais de Artrite Reumatóide

Modelos experimentais de artrite em roedores têm sido úteis na elucidação dos mecanismos de auto-imunidade e inflamação envolvidos na patogênese de doenças das articulações e em testes na busca de agentes terapêuticos potenciais (Wooley *et al.,* 1989), incluindo produtos derivados de plantas (Coelho *et al.*, 2001; Coelho *et al.*, 2004; Ngoc *et al*., 2005).

Modelos bem estabelecidos e amplamente utilizados incluem artrite induzida por colágeno (Trentham *et al.*, 1977), artrite induzida pela parede celular de streptococcus (Cromartie *et al.*, 1977), artrite induzida por adjuvantes (Pearson, 1956) e o modelo de doença MRL *lpr/lpr* (Hang *et al.*,1982; Wooley *et al.*, 1989). A artrite induzida por colágeno (CIA, collagen-induced arthritis), mediada por células T, utiliza proteínas de cartilagem como o colágeno do tipo II (CII) e colágeno do tipo XI (CXI), em roedores (Holmdahl *et al.*, 2001). Os animais recebem uma injeção intradérmica de colágeno, emulsificado em adjuvante de Freund, que induz uma poliartrite erosiva grave após 2 ou 3 semanas de imunização (Holmdahl *et al.*, 2001). Pesquisadores utilizam esse modelo administrando extratos de plantas aos animais para avaliar seus efeitos antiinflamatórios e imunomoduladores na doença (Niizawa *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 2004). A linhagem de camundongo MRL-*lpr* desenvolve espontaneamente manifestações de auto-imunidade com características de artrite reumatóide, como alto título de fator reumatóide no soro (Singer *et al*., 1994; Abbas, 2003). A artrite pode ser induzida por componentes de parede bacteriana ou outros componentes que contenham peptídeos, requeridos para a ligação com moléculas do MHC (Complexo de Histocompatibilidade Maior) (Holmdahl *et al.*, 2001). A artrite também pode ser induzida por adjuvantes não imunogênicos como adjuvante

incompleto de Freund, avridine, squalene e pristane. A artrite induzida por pristane e avridine é crônica, específica para as articulações e apresenta os critérios clínicos da artrite reumatóide, inclusive a presença de fatores reumatóides (Holmdahl *et al.*, 2001).

Apesar de cada um desses modelos experimentais apresentarem similaridades com a artrite reumatóide, nenhum deles é capaz de reproduzir todos os aspectos da doença humana e sua complexidade de manifestações (características patológicas, imunológicas e genéticas). Os vários modelos animais podem ser usados para delinear as diferentes vias que levam à artrite (Holmdahl *et al.*, 2001).

O modelo de artrite induzida pela administração de pristane em camundongos também é bastante descrita na literatura (Wooley *et al.*, 1989; 1998; Morgan *et al.*, 2004; Patten *et al.*, 2004). Potter e Wax (Potter e Wax, 1981) investigando a indução de plasmacitoma em camundongos BALB/c pela administração intraperitoneal de pristane (2,6,10,14-tetrametilpentadecano), descreveram que este hidrocarboneto induziu uma doença inflamatória nas articulações dos animais. Camundongos injetados com pristane desenvolveram sinais clínicos de artrite nas articulações dos tornozelos e dos punhos. O exame histológico das patas afetadas demonstrou características de artrite inflamatória (Wooley *et al.*, 1989). Estudos posteriores sugeriram que a artrite induzida por pristane pode apresentar ambos os aspectos imunológicos e genéticos da doença (Wooley *et al.*, 1989).

Linhagens de camundongos selecionadas geneticamente têm sido desenvolvidas para proporcionar maior esclarecimento da patogênese da artrite reumatóide (Sundy e Haynes, 1998). Recentemente a utilização do modelo de artrite induzida por pristane foi descrita em camundongos AIRmax e AIRmin (Vigar *et al*., 2000). Estas linhagens não isogênicas designadas por reação inflamatória aguda

(AIR), máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin) (AIR) foram obtidas através de seleção genética bidirecional, partindo de uma população altamente polimórfica (F0) obtida pelo intercruzamento de oito linhagens de camundongos isogênicos (A, DBA2, P, SWR, CBA, SJL, BALB/c e C57BL/6) (Stifell *et al.*, 1990). O fenótipo AIR foi determinado pelo influxo local de leucócitos e pelo exsudato de proteínas do plasma medidas 48 horas após a injeção subcutânea de “beads” de poliacrilamida, uma substância química inerte, não antigênica e insolúvel (Stifell *et al.,*1987). A diferença progressiva das linhagens AIRmax e AIRmin nas gerações sucessivas da criação seletiva, aumentou 10 e 2,5 vezes respectivamente, as diferenças na infiltração de leucócitos e no exsudato de proteínas. Essas diferenças resultaram no acúmulo de alelos dotados com efeitos opostos na resposta inflamatória (Stifell *et al.*, 1992).

Considerando a utilização da *Alternanthera tenella Colla* na medicina popular para tratamento de febre, infecções e inflamação (Guerra *et al.*, 2003), e algumas atividades biológicas já demonstrada, seus extratos serão avaliados em modelo experimental utilizando camundongos BALB/c, quanto à sua ação imunomoduladora; e em modelo de artrite auto-imune experimental em camundongos AIRmax quanto à sua atividade moduladora e antiinflamatória.

2. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Avaliar a ação imunomoduladora dos extratos de *Alternanthera tenella* Colla no sistema imunológico de camundongos BALB/c e em modelo de artrite induzida por pristane em camundongos AIRmax.

Objetivos Específicos

Avaliar o efeito de extratos e substâncias isoladas de A. *tenella* em camundongos BALB/c em:

- Peso corporal e de órgãos e celularidade do baço;
- Resposta imune humoral induzida por antígeno T-dependente (eritrócitos de carneiro - EC): enumeração de linfócitos produtores de anticorpos (PFC), título de anticorpos circulantes anti-EC (ELISA);
- Edema de pata induzido por carragenina;
- Populações de linfócitos esplênicos (imunofenotipagem) e sobre a expressão de marcadores de ativação celular (citometria de fluxo);
- Capacidade de indução de apoptose em linfócitos.

Avaliar efeitos modulador e/ou terapêutico do extrato aquoso de *A. tenella* extraído a frio (AF) na artrite experimental induzida por pristane em camundongos AIRmax.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c machos, pesando de 20 a 25g, cobaias e carneiros (para colheita de sangue) fornecidos pelo Biotério Central do Campus USP – Ribeirão Preto e camundongos AIRmax, gentilmente fornecidos pelo Prof. Dr. Marcelo De Franco do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan que foram mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Câmpus da USP de Ribeirão Preto (protocolo nº 04.1.474.53.9).

3.2 Extratos de *Alternanthera tenella* Colla

Extratos brutos orgânicos (etanólico e hexânico), aquosos, frações e substâncias isoladas (flavonóides), obtidos da planta *A. tenella*, foram fornecidos pelo Núcleo de Produtos Naturais da FCFRP/USP. O material vegetal foi coletado em seu habitat natural (Ribeirão Preto, SP) em maio de 2002. A identificação botânica foi efetuada pelo Prof. Dr. Josafá Carlos de Siqueira da Pontifícia Universidade Católica (PUC) do Rio de Janeiro sendo depositada uma amostra no herbário da FFCLRP-USP sob o número SPFR 02968. Os métodos e esquemas de extração foram realizados por Marcos José Salvador, sob orientação da Profa. Dra. Diones Aparecida Dias do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP (Salvador, 2005).

Amostras da planta total, após secagem em estufa com ar circulante a 40º C, foi pulverizado em moinho de faca. O pó seco foi submetido ao processo de maceração com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (hexano para baixa polaridade e etanol para alta polaridade), na proporção massa de

pó/solvente 1:2 (massa/volume). Das soluções obtidas, foram removidos os solventes (sob pressão reduzida), resultando nos diferentes extratos brutos (figura 1).

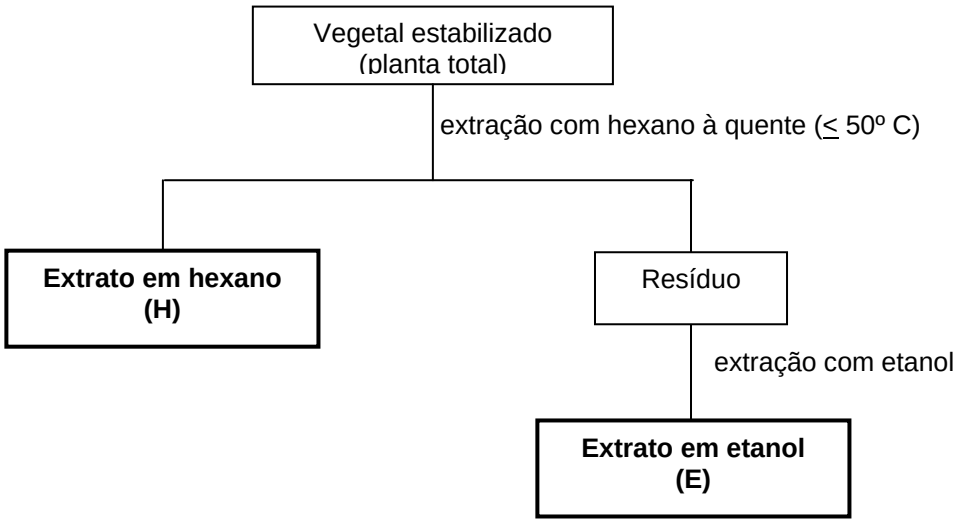

Figura 1 - Esquema da preparação dos extratos brutos extraídos em solventes orgânicos. Adaptado de Salvador, 2005.

Uma parte do material vegetal fresco foi triturada e submetida à extração com água deionizada para a obtenção dos extratos aquosos liofilizados a frio e a quente (figura 2).

O extrato bruto em etanol (E), foi submetido ao processo de extração líquido-líquido, demonstrado na figura 3. A fase etanólica, obtida da partição, contendo saponinas, flavonóides e outros compostos polares, foi solubilizada e submetida à extração com n-butanol para a obtenção da fase butanólica (FB).

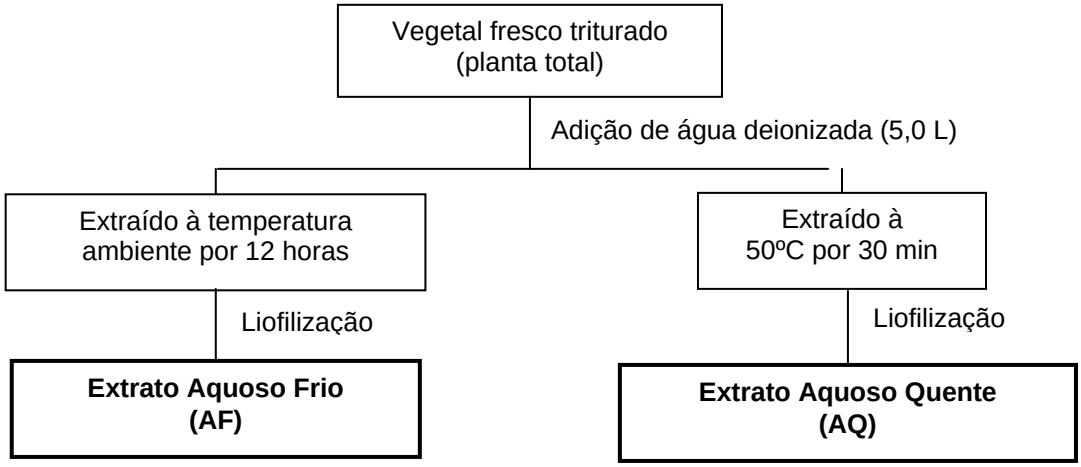

Figura 2 - Esquema da preparação dos extratos aquosos a partir do vegetal fresco. Adaptado de Salvador, 2005.

Os constituintes químicos das frações foram isolados e purificados por processos cromatográficos diversos (Salvador, 2005). Da fase butanólica foram identificados, entre outras substâncias (saponinas esteroidais, alcalóides e um nucleosídeo), os flavonóides A11, A12, A18, A19, A21 e A23 (Salvador, 2005). A18 (2”-O-α-L-ramnopiranosilvitexina) e A19 (2”-O-α-L-glucopiranosilvitexina) são os flavonóides avaliados neste estudo, cujo esquema de extração está representado na figura 4.

As substâncias utilizadas foram os extratos brutos orgânicos etanólico (E), hexânico (H) e FB (fase butanólica do extrato etanólico), fração 39-49 (contém flavonóides, predominantemente A18 e A19), os flavonóides A18 e A19 e os extratos aquosos frio (AF) e quente (AQ).

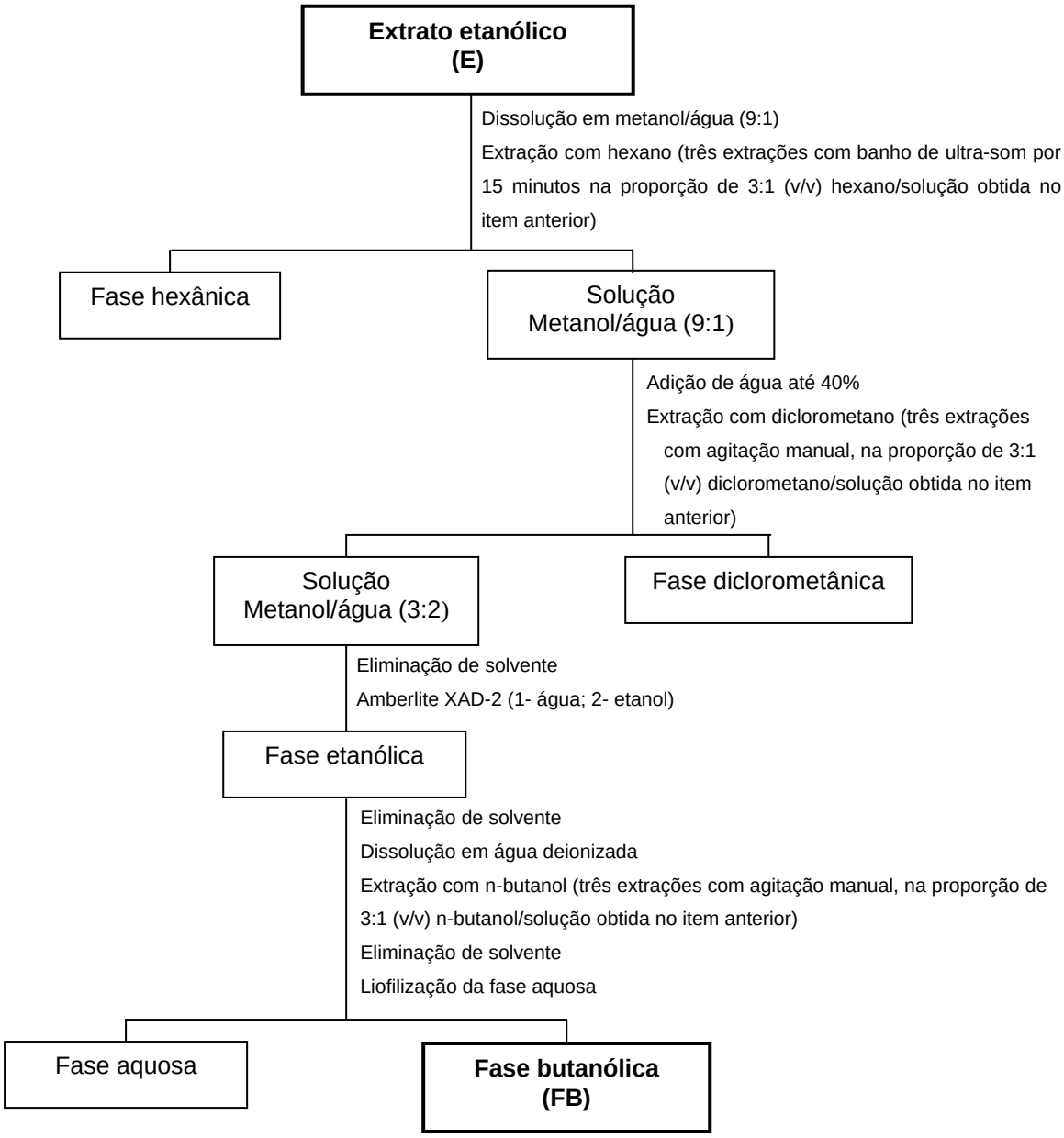

Figura 3 – Esquema da partição do extrato etanólico bruto e obtenção da fase butanólica. Adaptado de Salvador, 2005.

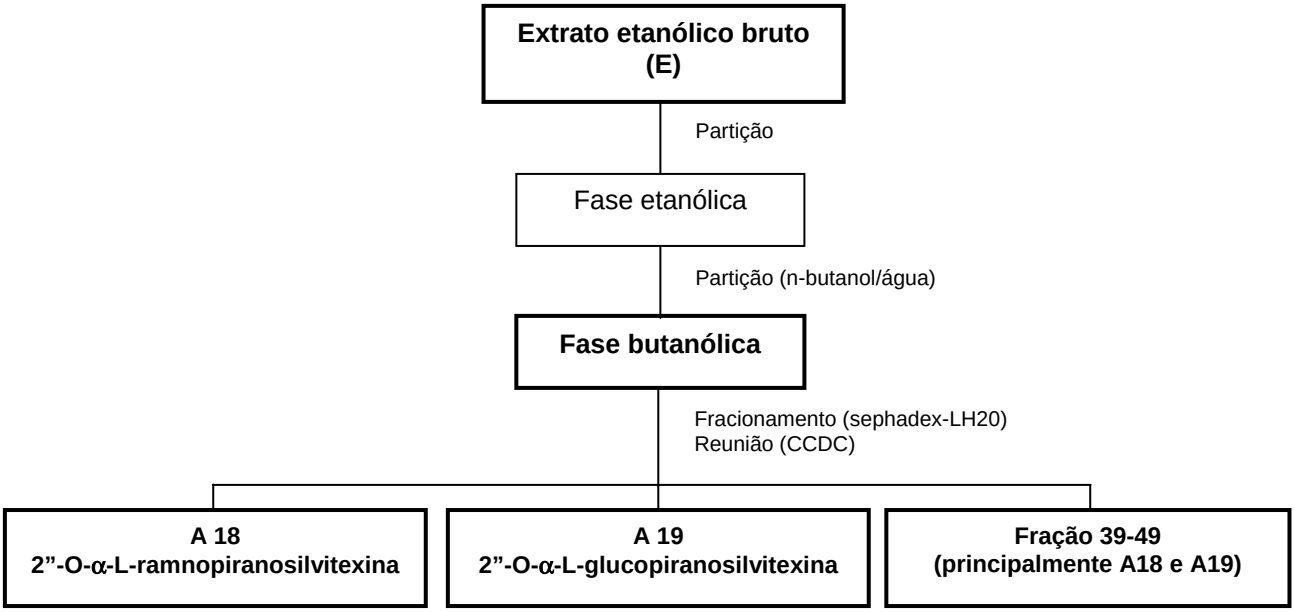

Figura 4 – Esquema de isolamento dos constituintes químicos do extrato bruto etanólico. Adaptado de Salvador, 2005.

3.3 Determinação do peso corporal e dos pesos de órgãos linfóides

Grupos de animais controles e experimentais foram tratados via intraperitoneal com 0,2 mL dos veículos e com dose única dos extratos, frações ou substâncias isoladas de *A. tenella*, respectivamente. A imunização com 0,1 mL de eritrócitos de carneiro (EC) a 25% em salina estéril, ocorreu concomitantemente por via retro-orbital. Os animais pertencentes ao grupo controle negativo receberam apenas propilenoglicol (PPG) 40% ou salina estéril via intraperitoneal. A eutanásia foi realizada por deslocamento cervical, após 4 ou 14 dias, de acordo com a necessidade do experimento realizado. Camundongos BALB/c foram tratados com 50, 100 e 200 mg/Kg dos extratos brutos (orgânicos e aquosos) e com 5, 15 e 30 mg/kg dos flavonóides, para a avaliação do peso corporal e de órgãos, celularidade do baço, enumeração de PFC e determinação do título de anticorpos circulantes.

O peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais foi determinado antes e após 4 e 14 dias do tratamento com os extratos (dose única). Também foram determinados os pesos de órgãos vitais como fígado, baço e timo logo após a eutanásia dos animais.

3.4 Avaliação da celularidade do baço e preparação das células

Os baços de camundongos BALB/c foram coletados em solução salina tamponada de Hanks (HBSS). Após divulsão dos órgãos, as células foram lavadas por três vezes no mesmo meio sendo tratadas com 3 mL de tampão de lise de hemácias (Tris-NH_4Cl) após a primeira lavagem, e contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade foi avaliada por exclusão do corante Azul de Trypan.

3.5 Enumeração de células formadoras de anticorpos (PFC)

O número de células formadoras de placas foi determinado pelo Método da Agarose, baseado no ensaio descrito por Jerne e Nordin, 1963. O volume de 0,1 mL da suspensão de 1 x 10^6 células esplênicas de animais dos diferentes grupos foram adicionadas a tubos de hemólise contendo 0,4 mL de agarose “low melting point” 0,5% em solução Balanceada de Sais de Hanks (HBSS) e 50 μL de eritrócito de carneiro (EC) 5%. Os tubos foram mantidos em banho a 37º C. Em seguida o conteúdo dos tubos foi vertido em lâminas contendo “pré-coat” de agarose 0,5% em água. Após a solidificação as lâminas foram posicionadas em suporte apropriado para PFC e incubadas por duas horas e meia a 37ºC e 5% de CO_2. Em seguida foi adicionado soro de cobaia diluído em HBSS a 1:4 (fonte de complemento),

previamente absorvido com EC, realizou-se nova incubação por 40 minutos (37º C e 5% de CO_2) e as placas de hemólise foram contadas.

3.6 Preparação do antígeno de hemácias de carneiro

Antígenos de membrana de hemácias de carneiro parcialmente purificados foram preparados de acordo com procedimento descrito por Temple *et. al*., 1993, com algumas adaptações. Todos os experimentos foram realizados a 4ºC. Resumidamente, um volume de 400 mL de sangue de carneiro foi colhido com solução Alséver na proporção 1:2. As hemácias foram centrifugadas por 15 minutos a 1000xg, removendo-se o sobrenadante e interface e foram ressuspensas em 5 volumes de NaCl 0,9% por três vezes. As hemácias precipitadas foram ressuspensas em 2 volumes de Tris-HCl 0,05 M e EDTA 0,1 mM (pH 7.6), homogeneizadas e centrifugadas a 25.000xg por 30 minutos. Esse processo foi realizado até ausência de cor. Em seguida, o sedimento foi filtrado em 3 camadas de gaze, novamente centrifugado e ressuspenso em dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,1% com azida a 0,02% (três vezes o volume do sedimento). Os antígenos de membrana solubilizados foram dialisados contra SDS 0,1% em PBS a temperatura ambiente. A quantidade de proteína na preparação de antígenos foi determinada de acordo com o procedimento de Bradford (1976).

3.7 Determinação do título de anticorpos circulantes (ELISA)

As placas de microtitulação (Costar – High Binding) foram incubadas com 125 μL por poço de uma suspensão de 5 μg/mL do antígeno de membrana de EC em PBS pH 7,2 e incubadas “overnight” a 4ºC. As placas foram lavadas com 200

μL/poço de PBS-Tween 20 0,05%, três vezes. Em seguida adicionou-se 200 μL de leite em pó Molico® 3% em PBS (solução de bloqueio). Após incubação de duas horas a temperatura ambiente, foi realizada a lavagem com PBS-Tween (3 vezes) e acrescentou-se 125 μL de soro dos camundongos, diluído 1:8 em PBS-Tween 20 0,05%. Incubou-se uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas e acrescentou-se os anticorpos anti-IgG (diluídos 1:1000 em PBS-Tween 20 0,05%) e anti-IgM (1:2000) de camundongo marcados com a enzima HRPO (Horseradish peroxidase Caltag, USA), 125 μL/poço e procedeu-se nova incubação por uma hora a temperatura ambiente. Após esse período as placas foram novamente lavadas e para revelação, foram adicionados 200 μL/poço de substrato OPD (Sigma Fast™ OPD, Sigma-Aldrich) com incubação de 20 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. A reação foi interrompida com H_2SO_4 2 M (75 μL/ poço). As leituras foram realizadas a 490 nm em leitor de ELISA (Spectramax Plus – Molecular Devices), utilizando o programa Softmax.

3.8 Edema de pata induzido por carragenina

Os camundongos BALB/c receberam 0,2 mL de extratos ou fração, indometacina 5 mg/kg ou veículo (salina ou PPG 40%), via intraperitoneal. Foram utilizadas as doses de 100, 200, 400 e 700 mg/Kg para os extratos brutos e as doses de 30, 50 e 80 mg/Kg para a fração 39-49. Após 1 hora, o edema foi induzido por injeção de 50 μL de carragenina 1% na pata esquerda traseira do animal. O inchaço foi aferido utilizando-se um medidor de espessura (Mitutoyo) imediatamente antes da injeção de carragenina, após 30 minutos e depois a cada uma hora até 5

horas. Os animais foram divididos em grupos: controle negativo (veículo); tratados (que receberam os diferentes extratos); controle positivo (indometacina 5 mg/kg).

3.9 Análises de subpopulações de linfócitos esplênicos e da ativação de linfócitos por citometria de fluxo

Os camundongos BALB/c foram divididos em grupos (n=6) controle negativo, controle positivo (imunizados), tratados não-imunizados e tratados imunizados. Foram utilizados 100 mg/kg do extrato aquoso AF ou 200 mg/kg do extrato aquoso AQ. Grupos controles e tratados receberam via intraperitoneal 0,2 mL de salina estéril (veículo) ou dose única dos extratos, respectivamente. A imunização com 0,1 mL de eritrócitos de carneiro (EC) a 25% em salina estéril, ocorreu concomitantemente por via retro-orbital nos grupos controle positivo e tratados imunizados. Os baços dos camundongos foram coletados em HBSS e após divulsão dos órgãos, as células foram lavadas e contadas conforme descrito no item 3.4.

Foram realizadas análises por citometria de fluxo para identificar e quantificar populações de linfócitos presentes no baço dos animais dos diferentes grupos experimentais e avaliar a expressão de marcadores de ativação celular. Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com FITC (Fluorescein isothiocyanate) ou PE (Phycoerythrin): anti-CD19 (linfócitos B), anti-CD3 (linfócitos T totais), anti-CD4 (linfócitos T helper), anti-CD8 (linfócitos T citotóxicos) e os marcadores de ativação anti-CD40 (linfócitos B), anti-CD69 (linfócitos T e B), anti-CD25 (linfócitos T) e anti-CD45RB (linfócitos T). Células esplênicas na concentração de 1 x 10^6 ressuspensas em 100 μL de PBS-FACS (PBS-SBF-azida), foram incubadas com 1μL dos anticorpos monoclonais por 30 minutos a 4ºC no escuro. Em

seguida as hemácias foram lisadas com Tris-NH_4Cl, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS com 1% de formol para incubação "overnight" a 4ºC e posterior análise. A população de linfócitos foi selecionada através dos parâmetros de tamanho (FSC) e de granularidade (SSC). A utilização de anticorpos não relacionados (isotipos controles) definiu o limite entre as populações positiva e negativa para cada anticorpo utilizado. As leituras foram realizadas em equipamento FACSCanto (Becton Dickinson) e os dados analisados pelo programa Diva.

3.10 Avaliação da indução de apoptose

Avaliação da fragmentação de DNA em gel de agarose

As células esplênicas dos animais dos diferentes grupos descritos no item acima foram lisadas, centrifugadas, tratadas com RNAse A e proteinase K. Em seguida foi adicionado acetato de amônio, sendo o DNA precipitado com etanol absoluto e ressuspenso em tampão TE. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio, para análise da fragmentação.

Detecção da externalização de fosfatidilserina por citometria de fluxo

Foi realizada a análise da indução da apoptose através da expressão de fosfatidilserina na superfície de linfócitos pela ligação com anexina-V (AV). Linfócitos esplênicos dos camundogos descritos no item 3.9, separados por Ficoll, foram lavados duas vezes em HBSS e em seguida em tampão de ligação. As células, 2 x 10^6 em tampão de ligação, foram incubadas com AV conjugada com FITC e após incubação de 20 min no escuro, foi adicionado o iodeto de propídeo (PI). A leitura foi

realizada em equipamento FACSCanto (Becton Dickinson) e os dados analisados pelo programa Diva.

3.11 Indução e avaliação da presença de artrite induzida por pristane e investigação do efeito do extrato Aquoso Frio (AF) na PIA

Camundongos AIRmax, obtidos por seleção genética para reação inflamatória aguda máxima, foram utilizados para avaliar o efeito do extrato aquoso AF na artrite induzida por pristane. Os camundongos, fornecidos pelo Prof. Dr. Marcelo de Franco, Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan (São Paulo), receberam duas injeções intraperitoneais de 0,4 mL de pristane (SIGMA, St Louis, USA) com intervalo de 60 dias entre uma e outra injeção. Os animais foram divididos em 4 grupos:

Grupo 1 (G1): Avaliação do efeito modulador do extrato aquoso AF. Os camundongos (n=15) receberam o extrato antes e logo após a primeira injeção de pristane. O esquema encontra-se representado na figura 5;

Grupo 2 (G2): Avaliação do efeito terapêutico do extrato aquoso AF. Os camundongos (n=16) receberam o extrato após as duas injeções de pristane. O esquema encontra-se representado na figura 6;

Grupo 3 (G3): Controle negativo. Os camundongos (n=15) receberam apenas o extrato, de acordo com o esquema do grupo 1.

Grupo 4 (G4): Controle positivo. Os camundongos (n=15) receberam apenas as injeções de pristane.

Grupo 5 (G5): Animais que não foram tratados com pristane e extrato AF. Foram utilizados nos ensaios de avaliação das subpopulações de linfócitos esplênicos e

sobre a ativação de linfócitos na PIA e na avaliação da indução de apoptose em camundongos AIRmax .

O desenvolvimento da artrite foi observado por aproximadamente 215 dias. A cada 15 dias verificou-se o peso dos animais, patas e articulações. As medidas começaram 60 dias após as injeções de pristane. O edema das patas foi mensurado com um medidor de espessura (Mitutoyo) e o inchaço das articulações foi avaliado visualmente quanto à sua gravidade através da pontuação de cada uma das quatro patas. O índice foi determinado pela soma dos pontos de cada pata, variando de 0 a 12 e a artrite foi considerada positiva quando a soma dos pontos foi igual ou superior a 4. Foi coletado sangue dos camundongos a cada 30 dias. A eutanásia foi realizada por deslocamento cervical ao final do período de observação, patas e os baços foram removidos para análises posteriores.

As células do baço dos camundongos AIRmax foram analisadas para a avaliação das subpopulações de linfócitos esplênicos e ativação de linfócitos por citometria de fluxo (descritos no item 3.9), e para a avaliação da indução de apoptose através da avaliação da fragmentação de DNA em gel de agarose e da detecção da externalização de fosfatidilserina por citometria de fluxo, descritas no item 3.10.

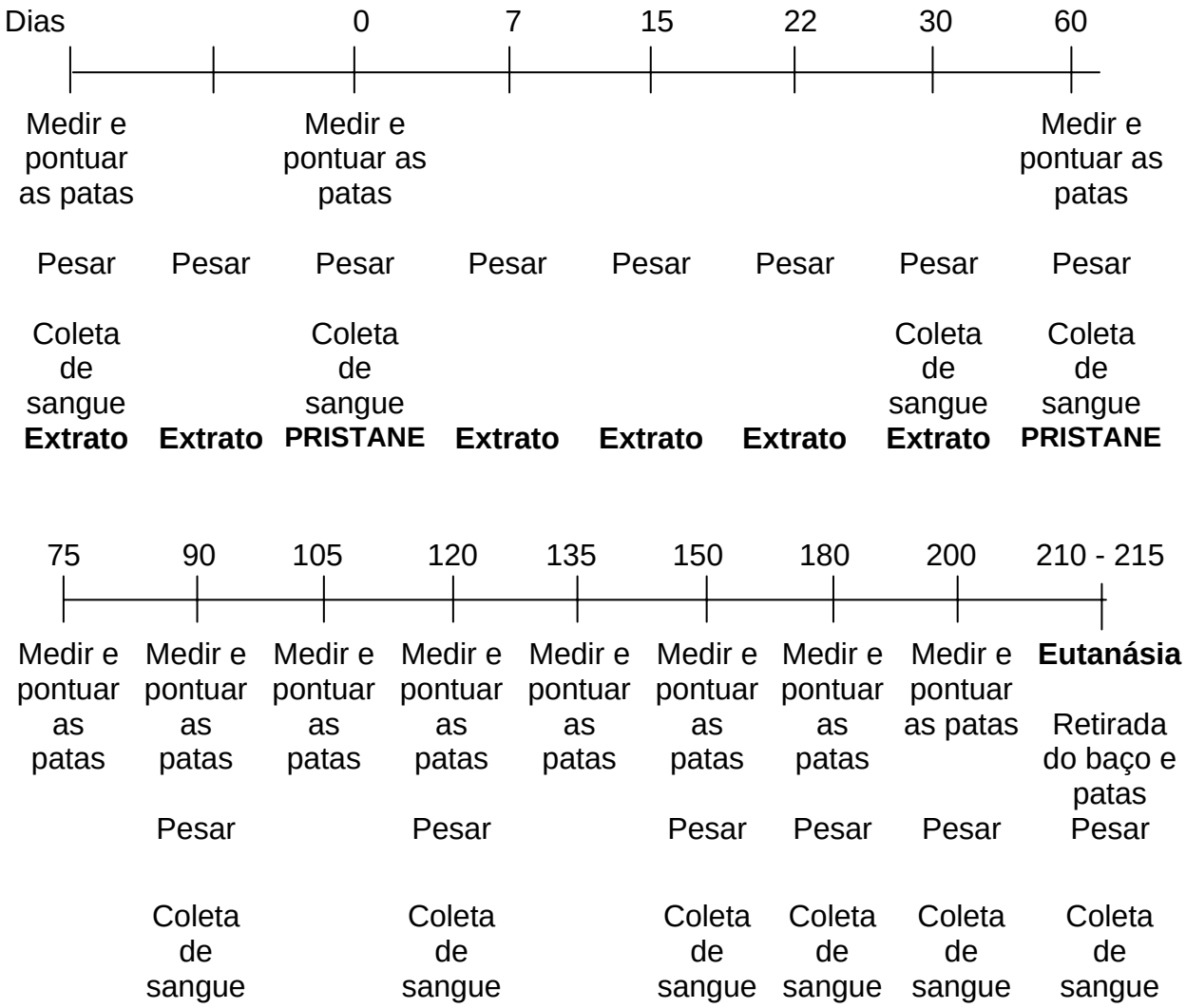

Figura 5 - Esquema do tratamento dos camundongos AIRmax do G1 com o extrato AF na artrite induzida por pristane.

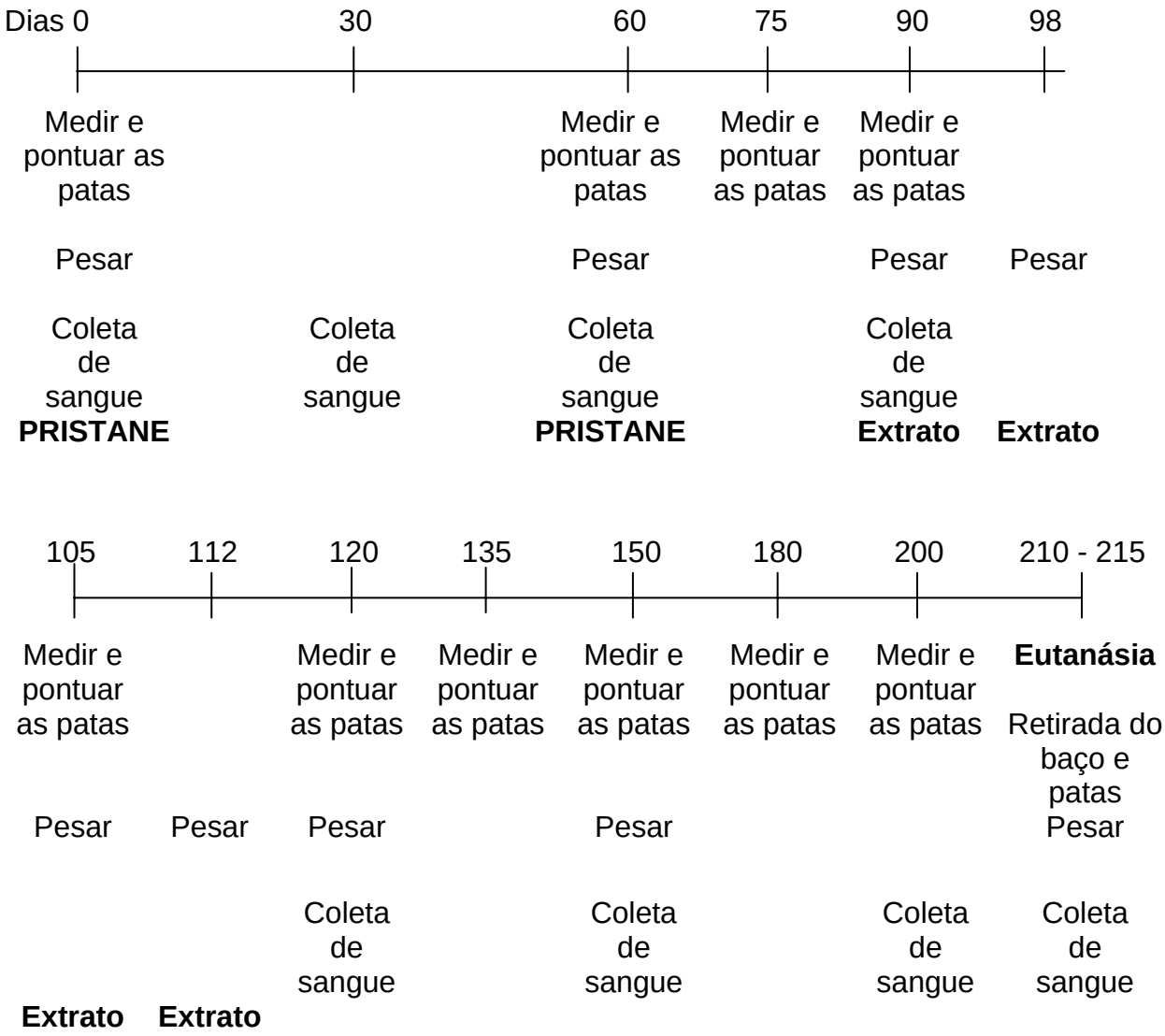

Figura 6 - Esquema do tratamento dos camundongos AIRmax do G2 com o extrato AF na artrite induzida por pristane.

3.12 Análise dos resultados

Os resultados estão expressos como a média ± erro padrão dos experimentos realizados. A avaliação estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. Nos ensaios de edema de pata os resultados estão expressos como a média ± desvio padrão e a avaliação estatística foi realizada por análise de variância de dois critérios (ANOVA TWO-WAY), seguida de teste para comparações múltiplas (Bonferroni). Os níveis de significância foram estabelecidos em $p<0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito dos extratos brutos orgânicos, aquosos, frações e flavonóides no peso relativo dos órgãos dos camundongos

Não foi verificada alteração no peso dos animais e peso de órgãos como o timo, fígado e baço, quatro dias após a administração das diferentes doses dos extratos etanólico (E), hexânico (H), fase butanólica (FB) e flavonóides A18 e A19 utilizados na realização dos ensaios de avaliação da celularidade do baço, PFC e dosagem de anticorpos.

4.1.1 Extrato aquoso frio (AF) e extrato aquoso quente (AQ)

A administração dos extratos aquosos nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg para a realização dos ensaios de avaliação da celularidade do baço, PFC e dosagem de anticorpos dos animais, após quatro dias, não alterou o peso corporal e dos órgãos avaliados (tabelas 1 e 2), não demonstrando, portanto aparente toxicidade neste período. Para a realização do ensaio de edema de pata, foi utilizada uma dose maior dos extratos aquosos (400mg/kg). Os camundongos foram observados por 14 dias, quando seus órgãos também foram avaliados quanto ao peso (tabela 3). Quatro camundongos (66,6%) morreram uma semana após receberem a injeção intraperitoneal de 400 mg/kg do extrato aquoso frio (AF) e outros dois camundongos (33,3%) morreram após a injeção de 400 mg/kg do extrato aquoso quente (AQ). Os camundongos restantes que sofreram a eutanásia e tiveram seus órgãos retirados e pesados não demonstraram diminuição no peso dos mesmos.

Tabela 1 – Efeito do extrato aquoso AF sobre o peso corporal e peso relativo dos órgãos de camundongos

Grupos	Peso corporal (g)				Peso relativo dos órgãos (mg/g)[a]		
	Inicial	4 dias	7 dias	14 dias	Baço	Timo	Fígado
Controle negativo	22 ± 1	24 ± 1	23 ± 1	24 ± 1	5.1 ± 0.3	2.6 ± 0.3	51.4 ± 1.1
Controle positivo	22 ± 2	22 ± 1	22 ± 0.5	23 ± 0.4	5.2 ± 0.5	2.8 ± 0.3	50.7 ± 2.8
AF 50 mg/kg	23 ± 1	23 ± 1	22 ± 1	23 ± 1	8.4 ± 2.1	2.7 ± 0.3	52.8 ± 2.1
AF 100 mg/kg	22 ± 1	23 ± 1	22 ± 1	23 ± 1	7.6 ± 1.2	2.4 ± 0.3	53.9 ± 2.0
AF 200 mg/kg	23 ± 1	24 ± 1	23 ± 1	24 ± 1	6.8 ± 1.0	2.8 ± 0.3	53.1 ± 2.3

Os valores representam a média ± erro padrão (n=6)
[a]Peso dos órgãos (mg)/peso corporal (g) após 14 dias de tratamento

Tabela 2 – Efeito do extrato aquoso AQ sobre o peso corporal e peso relativo dos órgãos de camundongos

	Peso corporal (g)				Peso relativo dos órgãos (mg/g)[a]		
	Inicial	4 dias	7 dias	14 dias	Baço	Timo	Fígado
Controle negativo	22 ± 1	23 ± 1	22 ± 1	22 ± 1	4.8 ± 0.3	2.5 ± 0.1	50.5 ± 1.4
Controle positivo	23 ± 1	24 ± 1	23 ± 1	24 ± 1	7.7 ± 1.9	2.8 ± 0.3	56.4 ± 3.9
AQ 50 mg/kg	23 ± 1	23 ± 1	23 ± 0.2	24 ± 0.2	5.4 ± 0.3	2.7 ± 0.2	50.4 ± 1.9
AQ 100 mg/kg	22 ± 1	22 ± 0.4	22 ± 1	22 ± 1	6.5 ± 1.1	2.5 ± 0.2	50.7 ± 0.8
AQ 200 mg/kg	22 ± 1	22 ± 1	22 ± 1	23 ± 1	7.2 ± 0.9	2.5 ± 0.4	53.7 ± 1.2

Os valores representam a média ± erro padrão (n=6)
[a]Peso dos órgãos (mg)/peso corporal (g) após 14 dias de tratamento

Tabela 3 – Efeito de doses maiores de extratos de AF e AQ sobre o peso corporal e peso relativo dos órgãos de camundongos

Grupos	Peso corporal (g)	Peso relativo dos órgãos (mg/g)[a]		
		Baço	Timo	Fígado
Controle positivo	24.76 ± 1.34	4.32 ± 0.28	2.32 ± 0.30	49.18 ± 0.67
AQ 200 mg/kg	23.68 ± 0.93	4.07 ± 0.04	2.62 ± 0.19	47.20 ± 1.25
AQ 400 mg/kg	24.92 ± 1.96	4.80 ± 0.30	3.25 ± 0.25	58.85 ± 1.25*
AF 200 mg/kg	22.65 ± 1.05	4.18 ± 0.06	2.20 ± 0.38	45.70 ± 2.09
AF 400 mg/kg	24.89 ± 1.72	3.88 ± 0.34	2.28 ± 0.16	47.22 ± 0.72

Camundongos utilizados no ensaio do edema de pata induzido por carragenina
[a]Peso dos órgãos (mg)/peso corporal (g) após 14 dias de tratamento
Os valores representam a média ± erro padrão
*$p<0.01$ em comparação ao grupo controle positivo
Controle positivo: animais tratados com salina que receberam 50 μL carragenina 1%

4.2 Efeito dos extratos brutos orgânicos, aquosos, frações e flavonóides na celularidade do baço dos camundongos

4.2.1 Extrato orgânico etanólico (E) e fase butanólica (FB)

As figuras 7 e 8 demonstram que o extrato etanólico e a fase butanólica não induziram alterações na celularidade do baço dos animais imunizados e tratados com estes compostos, nas doses e período avaliados. O extrato etanólico induziu discreto aumento dose-dependente na celularidade do baço dos camundongos, embora sem significância estatística.

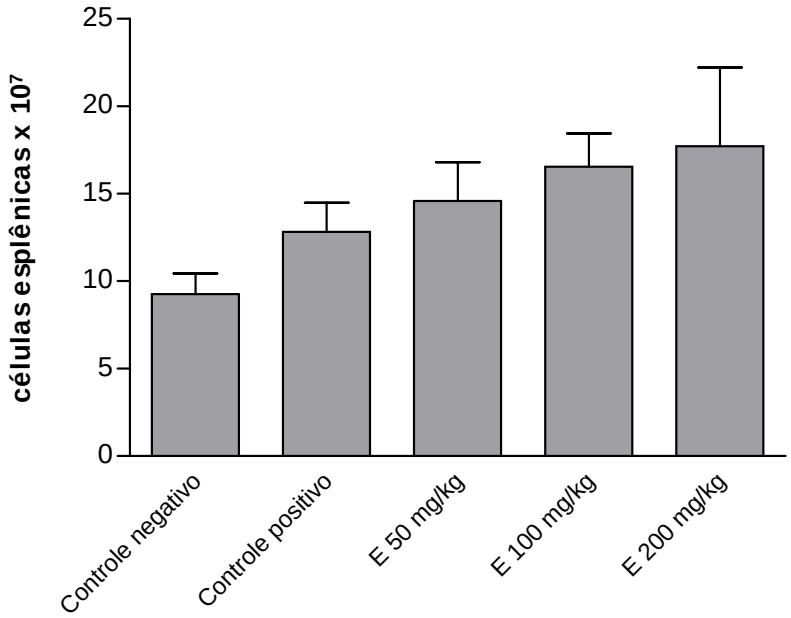

Figura 7 - Efeito do extrato etanólico (E) sobre a celularidade do baço. As colunas representam a média ± erro padrão do número de células esplênicas ($x10^7$). Controle negativo: camundongos tratados com solução salina 0,85% (n=5); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); E 50, 100, 200 mg/kg: camundongos tratados com 50, 100 ou 200 mg/kg do extrato E e imunizados com EC (n=5 ou 6).

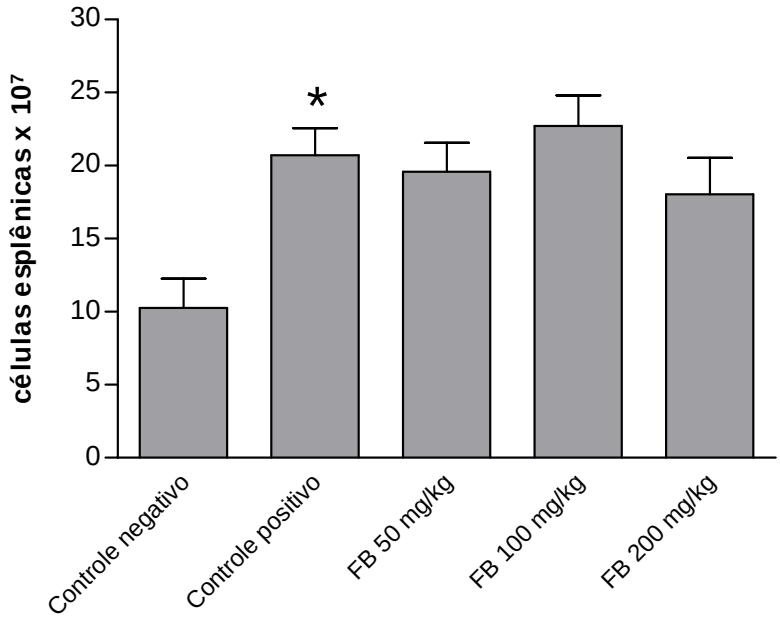

Figura 8 - Efeito da fase butanólica (FB) sobre a celularidade do baço. As colunas representam a média ± erro padrão do número de células esplênicas ($x10^7$); Controle negativo: camundongos tratados com solução salina 0,85% (n=6); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); FB 50, 100, 200 mg/kg: camundongos tratados com 50, 100 ou 200 mg/kg da fase FB e imunizados com EC (n= 6). *p<0,05 em comparação ao controle negativo.

4.2.2 Extrato orgânico hexânico (H)

O efeito do extrato hexânico (H) está demonstrado na figura 9. Não ocorreram alterações no número de células do baço de camundongos tratados com as doses utilizadas após quatro dias de imunização com EC.

4.2.3 Flavonóides A18 e A19

Ao avaliarmos a atividade dos flavonóides, não observamos diferenças no número de células esplênicas dos camundongos tratados com as diferentes as doses de 5 , 15 e 30 mg/kg de A18 e A19 em comparação com os controles (figuras 10 e 11).

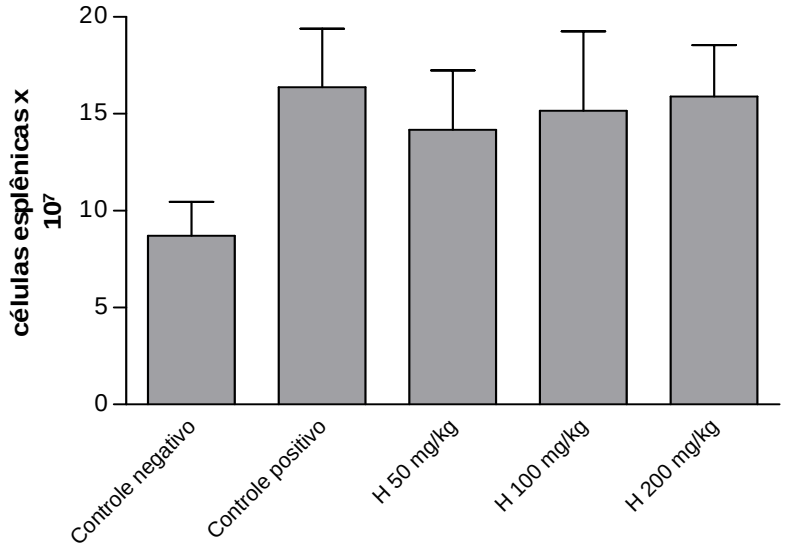

Figura 9 - Efeito do extrato hexânico (H) sobre a celularidade do baço. As colunas representam a média ± erro padrão do número de células esplênicas ($x10^7$). Controle negativo: camundongos tratados com solução salina 0,85% (n=5); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); H 50, 100 e 200 mg/kg: camundongos tratados com 50, 100 ou 200 mg/kg do extrato H e imunizados com EC (n= 6).

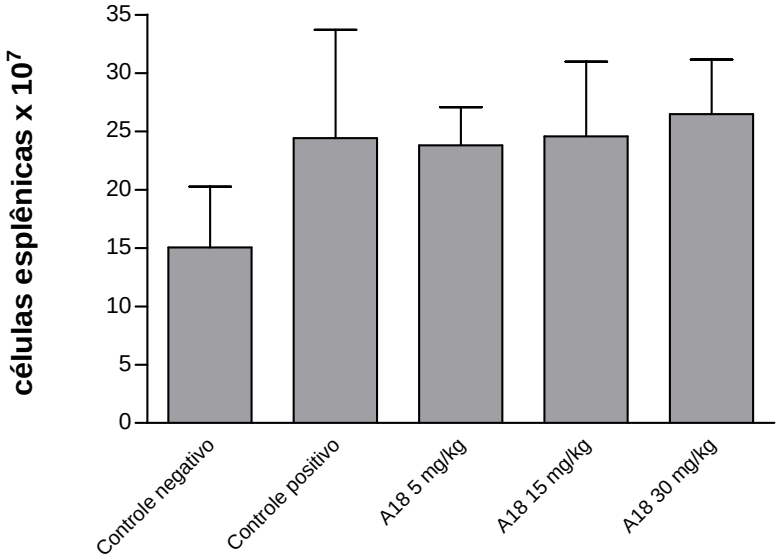

Figura 10 - Efeito do flavonóide A18 sobre a celularidade do baço. As colunas representam a média ± erro padrão do número de células esplênicas ($x10^7$). Controle negativo: camundongos tratados com solução salina 0,85% (n=6); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); A18 5, 15, 30 mg/kg: camundongos tratados com 5, 15, 30 mg/kg do flavonóide A18 e imunizados com EC (n= 6).

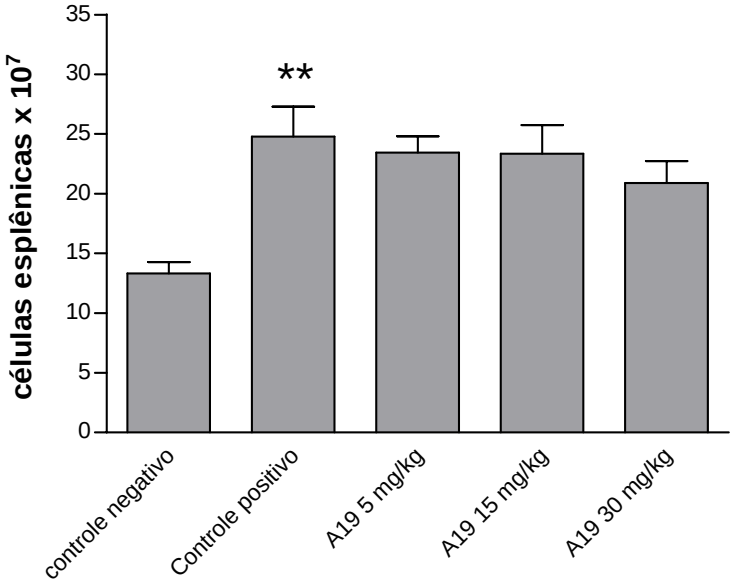

Figura 11 - Efeito do flavonóide A19 sobre a celularidade do baço. As colunas representam a média ± erro padrão do número de células esplênicas ($x10^7$). Controle negativo: camundongos tratados com solução salina 0,85% (n=5); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); A19 5, 15, 30 mg/kg: camundongos tratados com 5, 15, 30 mg/kg do flavonóide A19 e imunizados com EC (n= 6); **p<0,01 em comparação ao controle negativo.

4.2.4 Extrato aquoso frio (AF) e extrato aquoso quente (AQ)

O tratamento dos camundongos com os extratos aquosos AF e AQ não induziu alterações no número de células do baço, com as doses de 50, 100 e 200 mg/kg em relação ao controle (figuras 12 e 13).

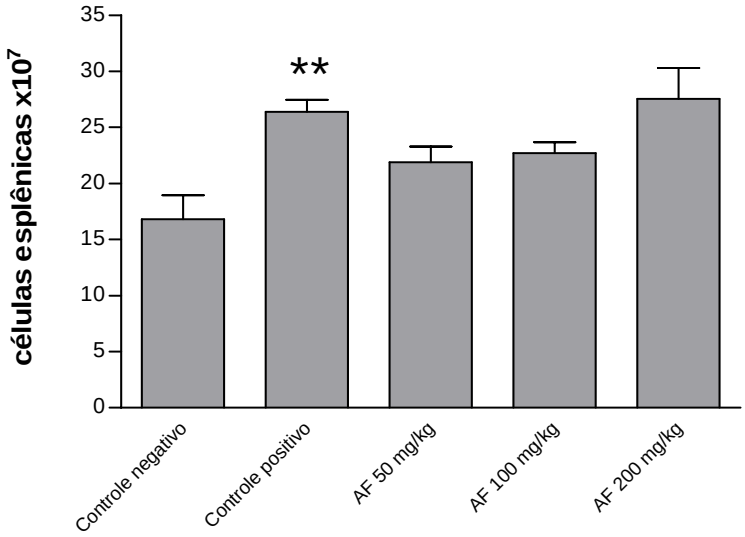

Figura 12 - Efeito do extrato aquoso frio (AF) sobre a celularidade do baço. As colunas representam a média ± erro padrão do número de células esplênicas ($x10^7$). Controle negativo: camundongos tratados com solução salina 0,85% (n=6); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); AF 50, 100 e 200 mg/kg: camundongos tratados com 50, 100 e 200 mg/kg do extrato AF e imunizados com EC (n= 6); **p<0,01 em comparação ao controle negativo.

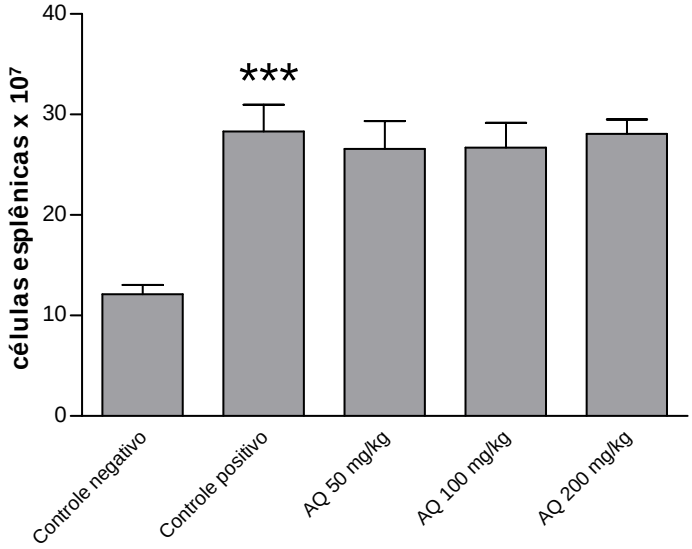

Figura 13 - Efeito do extrato aquoso quente (AQ) sobre a celularidade do baço. As colunas representam a média ± erro padrão do número de células esplênicas ($x10^7$). Controle negativo: camundongos tratados com solução salina 0,85% (n=6); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); AQ 50, 100 e 200 mg/kg: camundongos tratados com 50, 100 e 200 mg/kg do extrato AQ e imunizados com EC (n= 6); ***p<0,001 em comparação ao controle negativo; ***p<0,001 em comparação ao controle negativo.

4.3 Efeito dos extratos brutos orgânicos, aquosos, frações e flavonóides nas células formadoras de placas (PFC)

4.3.1 Extrato orgânico etanólico (E) e fase butanólica (FB)

As figuras 14 e 15 apresentam o resultado observado no número de PFC em camundongos tratados com o extrato etanólico (E) e com a fase butanólica (FB). Os compostos utilizados não induziram alterações com as doses utilizadas após quatro dias de imunização com EC.

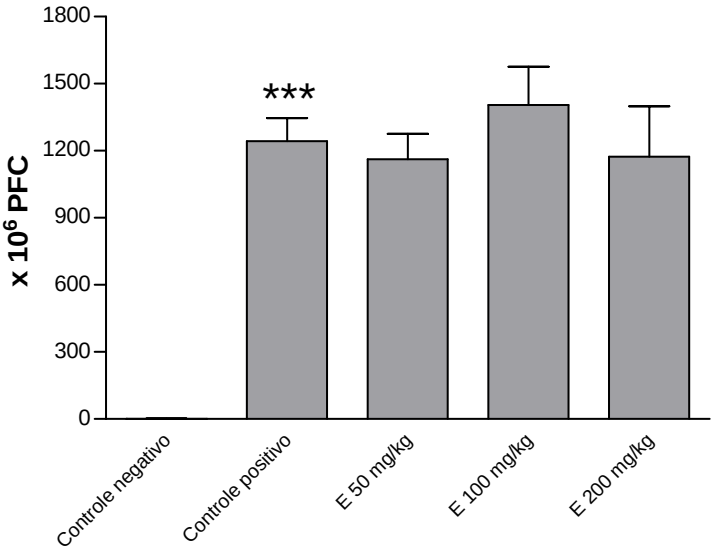

Figura 14 - Número de PFC no baço de camundongos tratados ou não com o extrato etanólico (E). As colunas representam a média ± erro padrão do número de PFC/10^6 células. Controle negativo: camundongos tratados com solução salina 0,85% (n=5); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); E 50, 100 e 200 mg/kg: camundongos tratados com 50, 100 e 200 mg/kg do extrato E e imunizados com EC (n= 5-6); ***p<0,001 em comparação ao controle negativo.

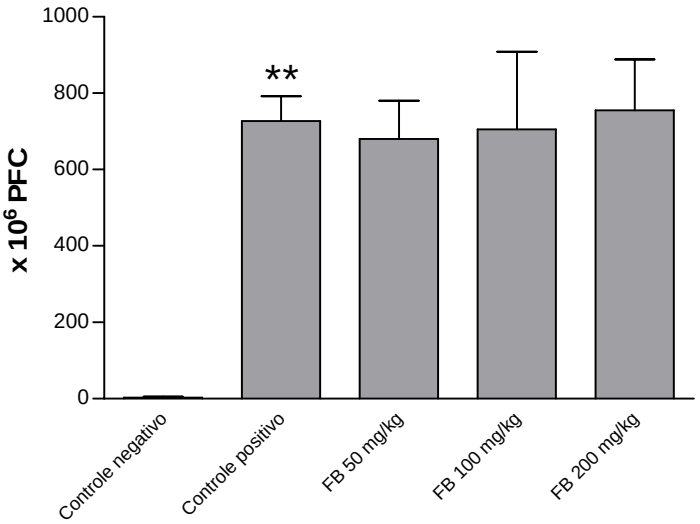

Figura 15 - Número de PFC no baço de camundongos tratados ou não com a fase butanólica (FB). As colunas representam a média ± erro padrão do número de PFC/10^6 células. Controle negativo: camundongos tratados com solução salina 0,85% (n=6); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); FB 50, 100 e 200 mg/kg: camundongos tratados com 50, 100 e 200 mg/kg da fase butanólica e imunizados com EC (n= 6); **p<0,01 em comparação ao controle negativo.

4.3.2 Extrato orgânico hexânico (H)

O tratamento dos camundongos com o extrato hexânico (H) não induziu alterações na produção de células formadoras de placas nestes animais, nas condições avaliadas (figura 16).

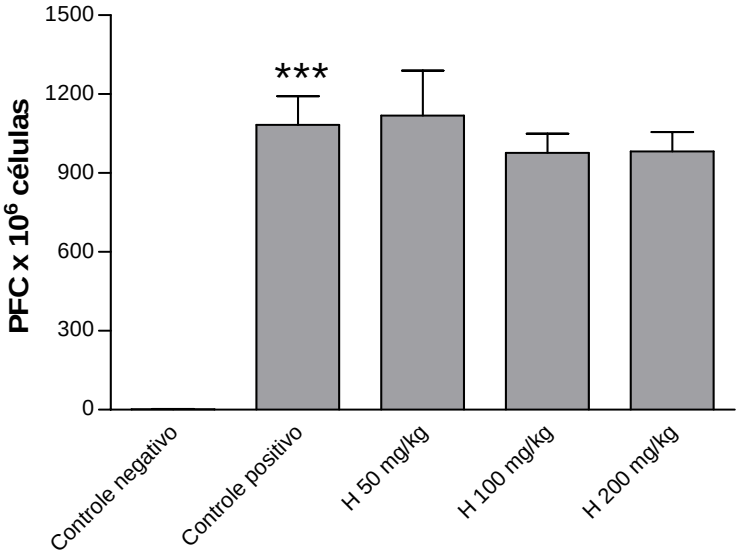

Figura 16 - Número de PFC no baço de camundongos tratados ou não com o extrato hexânico (H). As colunas representam a média ± erro padrão do número de PFC/10^6 células. Controle negativo: camundongos tratados com solução salina 0,85% (n=5); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); H 50, 100 e 200 mg/kg: camundongos tratados com 50, 100 e 200 mg/kg do extrato H e imunizados com EC (n= 6); ***p<0,001 em comparação ao controle negativo.

4.3.3 Flavonóides A18 e A19

Quando os camundongos foram tratados com o flavonóide A18, isolado do extrato bruto etanólico, ocorreu aumento significativo ($p<0,05$) na produção de PFC nos animais tratados com 15 mg/kg, 1087 ± 118 PFC x 10^6 células, em comparação aos animais do grupo controle positivo, 727 ± 60 PFC x 10^6 células (Figura 17). O flavonóide A19 não induziu alterações no número de PFC nos animais tratados no período avaliado (Figura 18).

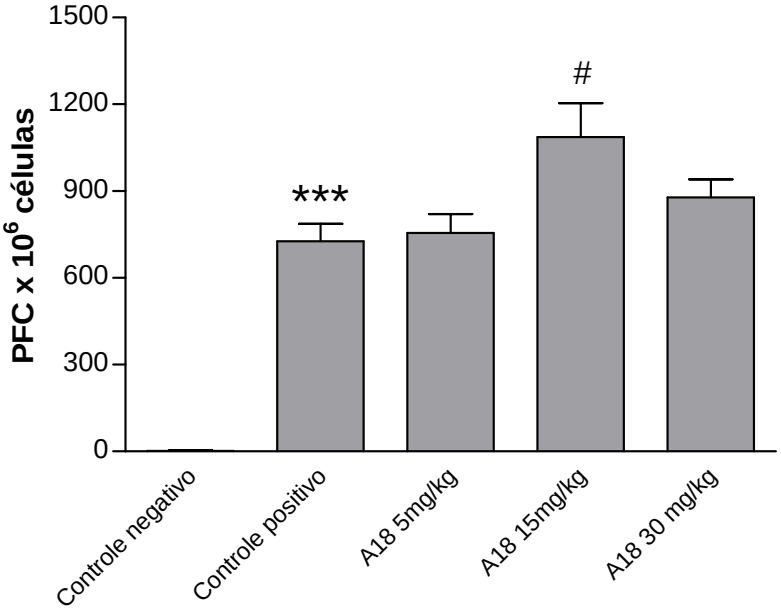

Figura 17 - Número de PFC no baço de camundongos tratados ou não com o flavonóide A18. As colunas representam a média ± erro padrão do número de PFC/10^6 células. Controle negativo: camundongos tratados com solução salina 0,85% (n=6); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); A18 5, 15 e 30 mg/kg: camundongos tratados com 5, 15 e 30 mg/kg do flavonóide A18 e imunizados com EC (n= 5 ou 6); ***$p<0,001$ em comparação ao controle negativo; #$p<0,05$ em comparação ao controle positivo.

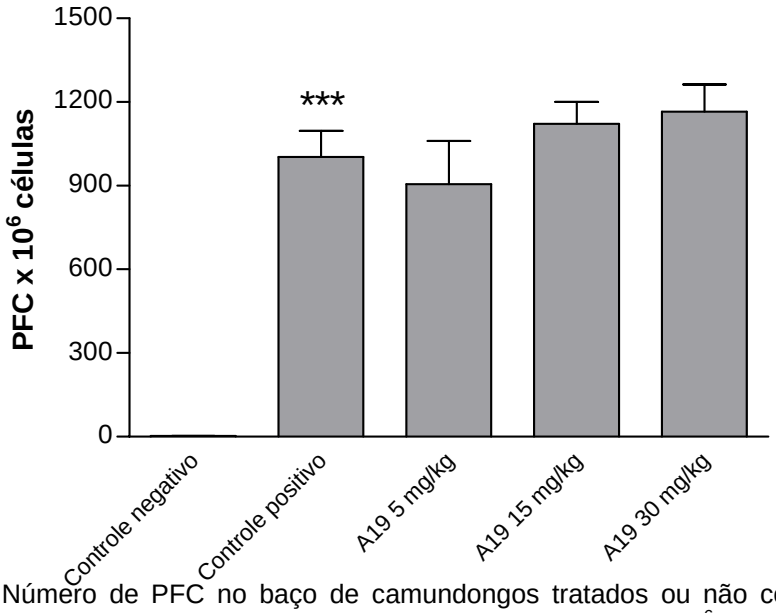

Figura 18 - Número de PFC no baço de camundongos tratados ou não com flavonóide A19. As colunas representam a média ± erro padrão do número de PFC/10^6 células. Controle negativo: camundongos tratados com solução salina 0,85% (n=6); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); A19 5, 15 e 30 mg/kg: camundongos tratados com 5, 15 e 30 mg/kg do flavonóide A19 e imunizados com EC (n= 6); ***p<0,001 em comparação ao controle negativo.

4.3.4 Extrato aquoso frio (AF) e extrato aquoso quente (AQ)

Foi verificado aumento no número de células formadoras de placas nos animais tratados com extrato aquoso frio (figura 19), principalmente com a dose de 100 mg/kg que induziu aumento significativo (1260 ± 195 PFC X 10^6 células - p<0,05), comparado ao controle positivo (718 ± 116 PFC X 10^6 células). O extrato aquoso quente (AQ) não alterou o número de PFC nos camundongos tratados, como demonstrado na figura 20.

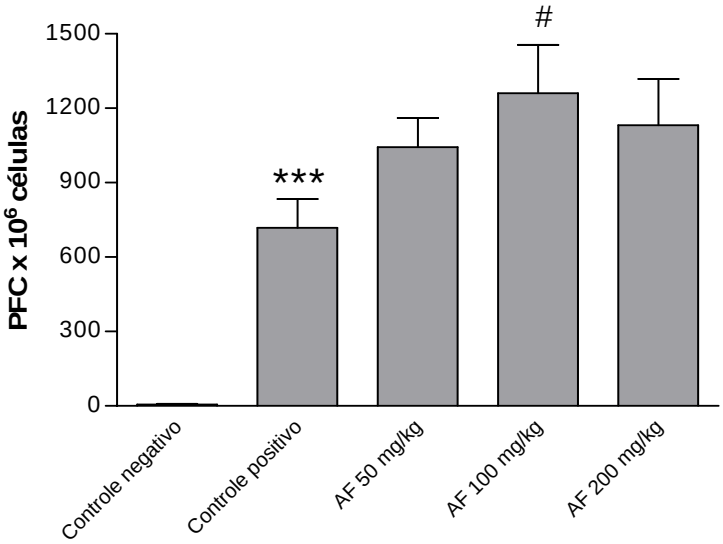

Figura 19 - Número de PFC no baço de camundongos tratados ou não com o extrato aquoso frio (AF). As colunas representam a média ± erro padrão do número de PFC/10^6 células. Controle negativo: camundongos tratados com solução salina 0,85% (n=6); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); AF 50, 100 e 200 mg/kg: camundongos tratados com 50, 100 e 200 mg/kg do extrato AF e imunizados com EC (n= 6); ***p<0,001 em comparação ao controle negativo; *p<0,05 em comparação ao controle positivo.

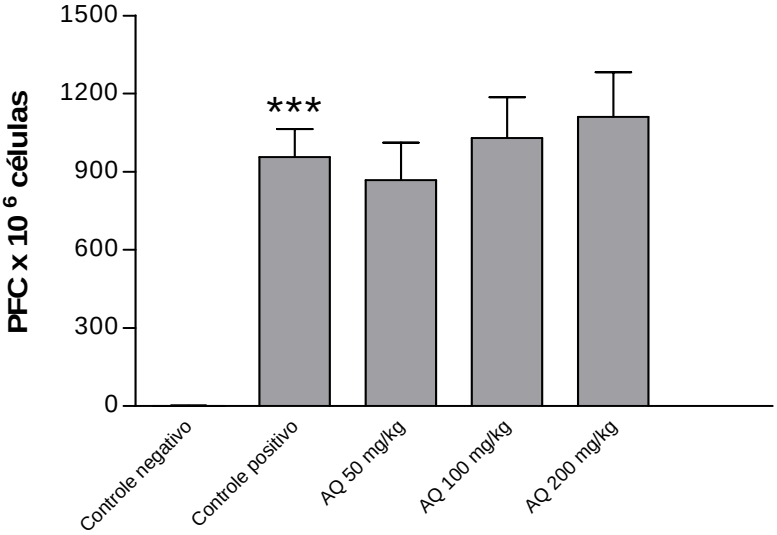

Figura 20 - Número de PFC no baço de camundongos tratados ou não com o extrato aquoso quente (AQ). As colunas representam a média ± erro padrão do número de PFC/10^6 células. Controle negativo: camundongos tratados com solução salina 0,85% (n=5); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); AQ 50, 100 e 200 mg/kg: camundongos tratados com 50, 100 e 200 mg/kg do extrato AQ e imunizados com EC (n= 6); **p<0,01 em comparação ao controle negativo.

4.4 Efeito dos extratos brutos orgânicos, aquosos, frações e flavonóides no título de anticorpos circulantes – ELISA

O antígeno de membrana de hemácia de carneiro foi preparado conforme descrito em Materiais e Métodos e a quantidade de proteína na preparação foi determinada, em 0,589 mg/mL e 0,793 mg/mL na segunda preparação. Os grupos de animais imunizados e tratados com os diferentes compostos avaliados tiveram seu sangue coletado pelo plexo retro-orbital, quatro dias após imunização, antes da realização do ensaio de PFC. Também foi realizada coleta de sangue de camundongos dos grupos imunizados e tratados para o acompanhamento da produção de anticorpos IgG e IgM após 4, 7 e 14 dias. O soro foi separado e armazenado a 20º C negativos para a dosagem dos anticorpos circulantes.

4.4.1 Extrato orgânico etanólico (E) e fase butanólica (FB)

A figura 21 demonstra que ocorreu aumento ($p<0,05$) no título de IgM anti-EC nos animais tratados com 50 mg/kg do extrato etanólico (E) em relação ao controle positivo. Porém, o extrato não induziu alterações no título de IgG e IgM dos camundongos imunizados e tratados, após 4, 7 e 14 dias, que foram realizados posteriormente (figura 23). Nos animais tratados com a fase butanólica (FB - figura 22) não foi possível observar alterações significativas no título de IgM anti-EC dos animais tratados. Essa fração não foi utilizada para a avaliação do título de anticorpos até 14 dias.

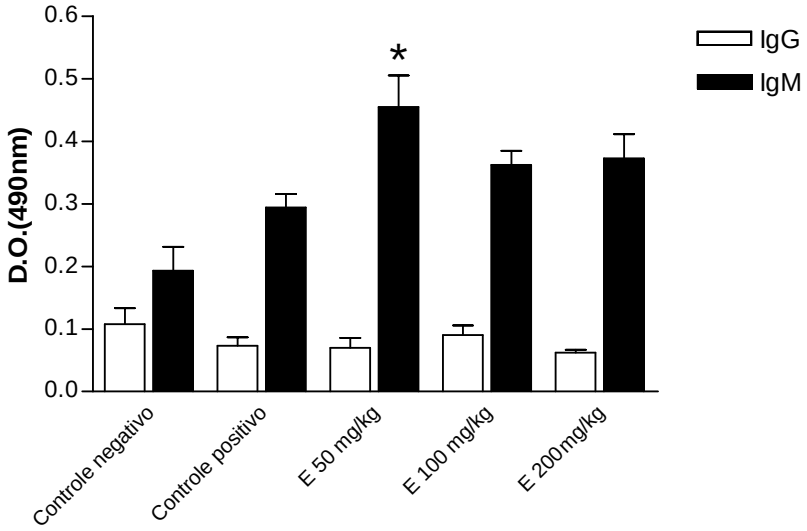

Figura 21 – Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC após 4 dias de imunização em camundongos tratados ou não com extrato etanólico (E). As barras representam a média ± erro padrão da densidade óptica a 490 nm. Controle negativo: camundongos tratados com PPG 40%; (n=5); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); E 50, 100 e 200 mg/kg: camundongos tratados com 50, 100 e 200 mg/kg do extrato E e imunizados com EC (n= 5-6); *p<0,05 em comparação ao controle

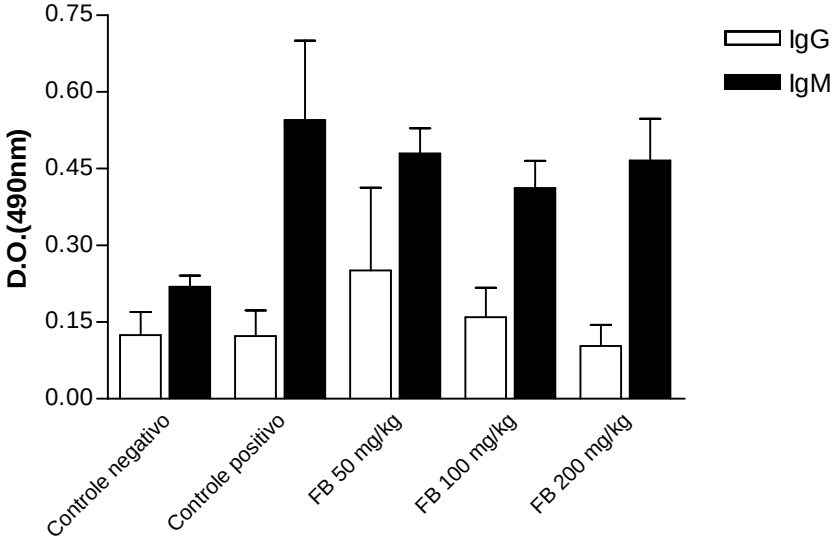

Figura 22 - Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC após 4 dias de imunização em camundongos tratados ou não com a fase butanólica (FB). Cada barra representa a média ± erro padrão da densidade óptica a 490 nm. Controle negativo: camundongos tratados com PPG 40%; (n=6); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); FB 50, 100 e 200 mg/kg: camundongos tratados com 50, 100 e 200 mg/kg da fase FB e imunizados com EC (n= 6).

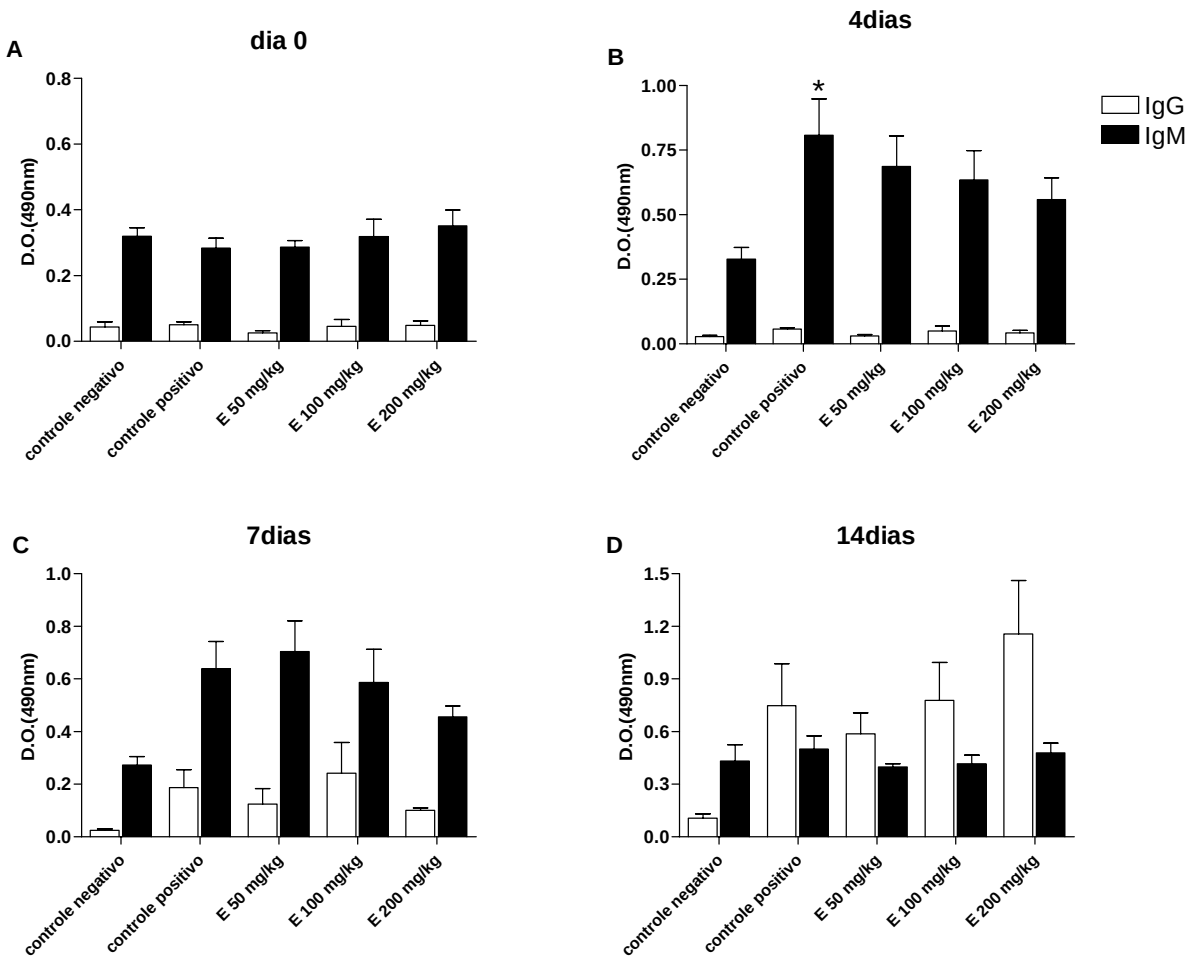

Figura 23 – Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC no dia 0 (A) e com 4 dias (B), 7dias (C) e 14 dias (D) após a imunização em camundongos tratados ou não com extrato etanólico (E). Os valores representam a média ± erro padrão de 5 ou 6 animais; Controle negativo: camundongos tratados com PPG 40%; Controle positivo: camundongos imunizados com EC e PPG 40%; E 50 mg/kg, 100 mg/kg ou 200mg/kg: camundongos imunizados com EC e tratados com as respectivas doses do extrato E; $^{*}p<0.05$ em comparação ao controle negativo.

4.4.2 Extrato orgânico hexânico (H)

Nos animais tratados com o extrato hexânico (H) não ocorreram alterações significativas nos títulos de IgG e IgM em comparação com o controle positivo, como demonstrado nas figuras 24 e 25.

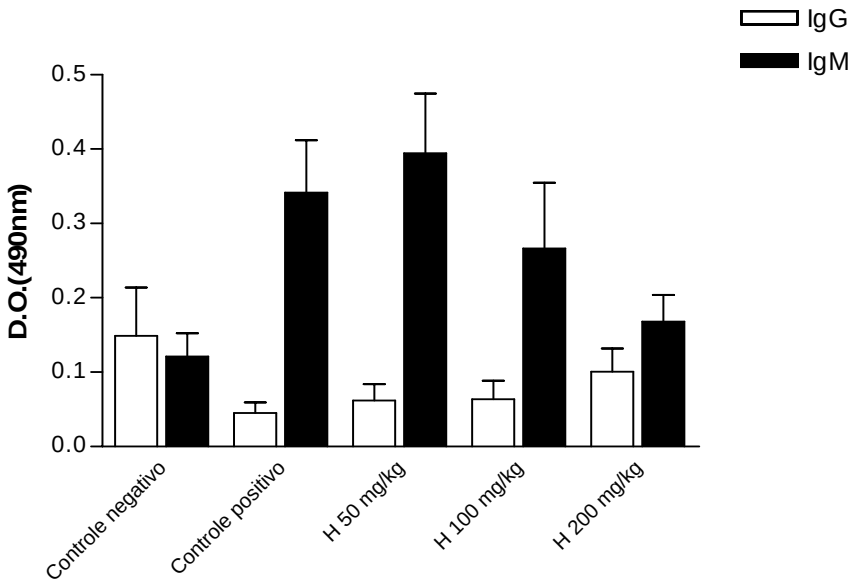

Figura 24 - Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC após 4 dias de imunização em camundongos tratados ou não com extrato hexânico (H). Cada barra representa a média ± erro padrão da densidade óptica a 490 nm. Controle negativo: camundongos tratados PPG 40%; (n=5); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (n=6); H 50, 100 e 200 mg/kg: camundongos tratados com 50, 100 e 200 mg/kg do extrato H e imunizados com EC (n= 6); ***p<0,001 em comparação ao controle negativo.

4.4.3 Flavonóides A18 e A19

Os animais tratados com os flavonóides A18 e A19 nas doses descritas não demonstraram alterações significativas nos títulos de IgG e IgM nos períodos avaliados (figuras 26, 27 e 28). Porém é possível observar que após 7 dias os animais tratados com 5mg/kg e após 14 dias os animais tratados com 5 e 15 mg/kg do flavonóide A19 induziram discreto aumento no título de IgG em comparação com o controle positivo (figura 28).

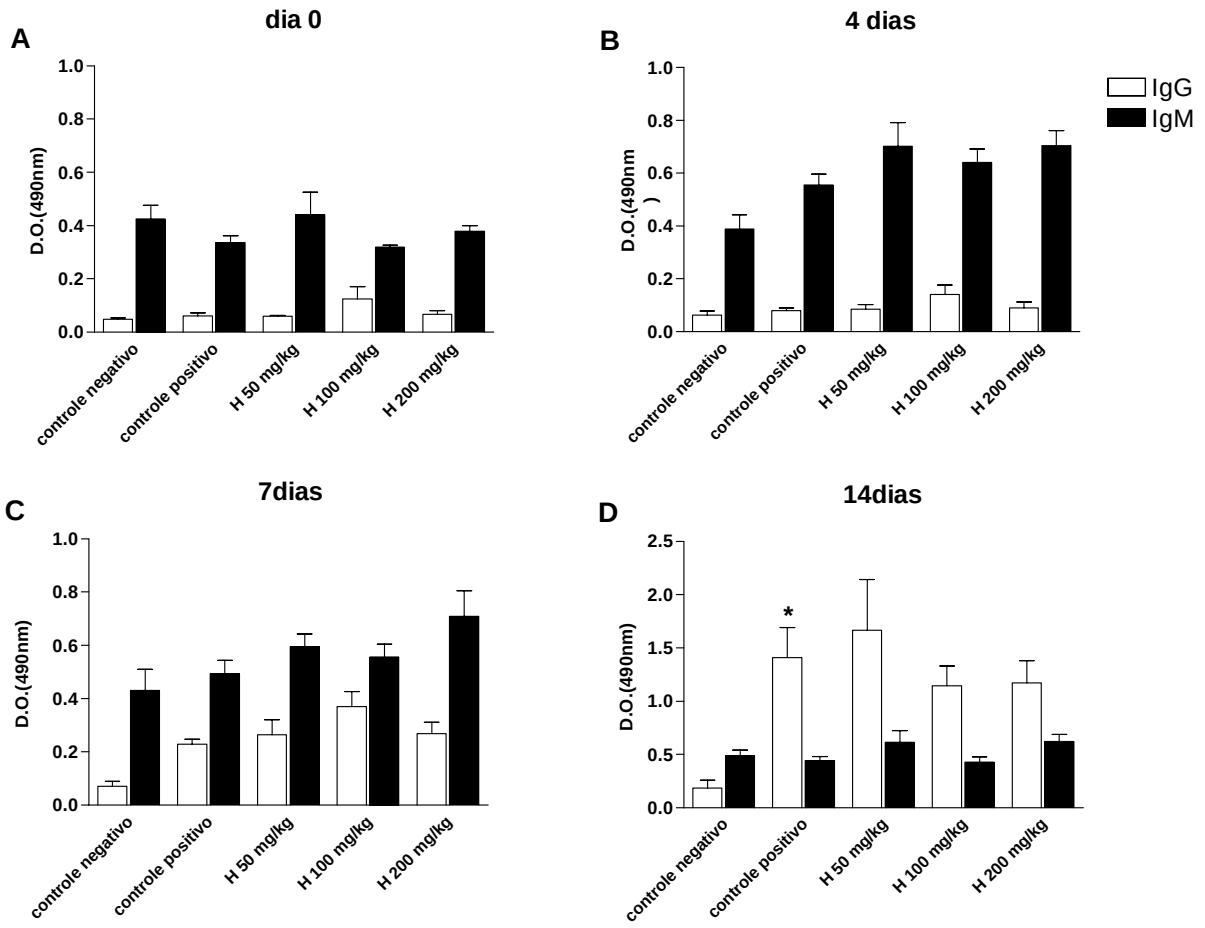

Figura 25 - Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC no dia 0 (A) e com 4 dias (B), 7dias (C) e 14 dias (D) após a imunização em camundongos tratados ou não com o extrato hexânico (H) . Os valores representam a média ± erro padrão de 5 ou 6 animais; Controle negativo: camundongos tratados com PPG 40%; Controle positivo: camundongos imunizados com EC e tratados com PPG 40%; H 50 mg/kg, 100 mg/kg ou 200mg/kg: camundongos imunizados com EC e tratados com as respectivas doses do extrato H; $^{*}p<0.05$ em comparação ao controle negativo.

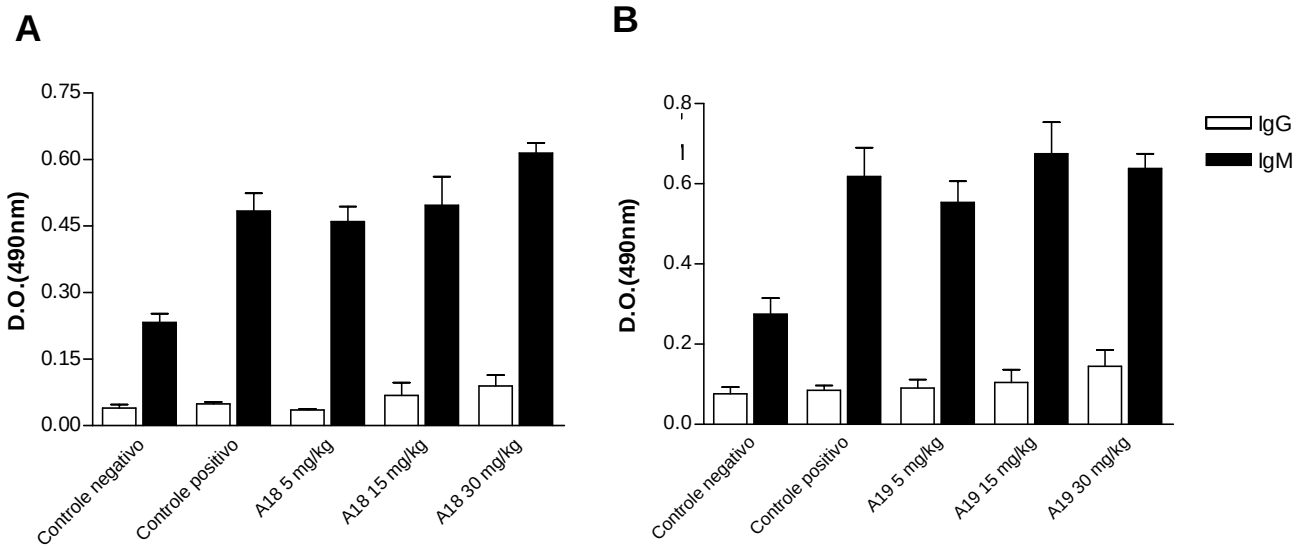

Figura 26 - Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC após 4 dias de imunização em camundongos tratados ou não com os flavonóides A18 **(A)** e A19 **(B)**. Cada barra representa a média ± erro padrão da densidade óptica a 490 nm. Controle negativo: camundongos tratados com PPG 40% (A18 n=5; A19 n=5); Controle positivo: camundongos tratados com PPG 40% e imunizados com EC (A18 n=5; A19 n=6); A18 e A19 5, 15 e 30 mg/kg: camundongos tratados com 5, 15 e 30 mg/kg dos flavonóides A18 ou A19 e imunizados com EC (A18 n=5; A19 n=6)

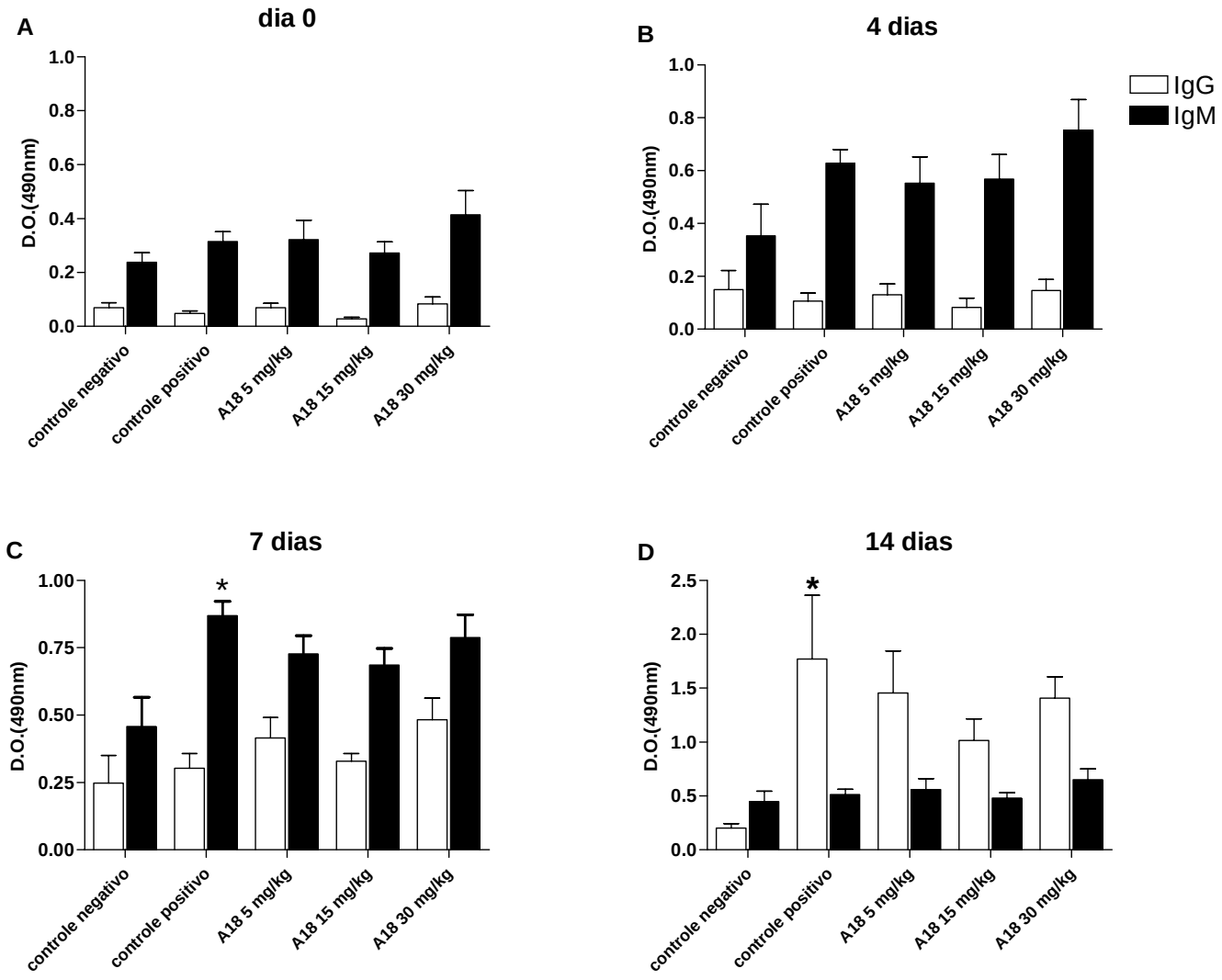

Figura 27 - Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC no dia 0 (A) e com 4 dias (B), 7dias (C) e 14 dias (D) após a imunização em camundongos tratados ou não com o flavonóide A18 .Os valores representam a média ± erro padrão de 4 a 6 animais; Controle negativo: camundongos tratados com PPG 40%; Controle positivo: camundongos imunizados com EC e tratados PPG 40%; A18 5 mg/kg, 15 mg/kg ou 30 mg/kg: camundongos imunizados com EC e tratados com as respectivas doses do flavonóide A18; $^{*}p<0.05$ em comparação ao controle negativo.

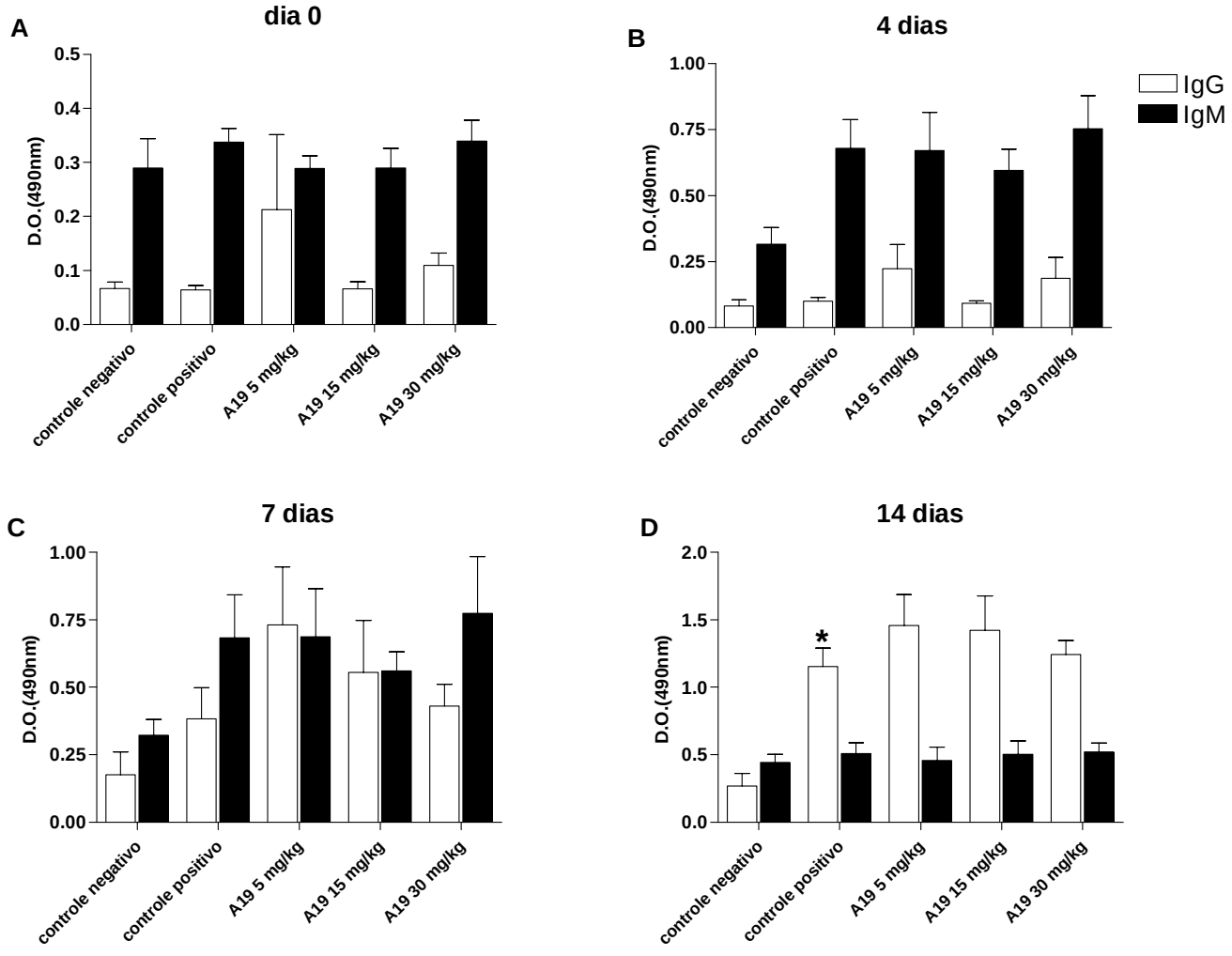

Figura 28 - Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC no dia 0 (A) e com 4 dias (B), 7dias (C) e 14 dias (D) após a imunização em camundongos tratados ou não com o flavonóide A19. Os valores representam a média ± erro padrão de 5 ou 6 animais; Controle negativo: camundongos tratados com PPG 40%; Controle positivo: camundongos imunizados com EC e tratados com PPG 40%; A19 5 mg/kg, 15 mg/kg ou 30 mg/kg: camundongos imunizados com EC e tratados com as respectivas doses do flavonóide A19; $^{*}p<0.05$ em comparação ao controle negativo.

4.4.4 Extrato aquoso frio (AF) e extrato aquoso quente (AQ)

O título de anticorpos IgM aumentou nos animais tratados com 100 e 200 mg/kg do extrato aquoso frio (AF), principalmente com 100mg/kg (figura 29 A), em relação ao controle positivo, embora não significativo estatisticamente. O título de anticorpos IgM e IgG aumentou no soro dos camundongos imunizados que receberam o extrato AF, demonstrados na Figura 30. Após quatro dias de imunização e tratamento foi verificado aumento significante no título de IgM, nas doses utilizadas 50, 100 e 200 mg/kg ($p<0.05$, $p<0.01$ e $p<0.01$ respectivamente – Figura 30B), em comparação ao controle positivo. O aumento também foi observado após sete dias nos animais imunizados e tratados com 50 mg/kg ($p<0.05$), comparados com o controle positivo. Após sete dias, o título de IgG também aumentou significantemente nos camundongos que receberam as três doses do extrato AF (Figura 26C - $p<0.01$, $p<0.05$ e $p<0.05$ respectivamente) em comparação aos animais imunizados não tratados (controle positivo). O tratamento dos animais com o extrato AQ não induziu alterações significativas no título dos anticorpos após 4 e 14 dias (Figuras 29 B, 31B e D), é possível verificar aumento no título de IgM comparado ao título do controle positivo (Figura 31C), porém sem significância estatística.

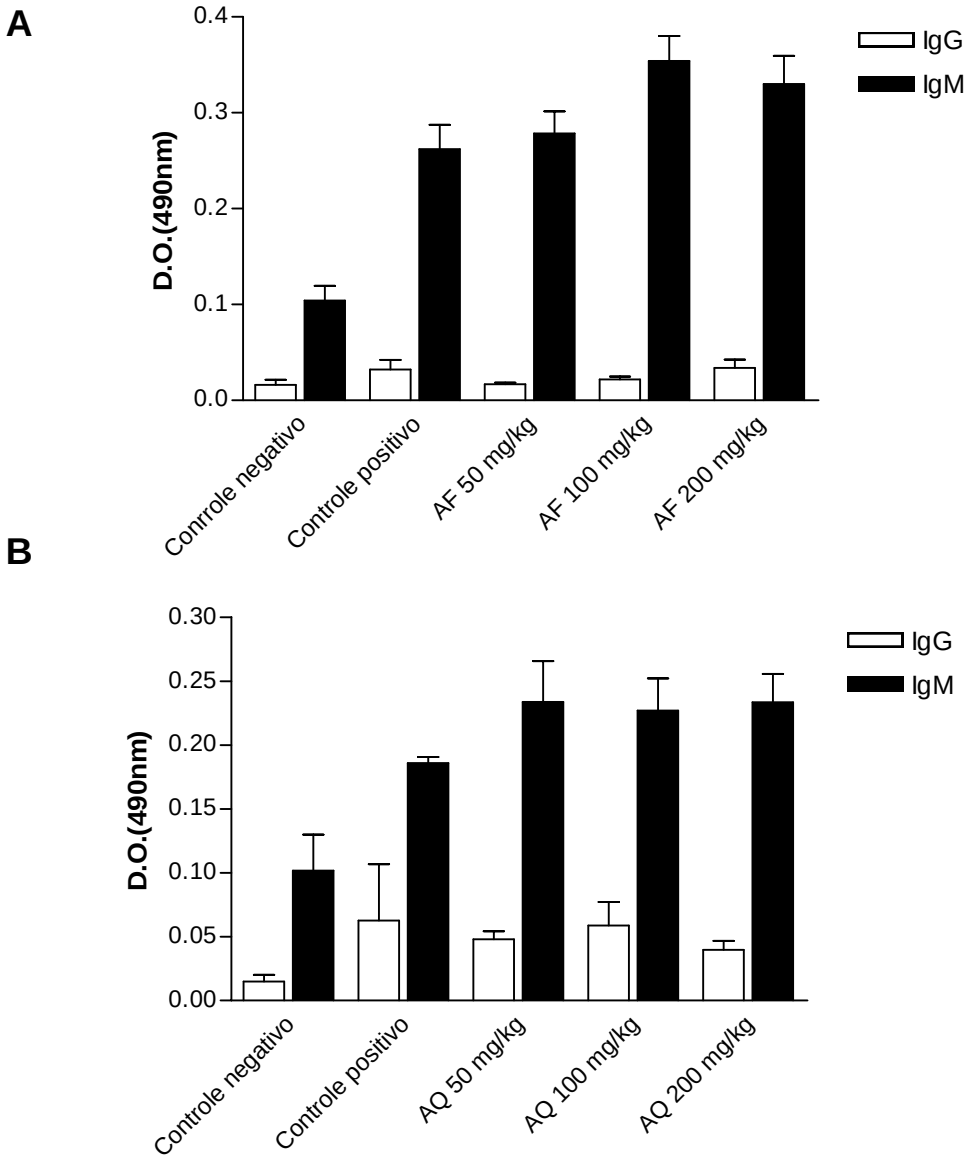

Figura 29 - Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC após 4 dias de imunização em camundongos tratados ou não com os extratos aquosos **AF (A)** e AQ **(B)**. Cada barra representa a média ± erro padrão da densidade óptica a 490 nm. Controle negativo: camundongos tratados com salina estéril 0,85%; (AF n=6; AQ n=4); Controle positivo: camundongos tratados com salina estéril 0,85%; e imunizados com EC (AF n=6; AQ n=4); AF e AQ 50, 100 e 200 mg/kg: camundongos tratados com 50, 100 e 200 mg/kg AF ou AQ e imunizados com EC (AF n=6; AQ n=6).

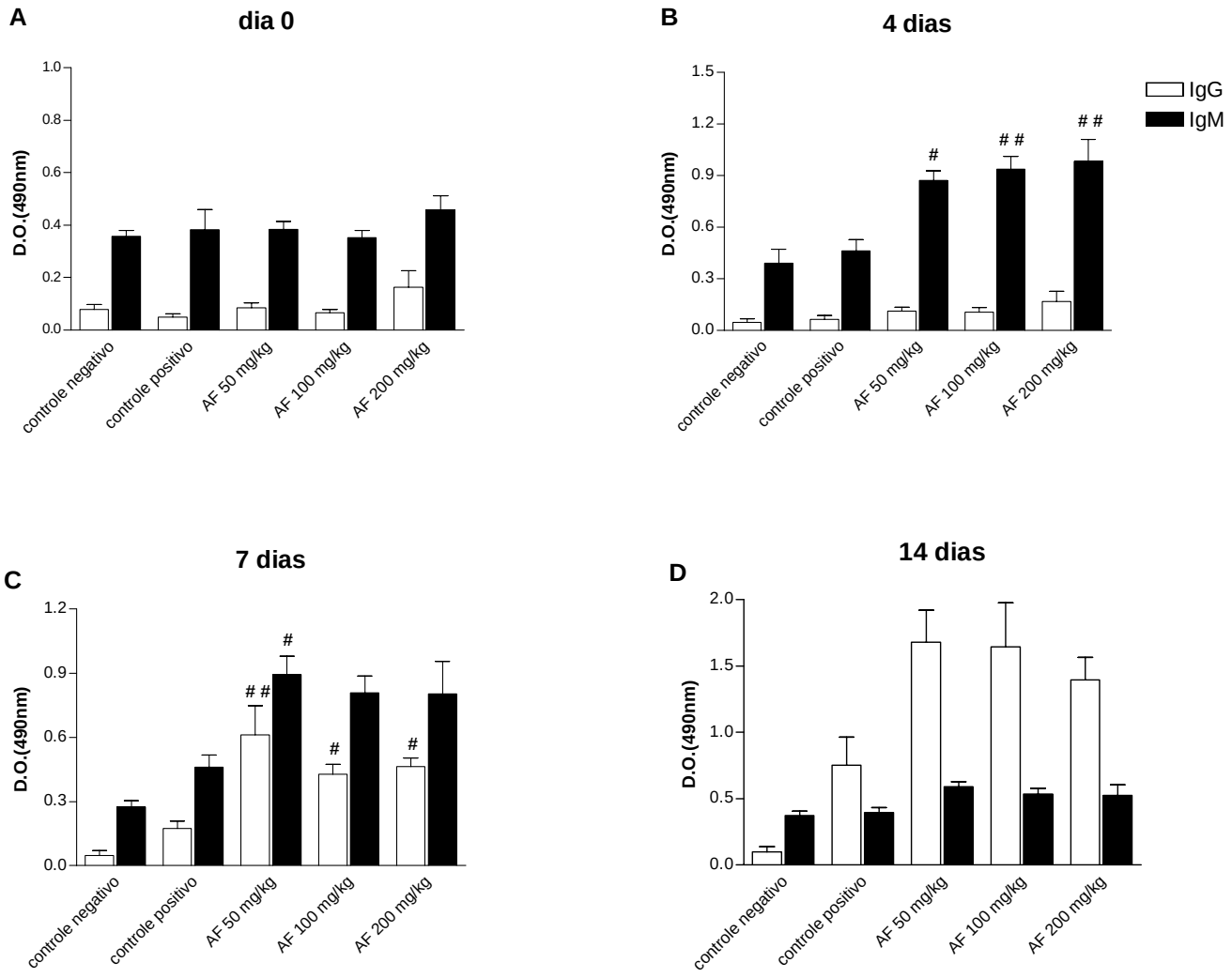

Figura 30 - Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC no dia 0 (A) e com 4 dias (B), 7dias (C) e 14 dias (D) após a imunização em camundongos tratados ou não com o extrato aquoso (AF). Os valores representam a média ± erro padrão de 6 animais; Controle negativo: camundongos tratados com salina estéril; Controle positivo: camundongos imunizados com EC e tratados com salina estéril; AF 50 mg/kg, 100 mg/kg ou 200mg/kg: camundongos imunizados com EC e tratados com as respectivas doses do extrato aquoso frio (AF); $^{\#}p<0.05$ em comparação ao controle positivo; $^{\#\#}p<0.01$ em comparação ao controle positivo.

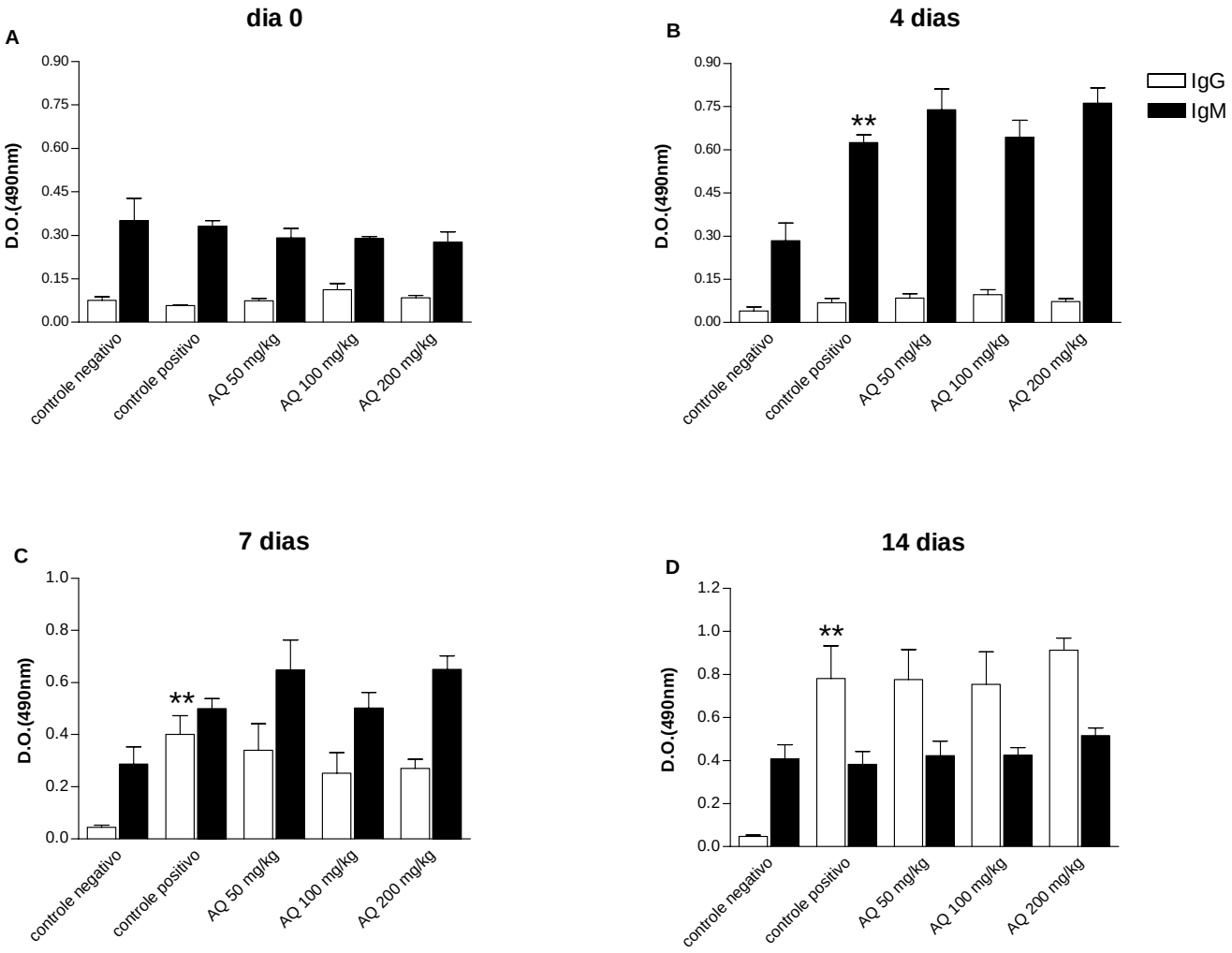

Figura 31 - Título de anticorpos circulantes IgG e IgM anti-EC no dia 0 (A) e com 4 dias (B), 7dias (C) e 14 dias (D) após a imunização em camundongos tratados ou não com o extrato aquoso quente (AQ). Os valores representam a média ± erro padrão de 6 animais; Controle negativo: camundongos tratados com salina estéril; Controle positivo: camundongos imunizados com EC e tratados com salina estéril; AQ 50 mg/kg, 100 mg/kg ou 200mg/kg: camundongos imunizados com EC e tratados com as respectivas doses do extrato aquoso quente (AQ); *$p<0.05$ em comparação ao controle negativo; **$p<0.01$ em comparação ao controle negativo.

4.5 Efeito dos extratos brutos orgânicos, aquosos e frações no edema de pata induzido por carragenina

A figura 32 mostra que a injeção de carragenina nos grupos controles induziu inflamação aguda com aumento proeminente na pata dos camundongos, que iniciou após 1 hora da injeção intraplantar e alcançou um pico de inflamação após 3 e 4 horas. Os extratos etanólico (E) e hexânico (H), aplicados via intraperitoneal 1 hora antes da indução do edema, nas diferentes doses (100, 200, 400 e 700 mg/kg), não demonstraram inibição da inflamação na pata dos camundongos (figura 32 A e B). A fração 39-49, que contém predominantemente A18, também não apresentou efeito antiinflamatório nas condições do experimento e nas doses utilizadas (figura 32 C). A administração dos extratos aquosos nas doses de 200 e 400 mg/kg apresentou diminuição dose-dependente do edema (figura 33). O extrato aquoso frio (AF), administrado na dose de 200 mg/kg, demonstrou já na primeira hora 42% de inibição ($p<0,01$) e 50% após 3 horas ($p<0,001$). Porém, o maior efeito observado foi com a dose de 400 mg/kg, 61% e 60% após 3 e 4 horas ($p< 0,001$), respectivamente (figura 33 A), superior ao efeito obtido com a utilização de 5 mg/kg de indometacina, droga antiinflamatória utilizada como controle positivo. O tratamento com indometacina inibiu o edema de pata obtendo efeito máximo de 55% ($p<0,001$) após 3 horas da indução. O extrato aquoso quente (AQ) quando utilizado na concentração de 200 mg/kg inibiu 40% do edema apenas na primeira hora ($p<0,01$); a dose de 400 mg/kg demonstrou inibição a partir de 2 horas da indução do edema, com maior efeito após 3 horas (56% de inibição, $p<0,001$) (figura 33 B). Quatro animais tratados com 400 mg/kg do extrato aquoso frio e dois animais tratados com 400 mg/kg do extrato

aquoso quente morreram, demonstrando provável toxicidade devida às altas doses utilizadas.

O ensaio de edema de pata induzido por carragenina foi realizado para ampliar a avaliação da atividade imunomoduladora dos extratos de *A. tenella*, verificando atividade antiinflamatória dos mesmos. Desta maneira, obtivemos uma triagem mais adequada dos extratos que foram utilizados na etapa seguinte do projeto, em modelo de artrite experimental induzida por pristane em camundongos AIRmax.

4.6 Resumo dos resultados

A tabela 4 apresenta resumidamente os resultados dos ensaios realizados com todos os extratos de *Alternanthera tenella* e as doses avaliadas na etapa de triagem. Os extratos e as doses utilizadas posteriormente foram escolhidos baseados nesses resultados.

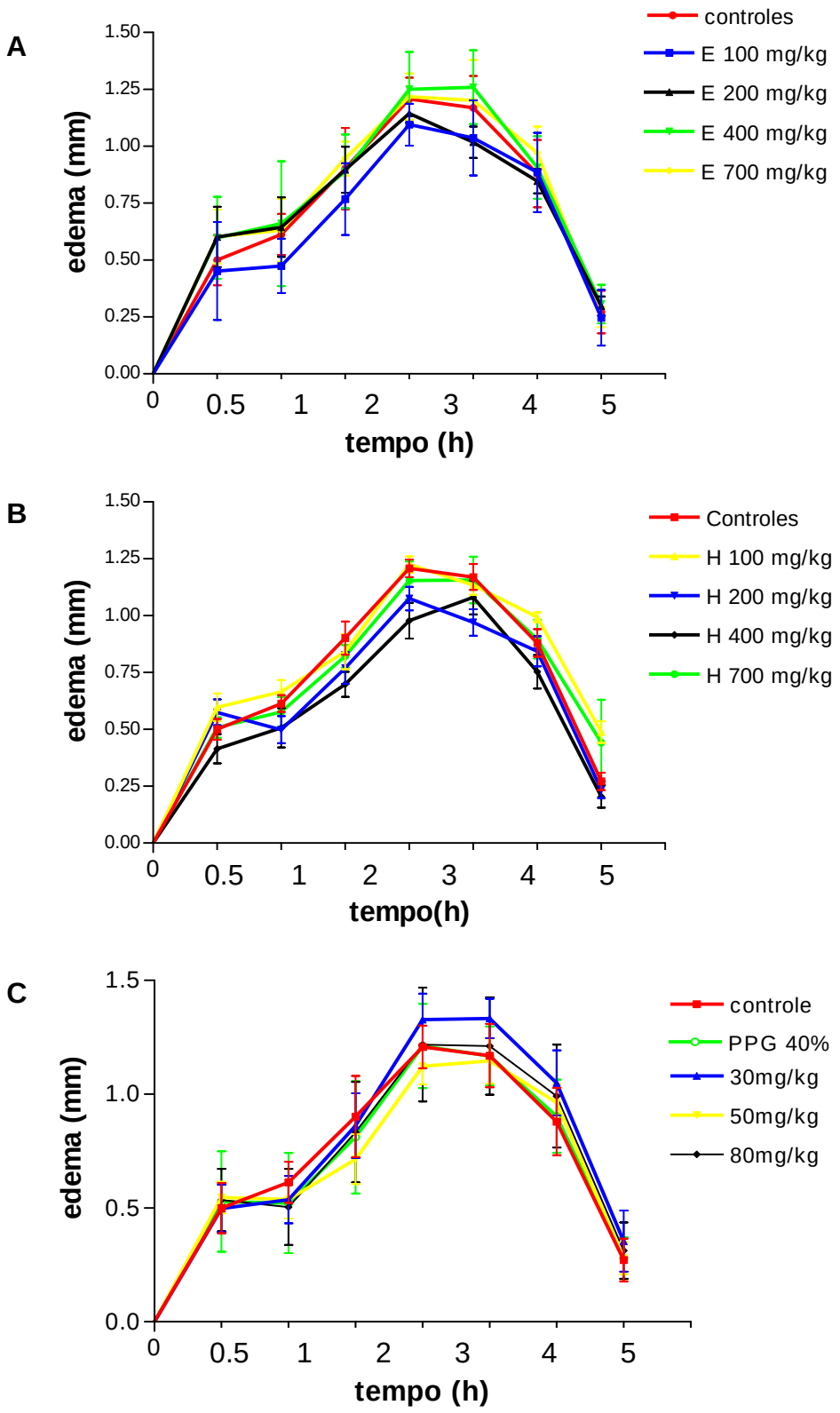

Figura 32 - Efeito dos extratos orgânicos no edema de pata induzido por carragenina. **(A)** Extrato orgânico etanólico (E – 100, 200, 400 e 700 mg/kg, n=6) e controles (animais que não receberam tratamento, n=6); **(B)** Extrato orgânico hexânico (H – 100, 200, 400 e 700 mg/kg, n=6) e controles (animais que não receberam tratamento, n=6); **(C)** Fração 39-49 (30, 50 e 80 mg/kg, n=6), PPG 40% (animais que receberam o veículo, propilenoglicol 40%, n=6) e controle (animais que não receberam tratamento, n=6). Cada ponto representa a média ± DP.

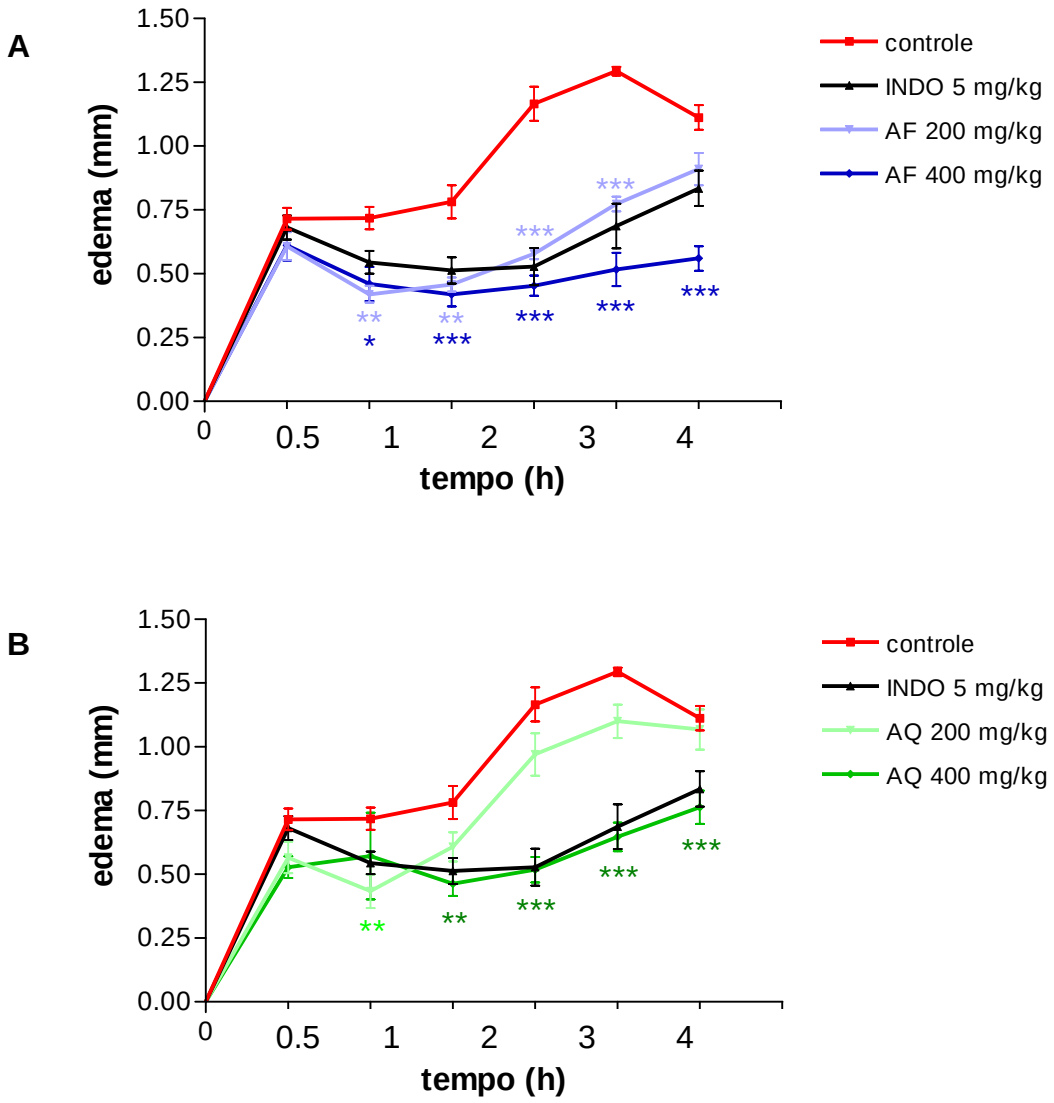

Figura 33 - Efeito dos extratos aquosos no edema de pata induzido por carragenina. **(A)** Extrato aquoso frio (AF - 200 e 400 mg/kg, n=6), **(B)** extrato aquoso quente (AQ – 200mg/kg, n=5 e 400 mg/kg, n=6), controles (animais que receberam o veículo, salina, n=5) e indometacina 5 mg/kg (INDO - antiinflamatório). Cada ponto representa a média ± DP. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 em comparação ao grupo controle.

Tabela 4 – Resultados gerais dos extratos avaliados na primeira etapa

Extratos *Alternanthera tenella*	***doses***	**Células/ baço**	**PFC/10^6 células**	**Título de IgG**	**Título de IgM**	**Edema de pata**
Etanólico (E)	50 mg/kg	↑[a]	n	n	↑*	
	100 mg/kg	↑	n	n	n	n
	200 mg/kg	↑	n	n	n	n
	400 mg/kg					n
	700 mg/kg					n
Fase Butanólica (FB)	50 mg/kg	n	n		n	
	100 mg/kg	n	n		n	
	200 mg/kg	n	n		n	
Hexânico (H)	50 mg/kg	n	n	n	n	
	100 mg/kg	n	n	n	n	n
	200 mg/kg	n	n	n	n	n
	400 mg/kg					n
	700 mg/kg					n
Flavonóide A 18	5 mg/kg	n	n	n	n	
	15 mg/kg	n	↑*	↓	n	
	30 mg/kg	n	n	n	n	
Flavonóide A 19	5 mg/kg	n	n	n	n	
	15 mg/kg	n	n	↑	n	
	30 mg/kg	n	n	↑	n	
Fração 39-49	30 mg/kg					n
	50 mg/kg					n
	80 mg/kg					n
Aquoso Frio (AF)	50 mg/kg	n	↑	↑**	↑*	
	100 mg/kg	n	↑*	↑**	↑*	
	200 mg/kg	n	↑	↑**	↑*	↓***
	400 mg/kg					↓***
Aquoso Quente (AQ)	50 mg/kg	n	n	n	n	
	100 mg/kg	n	n	n	n	
	200 mg/kg	n	n	n	n	↓**
	400 mg/kg					↓***

[a]↑:aumento do parâmetro
[b]↓ diminuição do parâmetro
n: parâmetro não alterou
***** : p<0,05
******: p<0,01
*******: p< 0,001

4.7 Efeito do extrato aquoso frio (AF) e extrato aquoso quente (AQ) sobre as subpopulações de linfócitos esplênicos e sobre a ativação de linfócitos

O tratamento com 100 mg/kg do extrato AF ou com 200 mg/kg do extrato AQ dos animais imunizados com EC ou não imunizados, não induziu alterações nas porcentagens de células T (CD3+), suas subpopulações (CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+) e células B (CD19+). Também não foi verificada alteração na porcentagem de células expressando os diferentes marcadores de ativação analisados (tabela 5).

Tabela 5 – Células do baço de camundongos BALB/c dos grupos tratados ou não com os extratos aquosos AF e AQ.

	Grupos					
Marcadores	Controle negativo	Controle positivo	Não-imunizados + extrato AQ	Imunizados + extrato AQ	Não-imunizados + extrato AF	Imunizados + extrato AF
$CD19^+$	40,8 ± 1,2[a]	42,2 ± 1,3	40,9 ± 1,5	40,7 ± 1,1	41,1 ± 2,4	41,2 ± 2,6
$CD3^+$	27,7 ± 1,9	26,9 ± 2,2	25,6 ± 2,2	25,4 ± 2,7	22,9 ± 1,7	25,5 ± 2,8
$CD3^+/CD4^+$	18,3 ± 1,3	18,0 ± 1,6	16,2 ± 1,6	17,1 ± 2,4	14,5 ± 1,3	14,5 ± 1,1
$CD3^+/CD8^+$	9,1 ± 0,8	8,45 ± 1,0	9,2 ± 0,9	8,5 ± 1,3	7,6 ± 1,1	6,8 ± 0,3
$CD19^+/CD40^+$	41,7 ± 1,7	41,6 ± 2,6	41,7 ± 1,04	38,3 ± 5,0	37,7 ± 2,6	40,0 ± 2,7
$CD19^+/CD69^+$	10,4 ± 2,8	10,8 ± 2,3	7,6 ±1,0	8,4 ± 1,3	11,3 ± 2,8	14,5 ± 2,1
$CD4^+/CD25^+$	3,8 ± 0,7	3,8 ± 0,8	4,2 ± 0,82	4,2 ± 1,2	3,3 ± 0,8	3,3 ± 0,7
$CD8^+/CD25^+$	1,7 ±0,4	1,7 ± 0,5	2,1 ± 0,7	2,1 ± 0,9	1,4 ± 0,4	5,2 ± 4,0
$CD4^+/CD45RB^+$	21,4 ±1,9	20,7 ± 1,2	19,8 ± 1,3	19,3 ± 1,8	21,1 ± 1,9	21,2 ± 1,2
$CD8^+/CD45RB^+$	8,3 ± 1,7	7,7 ± 1,3	9,4 ± 2,0	9,4 ± 2,3	5,8 ± 0,4	5,0 ± 0,4
$CD4^+/CD69^+$	5,0 ± 0,9	4,7 ± 0,9	4,7 ± 0.7	5,1 ± 1,0	4,7 ± 1,1	4,2 ± 1,1
$CD8^+/CD69^+$	3,6 ± 0,5	2,9 ± 0,7	3,6 ± 1,4	3,4 ± 0,8	3,3 ± 0,5	2,9 ± 0,4

[a] Os valores representam a média ± erro padrão da porcentagem de células expressando os marcadores avaliados .
Controle negativo: animais que receberam salina estéril; Controle positivo: animais imunizados com EC e que receberam salina estéril; Não-imunizados + extrato AQ: animais que não foram imunizados e receberam 200 mg/kg do extrato aquoso quente; Imunizados + extrato AQ: animais que foram imunizados com EC e receberam 200 mg/kg do extrato aquoso quente; Não-imunizados + extrato AF: animais que não foram imunizados e receberam 100 mg/kg do extrato aquoso frio; Imunizados + extrato AF: animais que foram imunizados com EC e receberam 100 mg/kg do extrato aquoso frio. A população de linfócitos foi selecionada de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e de granularidade (SSC).

4.8 Efeito do extrato aquoso frio liofilizado (AF) e extrato aquoso quente liofilizado (AQ) na indução da apoptose

Eletroforese em gel de agarose

Com o intuito de verificar a presença de DNA cromossômico fragmentado, que é uma característica de células apoptóticas, o DNA extraído das células do baço dos animais tratados foi submetido à eletroforese em gel de agarose (figura 34). Não foi observado fragmentação do DNA nos camundongos tratados com os extratos aquosos frio e quente (AF e AQ) imunizados ou não, nas doses e período avaliados.

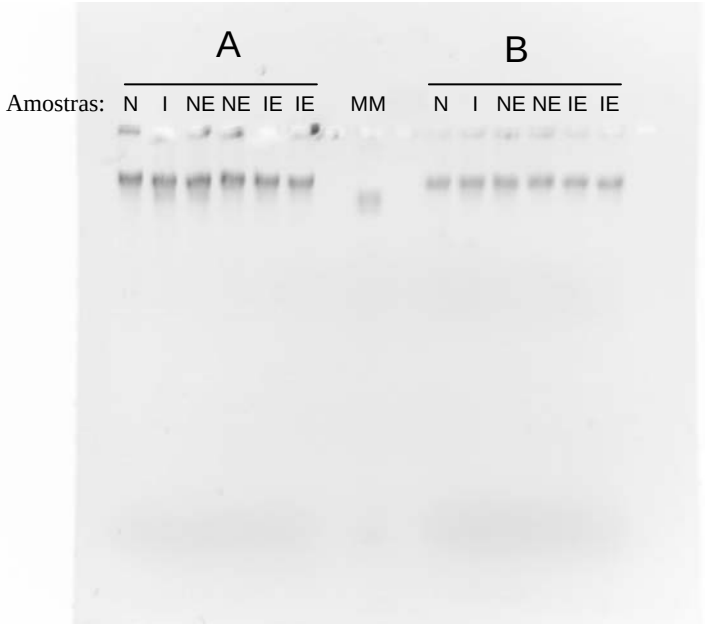

Figura 34 – Análise eletroforética do DNA de células do baço de camundongos BALB/c tratados ou não com os extratos aquosos AF e AQ. As amostras dos grupos (0,6 µg/mL) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para verificação de fragmentação do DNA extraído de células do baço de animais; N – controle negativo e I – controle positivo, NE - animais que receberam somente 100 mg/kg do extrato AF ou 200 mg/kg do extrato AQ, IE - animais imunizados com EC e que receberam 100 mg/kg do extrato AF ou 200 mg/kg do extrato AQ. MM: marcador de peso molecular, 123pb. Figura representativa de 2 experimentos **A** (extrato AF) e **B** (extrato AQ), de uma série de 6 experimentos.

Utilização de Anexina V (AV) e Iodeto de propídeo (PI)

Foi verificada também a capacidade dos extratos aquosos de induzir apoptose nas células do baço dos animais dos diferentes grupos experimentais utilizando AV e PI. As células em apoptose foram definidas como AV^+/PI^- e as células em necrose foram definidas como AV^-/PI^+. O tratamento com os extratos aquosos (AF e AQ) nas doses e período avaliados não alterou significantemente a porcentagem de células AV^+ quando comparados com os respectivos controles (tabela 6), que indicaria um aumento na porcentagem das células em apoptose.

Tabela 6 - Células do baço de camundongos AIRmax expressando fosfatidilserina (AV+) ou iodeto de propídeo (PI+) em sua superfície

Grupos	Marcadores		
	AV^+	PI^+	AV^+/PI^+
Controle negativo	16,2 ± 2,7[a]	2,4 ± 0,5	0,8 ± 0,2
Controle positivo	22,4 ± 4,5	1,6 ± 0,4	1,0 ± 0,1
Não imunizado + extrato AQ	18,3 ± 3,4	1,9 ± 0,4	1,2 ± 0,3
Imunizado + extrato AQ	15,9 ± 2,2	2,0 ± 0,5	0,9 ± 0,2
Não imunizado + extrato AF	18,9 ± 2,9	1,9 ± 0,3	1,0 ± 0,2
imunizado + extrato AF	24,5 ± 4,1	2,5 ± 0,5	1,3 ± 0,1

[a] Os valores representam a média ± erro padrão da porcentagem de células AV^+ e PI^+
Controle negativo: animais que receberam salina estéril; Controle positivo: animais imunizados com EC e que receberam salina estéril; Não-imunizados + extrato AQ: animais que não foram imunizados e receberam 200 mg/kg do extrato aquoso quente; Imunizados + extrato AQ: animais que foram imunizados com EC e receberam 200 mg/kg do extrato aquoso quente; Não-imunizados + extrato AF: animais que não foram imunizados e receberam 100 mg/kg do extrato aquoso frio; Imunizados + extrato AF: animais que foram imunizados com EC e receberam 100 mg/kg do extrato aquoso frio

4.9 Investigação do efeito do extrato Aquoso Frio (AF) na artrite induzida por pristane (PIA) em camundongos AIRmax

Os camundongos AIRmax, linhagem não isogênica designada como máxima reação inflamatória, foram utilizados para avaliar o efeito do extrato aquoso frio (AF) na artrite induzida por pristane. Os primeiros sinais de inchaço em uma ou mais patas e articulações apareceram entre 120 e 180 dias após a primeira injeção de pristane. Após 210 dias, o grupo 4 (G4) que recebeu apenas pristane, apresentou 70,0% de incidência de artrite enquanto os grupos 1(G1) e 2 (G2) que foram tratados com o extrato aquoso frio apresentaram 54,5% e 66,7% de incidência de artrite, respectivamente (figura 35). Os animais do grupo 3, que receberam apenas o tratamento com o extrato, não desenvolveram artrite. Em relação a média dos pontos atribuídos às articulações dos animais para a determinação da presença e gravidade da artrite, também é possível observar menor pontuação do G1 em relação aos grupos G2 e G4 após 200 e 210 dias (figura 36). A presença de deformidade nas articulações nos camundongos foi determinada pelo inchaço intenso e distorção das articulações. Os grupos G2 e G4 apresentaram 33,3% e 30,0% de animais com deformidade enquanto em G1 apenas 18,7% dos animais apresentaram artrose (figura 37). 50% dos animais do G4 desenvolveram ascite, reação inflamatória onde ocorre o acúmulo anormal de líquido na cavidade peritoneal, devido à aplicação do pristane, fenômeno menos freqüente em G1 (18,2%) e G2 (6,7%) (figura 38). É possível observar que o início do desenvolvimento da artrite, aparecimento de inchaço nas patas e articulações, nos animais do G4 aconteceu mais tardiamente. No entanto após 90 dias da primeira injeção de pristane um camundongo deste grupo já apresentava ascite. Os animais

do G3 não apresentaram deformidade das articulações nem desenvolveram ascite (figura 37 e 38). Ressalta-se que os índices de sobrevivência nos grupos de animais que receberam o extrato foram superiores ao grupo controle positivo (G1= 86,7%; G2= 93,7%; G4= 60,0%) demonstrado na figura 39. A taxa de sobrevivência do grupo G3 foi de 100% ao final do experimento.

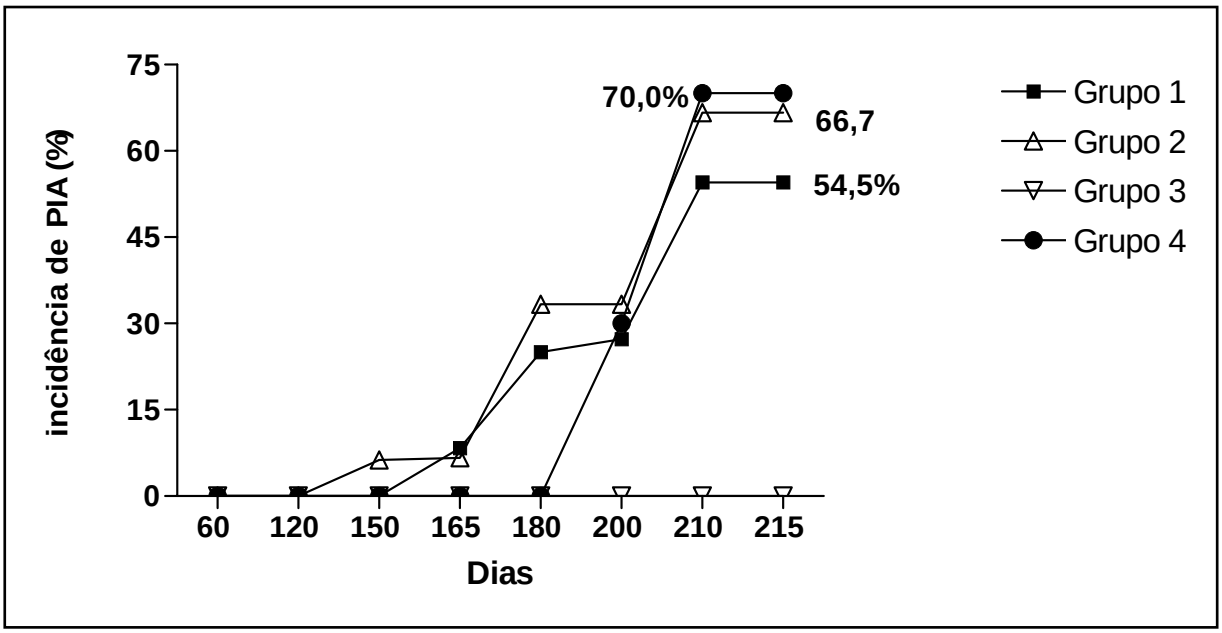

Figura 35 - Incidência de artrite em camundongos AIRmax nos diferentes grupos avaliados. Os valores representam a porcentagem do número de animais que desenvolveram artrite (pontuação ≥ 4). Os camundongos receberam duas injeções de 0,4 mL de pristane com intervalo de 60 dias e foram observados por aproximadamente 215 dias.

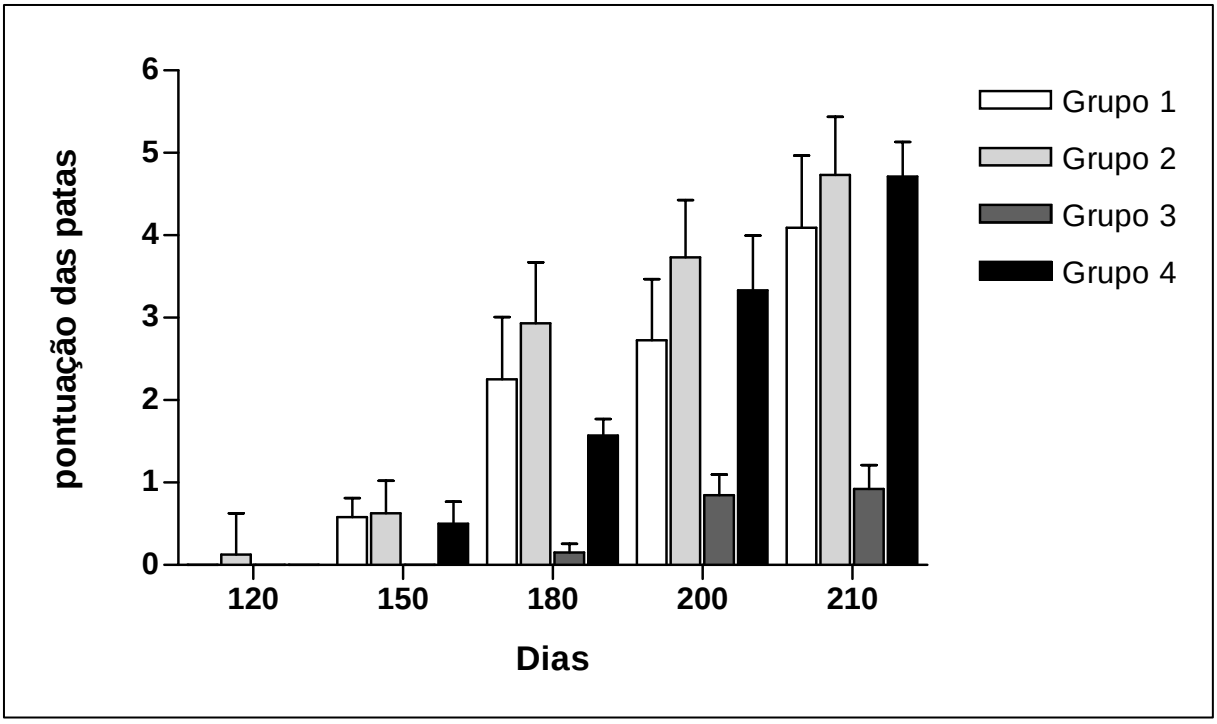

Figura 36 - Pontuação atribuída às articulações dos camundongos AIRmax para avaliação do desenvolvimento de artrite nos diferentes grupos estudados. Os valores representam a média dos pontos (valores absolutos) atribuídos às articulações. Os camundongos receberam duas injeções de 0,4 mL de pristane com intervalo de 60 dias e foram observados por aproximadamente 215 dias.

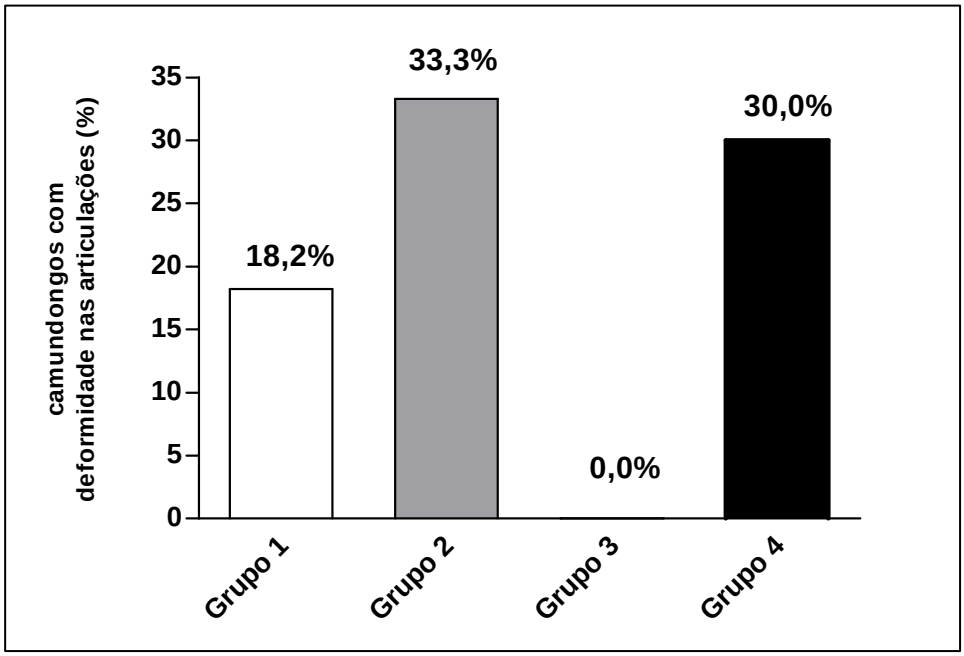

Figura 37 - Incidência de deformidade nas articulações de camundongos AIRmax nos diferentes grupos avaliados. Os valores representam a porcentagem do número de animais que apresentaram deformidade nas articulações. Os camundongos receberam duas injeções de 0,4 mL de pristane com intervalo de 60 dias e foram observados por aproximadamente 215 dias.

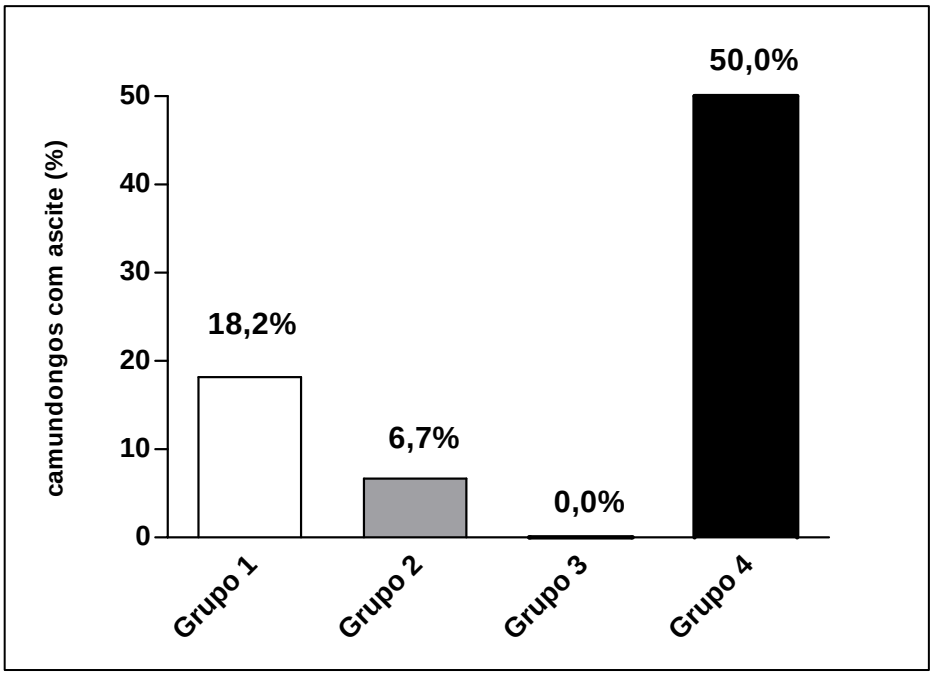

Figura 38 - Incidência de ascite em camundongos AIRmax nos diferentes grupos avaliados. Os valores representam a porcentagem do número de animais que apresentaram ascite. Os camundongos receberam duas injeções de 0,4 mL de pristane com intervalo de 60 dias e foram observados por aproximadamente 215 dias.

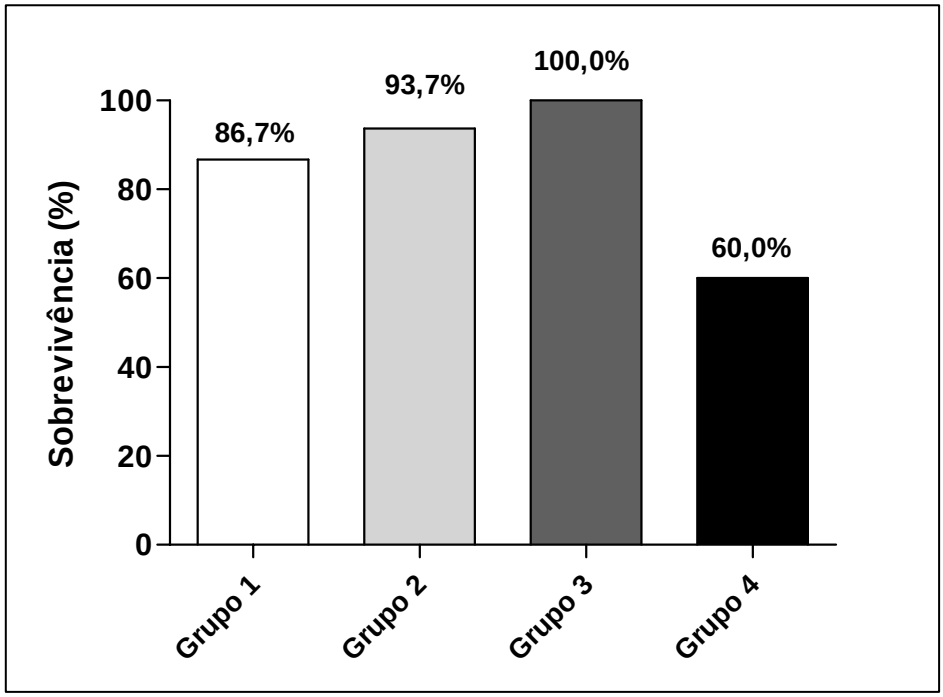

Figura 39 - Índice de sobrevivência dos grupos de camundongos AIRmax dos grupos avaliados. Os valores representam a porcentagem do número de animais que permaneceram vivos até o fiinal dos experimentos. Os camundongos receberam duas injeções de 0,4 mL de pristane com intervalo de 60 dias e foram observados por aproximadamente 215 dias.

4.10 Efeito do extrato aquoso frio (AF) sobre as subpopulações de linfócitos esplênicos e sobre a ativação de linfócitos na artrite induzida por pristane (PIA) em camundongos AIRmax

Ao avaliarmos o efeito do extrato AF nos diferentes grupos tratados, não observamos alterações nas porcentagens de células T (CD3+), suas subpopulações (CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+) e células B (CD19+) como demonstrado na figura 40. Também não foi verificada alteração na porcentagem de células T expressando os diferentes marcadores de ativação analisados (tabela 7) entre os grupos. Em relação à porcentagem de células B expressando os marcadores de ativação avaliados, ocorreu aumento significativo ($p<0,05$) do número de células expressando CD69 no G1 em comparação com G4 como observado na figura 41. Essas análises foram realizadas ao final do período de observação do desenvolvimento da artrite, portanto aproximadamente 215 dias após as injeções de pristane. Para a realização desses ensaios e também para a avaliação da indução de apoptose, as células de camundongos AIRmax que não receberam nenhum tipo de tratamento, nem pristane, foram utilizadas. Esse grupo de animais foi denominado grupo 05 (G5) e os dados foram utilizados para comparação com os grupos tratados.

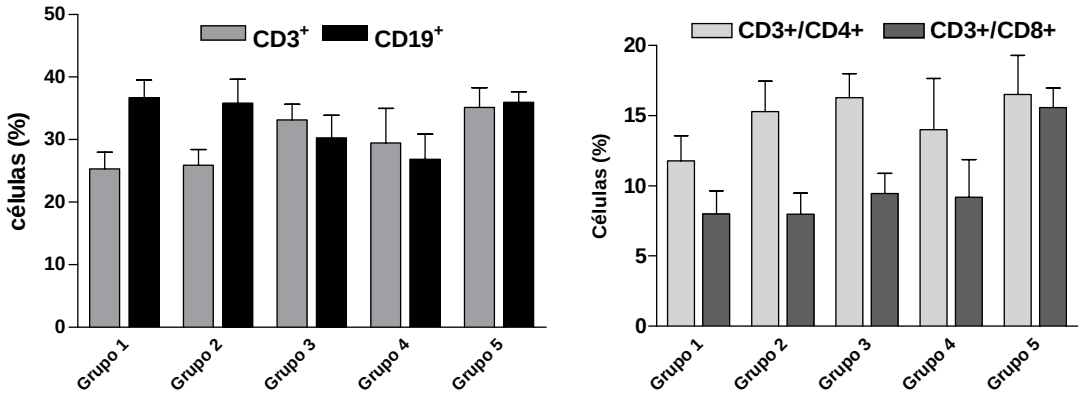

Figura 40 - Porcentagem de células T (CD3+) e celulas B (CD19+) (**A**) e células T CD4+ e CD8+ (**B)** de camundongos AIRmax nos diferentes grupos avaliados. Os valores representam a média ± erro padrão da porcentagem das células. A população de linfócitos foi selecionada de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e de granularidade (SSC).

Tabela 7 – Efeito dos extratos AF sobre a porcentagem de células esplênicas expressando os marcadores avaliados em camundongos AIRmax dos diferentes grupos

marcadores	Grupo 1	Grupo 2	Grupo3	Grupo 4	Grupo 5
$CD3^+$	25,3 ± 2,7	25,9 ± 2,5	33,1 ± 2,5	29,5 ± 5,5	35,2 ± 3,1
$CD19^+$	36,7 ± 2,8	35,8 ± 3,8	30,3 ± 3,6	26,9 ± 4,0	35,9 ± 1,7
$CD3^+/CD4^+$	11,8 ± 1,8	15,3 ± 2,2	16,3 ± 1,7	14,0 ± 3,3	16,5 ± 2,8
$CD3^+/CD8^+$	8,0 ± 1,7	8,0 ± 1,5	9,5 ± 1,4	9,2 ± 2,7	15,6 ± 1,4
$CD19^+/CD40^+$	26,4 ± 4,3	26,8 ± 4,0	23,2 ± 2,6	21,5 ± 3,2	25,3 ± 3,2
$CD19^+/CD69^+$	15,6 ± 3,2	12,5 ± 2,4	9,5 ± 1,1	9,8 ± 2,0	6,9 ± 1,2
$CD4^+/CD25^+$	4,0 ± 0,5	3,9 ± 0,4	3,8 ± 0,4	3,3 ± 0,7	4,6 ± 0,5
$CD8^+/CD25^+$	1,5 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,7 ± 0,2
$CD4^+/CD45RB^+$	11,4 ± 2,0	14,5 ± 1,6	17,5 ± 1,5	13,2 ± 3,1	19,4 ± 2,0
$CD8^+/CD45RB^+$	5,3 ± 1,0	4,7 ± 0,7	6,0 ± 0,9	5,8 ± 1,3	10,0 ± 0,9
$CD4^+/CD69^+$	5,9 ± 0,6	5,9 ± 0,7	6,0 ± 0,8	5,6 ± 0,7	7,1 ± 1,1
$CD8^+/CD69^+$	2,7 ± 0,4	2,4 ± 0,3	2,3 ± 0,3	2,1 ± 0,4	4,3 ± 0,6

[a] Os valores representam a média ± erro padrão da porcentagem de células expressando os marcadores avaliados .
A população de linfócitos foi selecionada de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e de granularidade (SSC).

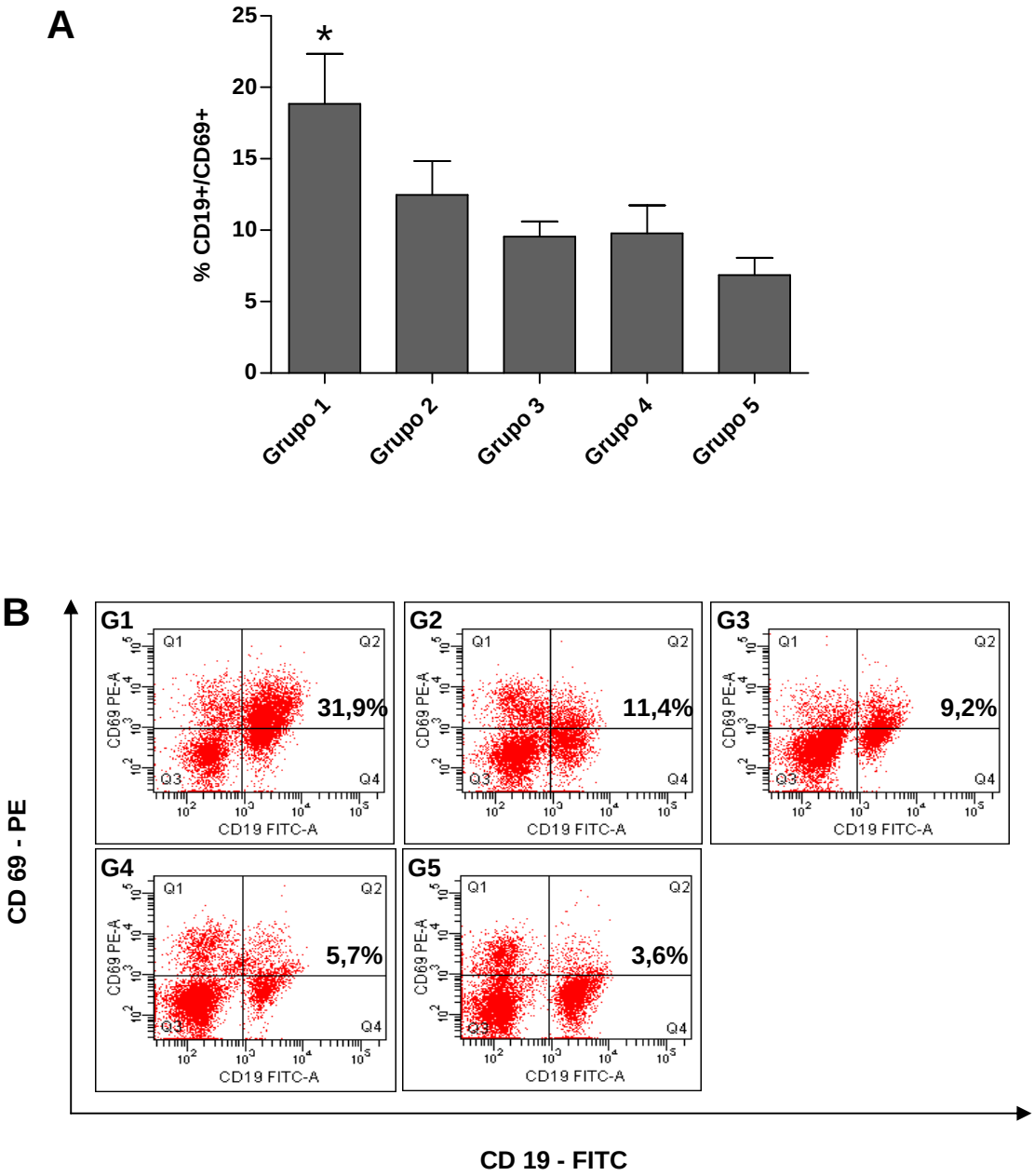

Figura 41 - Detecção de células B/CD69+ em camundongos AIRmax tratados ou não como extrato AF. **(A)** Gráfico de barras representa a média ± erro padrão da porcentagem das células do baço (n=7). *p < 0,05. **(B)** "Dot plots" representativos das células do baço CD19+/CD69+ de sete experimentos. **G1**= grupo 1; **G2**= grupo 2; **G3**= grupo 3; **G4**= grupo 4 e **G5**= grupo 5. A população de linfócitos foi selecionada de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e de granularidade (SSC).

4.11 Efeito do extrato aquoso frio (AF) na indução da apoptose na artrite induzida por pristane (PIA) em camundongos AIRmax

Eletroforese em gel de agarose

O DNA extraído das células do baço dos camundongos tratados com extrato AF e dos grupos 4 e 5, foi submetido à eletroforese em gel de agarose (figura 43). Não foi observada fragmentação do DNA das células destes animais (G1, G2, G3, G4 e G5), após o período de avaliação do desenvolvimento da artrite.

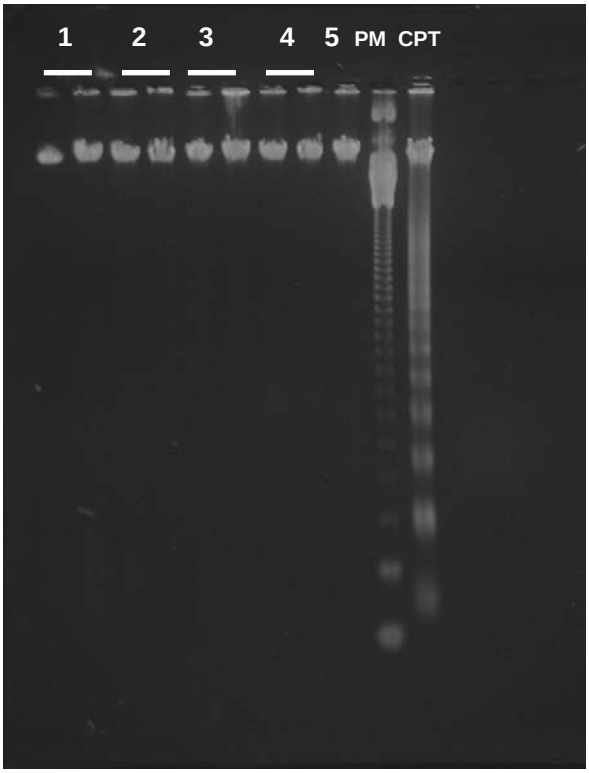

Figura 42 – Análise eletroforética do DNA de células do baço de camundongos AIRmax tratados ou não com extrato AF. As amostras dos grupos (0,6 μg/mL) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para verificação de fragmentação do DNA extraído de células do baço de animais; Poços: **1 –** Grupo 1; **2** – Grupo 2; **3** – Grupo 3; **4** – Grupo 4; **5** – Grupo 5. Amostras de DNA derivadas de linfócitos tratados com o agente apoptótico, *campotothecin* (**CPT**, 10μM) foram usadas como referência para a fragmentação de DNA. MM: marcador de peso molecular, 123pb. Figura representativa de uma série de 7 experimentos.

Detecção da externalização de fosfatidilserina por citometria de fluxo através da utilização de Anexina V (AV) e Iodeto de propídeo (PI)

A capacidade do extrato AF de induzir apoptose nas células do baço dos animais AIRmax dos diferentes grupos foi avaliada com a utilização de AV e PI. As células em apoptose foram definidas como AV^+/PI^- e as células em necrose foram definidas como AV^-/PI^+. O tratamento com o extrato após o período de avaliação do desenvolvimento de artrite não alterou a porcentagem de células AV^+/PI^- nos grupos G1 e G2 quando comparados com os grupos G4 e G5 (tabela 7 e figura 44), indicando que não ocorreu indução de apoptose nessas condições.

Tabela 8 - Células do baço de camundongos AIRmax expressando fosfatidilserina (AV+) ou iodeto de propídeo (PI+) em sua superfície

	Marcadores		
camundongos AIRmax	AV^+	PI^+	AV^+/PI^+
Grupo 1	10,1 ± 2,8 [a]	10,8 ± 2,1	5,5 ±1,2
Grupo 2	8,8 ± 2,5	8,9 ± 2,2	4,8 ± 1,1
Grupo 3	10,7 ± 2,8	13,4 ± 2,6	5,6 ± 1,4
Grupo 4	9,5 ± 2,3	9,3 ± 1,2	4,0 ±1,1
Grupo 5	12,8 ± 1,3	10,6 ± 3,1	5,5 ± 0,46

[a] Os valores representam a média ± erro padrão da porcentagem de células AV+, PI+ e AV+/PI+
AV: anexina V; PI: iodeto de propídeo

5. DISCUSSÃO

Atualmente existe grande interesse na investigação do potencial terapêutico de diferentes espécies vegetais e na validação científica do uso de plantas na medicina popular. Estudos têm mostrado grande número de plantas e seus constituintes como potenciais imunomoduladores, atuando como antiinflamatórios, anti-stress ou anti-cancerígenos (Bin-Hafeez *et al*., 2003). Plantas do gênero *Alternanthera* vêm sendo estudadas por suas propriedades antiparasitárias, antibacterianas e antivirais, entre outras. No Brasil, a *Alternanthera tenella* Colla é utilizada na medicina popular por possuir atividade antiinflamatória. Quatro extratos brutos, duas frações e também duas substâncias isoladas (flavonóides) de *A. tenella*, foram utilizados inicialmente neste estudo. Destes compostos testados, o extrato aquoso extraído a frio (AF) foi selecionado para a utilização no modelo de artrite proposto, por demonstrar atividades imunoestimulante e antiinflamatória, além de não apresentar toxicidade em relação aos parâmetros avaliados em camundongos BALB/c. Os resultados obtidos encorajam uma investigação ampla e detalhada das atividades biológicas e dos mecanismos de ação do extrato AF, que apresentou potencial ação moduladora na artrite induzida por pristane em camundongos.

Pesquisas em busca de novas alternativas terapêuticas incluem avaliações sobre a toxicidade das substâncias testadas. Parâmetros clássicos incluem peso corporal, peso e celularidade de órgãos (Putman *et al*., 2002). O tratamento com o extrato AF não alterou o peso corporal e de órgãos como baço, fígado e timo, dos animais tratados com as doses de 50, 100 e 200 mg/kg. A diminuição no peso dos órgãos, especialmente do baço, seria um indicativo de toxicidade (Doi *et. al*, 1996; Davis e Kuttan, 2000). Outro parâmetro analisado quanto à imunotoxicidade foi a capacidade de indução de apoptose em linfócitos esplênicos. Nas células dos

animais tratados com o extrato AF não foi observada alteração na inducão de apoptose, avaliada pelos ensaios de identificação da fragmentação de DNA e da exposição de fosfatidilserina.

Inicialmente, investigamos propriedades imunomoduladoras específicas, focalizando os estudos na produção de imunoglobulinas por linfócitos B e na resposta inflamatória. Animais tratados com 100 mg/kg do extrato AF apresentaram maiores números de PFC anti-EC em comparação aos controles não imunizados ($p<0,05$). Adicionalmente AF estimulou a produção de anticorpos circulantes anti-EC, IgM após 4 e 7 dias e IgG após 7 dias. Estes resultados identificaram ações imunoestimulantes do extrato, sugerindo que sua administração pode afetar o resultado de uma resposta imune adquirida.

O ensaio de edema induzido por carragenina é comumente usado como modelo experimental para avaliar o potencial antiinflamatório de produtos naturais. Acredita-se que a primeira fase do processo envolva a liberação de serotonina, histamina e cininas e a segunda fase seja mediada por prostaglandina e produtos da ciclooxigenase (Vinegar *et al.,* 1969; Winter *et al.,* 1962). Neste modelo, o edema foi significativamente reduzido após o tratamento com os extratos AF e AQ nas doses de 200 e 400 mg/kg, sendo mais pronunciado com a utilização do extrato AF. A atividade antiinflamatória demonstrada pelo AF nas condições apresentadas foi semelhante à da indometacina, droga utilizada como controle positivo nesse estudo, e um inibidor poderoso de prostaglandinas sintases (ciclooxigenases 1 e 2). Este resultado sugere que a atividade da planta pode ser ao menos parcialmente mediada pela inibição dessas enzimas.

No conjunto, os resultados obtidos mostraram claramente a presença de componentes imunomoduladores no extrato aquoso extraído a frio de *A. tenella*.

A caracterização química inicial desse extrato revelou a presença de compostos polifenólicos, glicosídeos e saponinas (Biella et al, 2007 – artigo submetido). Há possibilidade da presença de heterosídeos flavonóides nesses polifenóis derivados de aglicanas, como quercetina, isorhamnetina e caempferol. Estes compostos foram isolados em estudos fitoquímicos realizados previamente com os extratos etanólicos deste vegetal (Salvador et al, 2006). Flavonóides possuem diversas propriedades farmacológicas incluindo atividades imunomoduladoras, anti-oxidantes e antiinflamatórias (Ielpo et al, 2000), e sua presença no extrato AF poderia justificar, ainda que parcialmente, os resultados obtidos neste estudo.

Adicionalmente, nossos estudos estabeleceram que compostos ativos responsáveis pela atividade imunomodulatória observada, poderiam ser extraídos a frio, mas não a quente, utilizando água como solvente.

Apesar da utilização de *A. tenella* na medicina popular, estudos das atividades biológicas desta espécie são escassos. Guerra e colaboradores (1993) descreveram que o extrato aquoso bruto de partes aéreas de *A. tenella* (tronco e folhas), na dose de 50 mg/kg, via intraperitoneal, aumentou a produção de anticorpos IgM e IgG2a em camundongos tratados com LPS, mas que a dose de 5 mg/kg reduziu a produção de IgM anti-EC. Outro estudo, incluindo outras espécies de *Alternanthera* (Moraes *et al.*, 1994), descreve a inibição da proliferação de linfócitos por uma substância isolada de *A. tenella*, solubilizada em água.

As informações descritas acima ressaltam o pioneirismo deste estudo multiparamétrico onde foram avaliadas atividades dos extratos de *A. tenella* utilizando ensaios funcionais e um modelo de artrite experimental. Vale ressaltar que o modelo de artrite induzida por pristane (PIA) em camundongos (Wooley, 1989), e

mais especificamente, o modelo de PIA em camundongos AIRmax e AIRmin (Vigar et al., 2000) não foram, até o momento utilizados para investigação dos efeitos de compostos vegetais no processo da doença.

Os camundongos AIRmax, linhagem não isogênica selecionada para resposta inflamatória aguda máxima, foram utilizados para avaliar o efeito de 200 mg/kg do extrato aquoso frio (AF) na artrite induzida por pristane. A diminuição de 22% da incidência de artrite no grupo 1 (G1= 54,4%) em relação ao grupo controle que não recebeu AF (G4= 70%) sugere a atividade moduladora do extrato. O grupo 1 recebeu seis doses do extrato antes e logo após a primeira injeção de pristane. Essa atividade moduladora também foi evidenciada pela diminuição do número de camundongos que apresentaram deformidade nas articulações no grupo 1 (18,7%) em relação aos grupos 2 (33%) e 4 (30%). Estes resultados sugerem ação do extrato AF no desenvolvimento da doença, visto que a deformidade nas articulações está relacionada com a gravidade da artrite. Interessantemente, o tratamento com o extrato AF diminuiu o desenvolvimento da ascite (plasmacitoma) nos camundongos que receberam pristane. No grupo 4, 50% dos camundongos apresentaram essa inflamação, que aconteceu com menor freqüência nos grupos 1 e 2 (18,2% e 6,7%, respectivamente). Animais do grupo 4 apresentaram alto índice de mortalidade e atraso no início e no desenvolvimento da artrite. Potter e Wax (1981) ao utilizarem pristane para induzir plasmacitoma em camundongos BALB/c, descreveram a indução de artrite pelo óleo e observaram que camundongos que apresentaram ascite, não desenvolveram artrite e vice-versa. Wooley e colaboradores em 1989, investigando as características imunológicas, histológicas e genéticas de linhagens de camundongos suscetíveis à PIA, verificaram que vários camundongos BALB/cByJ desenvolveram ascite e morreram. Fato semelhante aconteceu com os

camundongos do grupo 4 onde a maioria que apresentou ascite não desenvolveu artrite e morreu. Alguns camundongos começaram a desenvolver ascite aproximadamente 90 dias após a injeção de pristane. Dos animais que desenvolveram ascite apenas dois chegaram a apresentar a pontuação mínima das patas indicando a presença de artrite. Os grupos 1 e 2 tratados com o extrato apresentaram maior índice de sobrevivência em comparação ao grupo 4 sugerindo atividade protetora do extrato.

No modelo murino de PIA, a injeção do óleo mineral na cavidade intraperitoneal de camundongos BALB/c induz peritonite crônica que é associada com níveis elevados e persistentes de IL-6. Uma alta porcentagem dos camundongos desenvolve plasmacitomas dependentes desta interleucina (Hinson et al, 1996). Nesses animais, síntese aumentada de prostaglandina E_2 (PGE_2) nas cavidades peritoneais induz, diretamente, níveis elevados de IL-6, e este processo parece ser mediado pela ciclooxigenase-2 (Hinson et al, 1996). À luz dessas observações e considerando que a indometacina reduz os níveis de IL-6 nos camundongos tratados com pristane (Hinson et al, 1996), bem como inibe a formação de plasmacitomas induzidos por este óleo (Potter et al., 1997), podemos sugerir que a redução da incidência de ascite nos animais AIRmax tratados com o extrato AF poderia ser dependente da modulação das ciclooxigenases, a exemplo do que foi sugerido para o efeito antiinflamatório observado no edema de pata induzido por carragenina em camundongos isogênicos BALB/c. A inexistência de trabalhos na literatura que avaliam os efeitos antiinflamatórios de extratos e substâncias derivados de plantas neste modelo de artrite não permite maiores discussões.

Com o intuito de analisar possíveis alterações em subpopulações de linfócitos esplênicos e na expressão de marcadores de ativação nessas células, ocasionadas

pela administração do extrato, foi realizada análise multiparamétrica com amplo painel de anticorpos monoclonais. A administração do extrato AF nos diferentes grupos de animais não induziu variações quantitativas nas populações de linfócitos (T e B), nas subpopulações de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ e células T regulatórias ($CD4^+/CD25^+$). Também não ocorreram alterações no número de células T expressando marcadores de ativação nos animais tratados com o extrato (G1 e G2) em comparação com os animais que receberam apenas o pristane (G4). Esses resultados sugerem que a ação do extrato AF nas condições experimentais utilizadas aparentemente não depende de linfócitos T presentes no baço.

Apesar da dificuldade de se estabelecer o mecanismo patogênico do envolvimento da célula T na artrite reumatóide, os modelos experimentais, principalmente a artrite induzida por pristane, proporcionam meios de avaliar mecanismos hipotéticos para esses estudos (Wooley *et al*., 1998). Na literatura, alguns trabalhos descritos sugerem a participação de células T na PIA. Camundongos atímicos (BALB/c *nu/nu*) foram resistentes à indução de artrite, enquanto que heterozigotos (BALB/c *nu/*+) da mesma ninhada foram suscetíveis (Wooley *et al*., 1989). Em outro estudo, a irradiação de camundongos suscetíveis preveniu o início da PIA, e a posterior transferência de células imunes adaptativas resultou em suscetibilidade (Bedwell *et al.*, 1987). A depleção de célula T com anticorpo monoclonal específico para linfócito T CD4+ reduziu significantemente a incidência de PIA e retardou o início da doença em camundongos suscetíveis (Levitt *et al.*, 1992). A aparente contradição entre os resultados aqui obtidos e relatos da literatura pode ser justificada pelas diferentes condições experimentais nas quais os estudos foram realizados. Nós avaliamos a ação do extrato AF nas subpopulações de linfócitos do baço de animais AIRmax, após aproximadamente 215 dias da

indução de artrite, portanto na fase de doença estabelecida. Na maioria dos relatos observados, as investigações aconteceram nos estágios iniciais da artrite. Outra diferença observada relaciona-se à origem das células utilizadas para avaliação das subpopulações de linfócitos. Nos artigos pesquisados, foram utilizados linfócitos originados de linfonodos enquanto que no presente estudo linfócitos esplênicos constituiram o alvo das investigações.

Drogas anti-reumáticas empregadas para o tratamento da artrite reumatóide incluem os antiinflamatórios não-esteróides (AINEs), os glicocorticóides e drogas modificadoras do curso da doença (DMARDs, *Disease Modifying Antirheumatic Drugs*). AINEs incluem aspirina, ibuprofeno, celecoxibe e rofecoxibe, e atuam inibindo as enzimas ciclooxigenases (COX) 1 e 2, e consequentemente diminuindo a síntese de prostaglandinas. DMARDs incluem metotrexato, leflunomida e D-penicilamina, e alteram a evolução da artrite reumatóide. Mais recentemente, foram aprovados novos agentes terapêuticos que modificam respostas biológicas, entre eles os anticorpos anti-TNF, etanercept e infliximab (Goldblat; Isenberg, 2005).

Em uma tentativa de comparação dos nossos resultados com relatos na literatura, podemos citar a D-penicilamina, uma droga anti-reumática que apresenta efeitos benéficos em humanos, apesar de seu uso diminuído recentemente por causa dos seus efeitos colaterais. Nishikaku *et al*., 1994 descreveu seu efeito terapêutico benéfico em modelo de artrite induzida por pristane, em comparação com outras drogas. De forma similar ao observado com o extrato AF, camundongos submetidos ao tratamento com D-penicilamina não apresentaram alteração no número de células T expressando CD44 (marcador murino de células T de memória) em relação aos animais que receberam pristane, apesar de apresentarem menor incidência de artrite e significante diminuição dos níveis de fator reumatóide. Embora

o mecanismo de ação dessa droga não seja totalmente elucidado, há evidências de que ela atue como imunomodulador, inibindo a função de células T *helper*, a produção de oxidantes por neutrófilos e a supressão da proliferação de fibroblastos (Nishikaku *et al*., 1994). Com base nessas observações e considerando a possibilidade da presença de flavonóides no extrato AF, como mencionado anteriormente, foi realizado um experimento preliminar para testar a hipótese de que o extrato pudesse exercer sua atividade moduladora na artrite atuando em neutrófilos, a exemplo do sugerido para a D-penicilamina. A quimioluminescência (QL) representa um método simples, rápido e sensível para estudar o metabolismo oxidativo de fagócitos e, indiretamente, a fagocitose, processo que pode ser correlacionado com a função geral das células, sua capacidade de induzir morte intracelular e com o dano de tecido nos sítios de inflamação crônica. Este teste ainda é útil para identificar compostos com atividade anti-oxidante e antiinflamatória (Allen;Stjernholm;Steele, 1972). Desta forma, utilizando neutrófilos humanos estimulados com forbol miristato acetato (PMA), determinou-se a quimioluminescência dependente de luminol na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato. Nas condições experimentais, não foram observadas alterações na emissão de quimioluminescência pelos neutrófilos ativados com PMA, sugerindo que, nas concentrações utilizadas, o extrato não apresentou atividade pró-oxidante ou anti-oxidante (resultados não apresentados).

O efeito modulador do extrato AF pode estar relacionado a outros tipos celulares envolvidos na patogênese da artrite como linfócitos B, neutrófilos e macrófagos. Apesar de não alterar o número de linfócitos B presentes no baço dos animais tratados, foi possível observar aumento significativo do número destas células expressando CD69, um marcador de ativação celular, nos animais dos

grupos tratados com o extrato, especialmente nos animais do grupo 1. Mais uma vez é possível sugerir uma possível atividade moduladora do extrato que quando administrado antes e logo após a primeira injeção de pristane, diminuiu a incidência e a gravidade da artrite nos camundongos tratados. A possível ativação das células B nesse modelo apresenta concordância com os efeitos observados nos camundongos BALB/c tratados com AF onde observamos aumento do número de PFC e nos títulos de IgG e IgM anti-EC..

O fato de que o extrato AF apresentou propriedades imunoestimulantes relativas a linfócitos B nos camundongos BALB/c e atividade moduladora em alguns aspectos do desenvolvimento e progressão do processo inflamatório induzido por pristane em camundongos AIRmax (diminuição das taxas de incidência de artrite, da gravidade das lesões e da presença de ascite), gera questionamentos e merece alguns comentários.

Em camundongos, imunocomplexos contendo IgG podem interagir com um de três tipos de receptores celulares para esta classe de imunoglobulina (Clynes et al, 1999). Dois deles, FcγRI e FcγRIII, levam à ativação celular através de uma cadeia γ comum que possui uma seqüência estrutural nos seus domínios citoplasmáticos denominada de motivo de ativação de imuno-receptor baseado em tirosina (ITAM, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*). O terceiro receptor para IgG, FcγRII, contém um motivo de inibição de imuno-receptor baseado em tirosina (ITIM, *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*), que inibe os sinais de ativação dos receptores contendo ITAMs via co-ligação (Clynes et al, 1999; Marzocchi-Machado e Lucisano-Valim, 2005). FcγRII é expresso em todas as células hematopoéticas, incluindo neutrófilos, monócitos e células dendríticas. Considerando sua diversidade estrutural e funcional, a interferência na atividade desses receptores

poderia modular significativamente a expressão da doença em modelos de inflamação e doenças auto-imunes experimentais, incluindo lúpus induzido por pristane (Clynes et al, 2005) e artrite induzida por colágeno (Kleinau et al, 2000). Recentemente, foi demonstrado que efeitos protetores e antiinflamatórios de imunoglobulina intravenosa (IGIV), utilizada há várias décadas como tratamento para várias doenças, incluindo lupus eritematoso sistêmico, miastenia grave e neuropatias auto-imunes, são associados com a modulação dos receptores inibitórios FcγRII (Clynes, 2005).

Finalmente, com base nessas observações, consideramos viável propor a hipótese de que o extrato AF poderia exercer sua ação moduladora na PIA através dos linfócitos B, que atuariam via ITIM dos receptores inibitórios presentes em diferentes tipos celulares.

Os resultados obtidos, portanto, abrem perspectivas para investigações adicionais sobre os mecanismos de ação dos compostos de *A. tenella* investigados e o isolamento e caracterização dos componentes biologicamente ativos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1. Os extratos, frações e os flavonóides de *Alternanthera tenella* Colla investigados não apresentaram toxicidade em camundongos BALB/c nos parâmetros e períodos avaliados,

2. O extrato aquoso frio (AF) apresentou atividade imunoestimulante na resposta imune humoral induzida por antígeno T-dependente (EC), aumentando número de PFC e do título de anticorpos circulantes IgG e IgM em camundongos BALB/c nos períodos avaliados.

3. Os extratos aquosos quente (AQ) e frio (AF) apresentaram atividade anti-inflamatória em edema de pata induzido por carragenina em camundongos BALB/c.

4. O extrato aquoso frio (AF) demonstrou provável atividade moduladora em modelo de artrite induzida por pristane em camundongos AIRmax, diminuindo a incidência de artrite e a incidência de deformidade nas articulações dos animais do grupo 1 em relação ao grupo 4 (controle positivo da artrite).

5. O extrato aquoso frio (AF) diminuiu o desenvolvimento da ascite nos camundongos AIRmax que receberam pristane, como também diminuíram a mortalidade nesses grupos, conforme observada no grupo controle positivo

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCON, M. C. B. V. *et al.* Glaucolide B, a molluscicidal sesquiterpene lactone and other constituents of *Vernonia eremophila.* **Planta Med**., Stuttgart. v. 56, p.271-3, 1990.

ALLEN RC; STJERNHOLM RL & STEELE RH. Evidence for the generation of an eletronic excitation state (s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. **Biochem Biophys Res Commun 47**: 679-684, 1972.

ALTMANN, K. H. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. **Curr Opin Chem Biol.**, London. v. 5, p. 424-431, 2001.

ARAUJO, L. M. M., RIBEIRO, O. G., SIQUEIRA, M., DE FRANCO, M. STAROBINAS, N., MASSA, S., CABRERA, W. H. K., MOUTON, D., SEMAN, M., IBAÑEZ, O. M. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. **Eur. J. Immunol.,** Weinheim. v. 28, p. 2913-20, 1998.

ARNASON, J.T.; MATA, R.; ROMEO, J.T. Proceedings of the thirty fourth annual meeting of the Phytochemical Society of North America on phytochemistry of medicinal plants. In: ARNASON, J. T.; MATA, R.; ROMEO, J. T. (Eds). **Phytochemistry of medicinal plants***.* 1° ed. New York: Plenum Press, 1994, 363p.

ARNETT, F. C.; EDWORTHY, S. M.; BLOCH, D. A. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**., v. 31, p.315-324, 1988.

BALANDRIN, M.F. *et al.* Natural plant chemicals sources of industrial and medicinal materials. **Science***,* Washington. v.228, p.1154, 1985.

BANERJI, A. *et al.* Isolation of ecdysterone from Indian plants. **Phytochemistry***,* Oxford. v.10, p.2225-2226, 1971.

BASSO, L. A. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis and T-cell mediated diseases – A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro. V. 100 (6), p. 575-606, 2005.

BENENCIA, F.; COURRÈGES, M. C.; COULOMBIÈ, F. C. In vivo and in vitro immunomodulatory activities of *Trichilia glabra* leaf extracts. **J. Ethnopharmacol***.,* Lausane. v. 69, p.199-205, 2000.

BIN HAFEEZ, B.; HAQUE, R.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; SAYEED, I.; RAISUDDIN, S. Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum L.*) extract in mice. **Int Immunopharmacol.**, Amsterdam. v. 3, p. 257-265, 2003.

BORCHERS, A. T., SAKAI, S., HENDERSON, G. L. *et al.* Shosaiko-to and other Kampo (Japanese herbal) medicines: a review of their immunomodulatory activities. **J. Ethnopharmacol.,** Lausanne. v.73, p. 1-13, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, New York. v. 72, p. 248-254, 1976.

BROCHADO, C. O.; ALMEIDA, A. P.; BARRETO, B. P. et al. Flavonol robinobiosides and Rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation in vitro. **J. Braz. Chem. Soc**., Rio de Janeiro. v. 14, p. 449-451.

BROWNING, J. L. B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. **Nature Rev. Drug Discov**., v.5, p.564-576, 2006.

BURCHIEL, S. W. ; LAUER, F. T. ; GURULE, D. et al. Uses and future application of flow cytometry in immunotoxicity tests. **Methods**, v.19, p.28-35, 1999.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res**., São Paulo. v.33, p.179-189, 2000.

CARSON, D. A. Rheumatoid factors. In: KELLEY, W. N.; HARRIS, E. D.; RUDDY, S.; SLEDGE, C. B. (Eds.). **Textbook of rheumatology**. 4th ed. Philadelphia: Saunders, 1993.

CARVALHO, L. H. *et al.* Antimalarial activity of crude extracts from brasilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei*-infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo v.24, p.1113-23, 1991.

CLYNES, R. Immune complexes as therapy for autoimmunity. **J. Clin. Invest**., v.115, p.25-27, 2005.

CLYNES, R.; CALVANI, N.; CROKER, B. P.; RICHARDS H. N. Modulation of the immune response in pristane-induced lupus by expression of activation and inhibitory Fc receptors. **Clin. Exp. Immunol**., v.141, p.230-237, 2005.

CLYNES, R.; MAIZES, J. S.; GUINAMARD, R. et al. Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. **J. Exp. Med**., v.189, p.179-185, 1999.

COELHO, M. G. P., MARQUES, P. R., GAYER, C. R. M. VAZ, L. C. A., NOGUEIRA NETO, J. F., SABINO, K. C. C. Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis. **J. Ethnopharmacol.**, Lausane. v. 77, p. 159-164, 2001.

COELHO, M. G.; SABINO, K. C.; DALMAU, S. R. Immunomodulatory effects of sucupira (*Pterodon pubescens*) seed infusion on collagen-induced arthritis. **Clin. Exp. Rheumatol.**, Pisa. v. 22(2), p. 213-218, 2004.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants***.* Boston, Houghton Miffin, 1968, p. 177-180.

DA COSTA, F. B.; ITO, I. Y.; ANDRÉ, R. F. G.; VICHNEWSKI, W. Constituents of *Viguiera species* with antibacterial activity. **Fitoterapia***,* Milano. LXIX(1): 86-7,1998.

DAMRE, A. S.; GOKHALE, A. S.; PHADKE, K. R.; KULKARNI, K. R.; SARAF, M. N. Studies on the immunomodulatory activity of flavonoidal fraction of *Tephrosia purpurea*. **Fitoterapia,** Milano. V. 74, p.257-261, 2003.

DAVIS, L. e KUTTAN, G. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera.* **J. Ethnopharmacol***.,* Lausane. v. 71, p. 193-200, 2000.

DESCOTES, J. Immunotoxicology of immunomodulators. **Dev. Biol. Stand.**, New York. v. 77, p. 99-102, 1992.

DE PASQUALE, A. Pharmacognosy: the oldest modern science. **J. Ethnopharmacol**., Lausane. v. 1, p. 1-16, 1984.

DOI, T.; NAGAI, H.; TSUKUDA, R.; SUZUKI, T. Dose-response relationships, PFC response and histology in the spleen in rats treated with alkylating agents. **Toxicology,** Amsterdam. 107, p.47-60, 1996.

DUARTE, C.D. **Via alternativa do sistema complemento em ratos tratados com propiltiouracil: investigação de componentes e de correlação com níveis séricos de hormônio tireoideano e resposta de produção de anticorpos.** 2002. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciênicas Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ELIZABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **J. Ethnopharmacol.**, Lausane. v. 51, p. 110-120, 1996.

ELMORE, S. A. Enhanced histopathology of the spleen. **Toxicol. Pathol**., v.34, p.648-655, 2006a.

ELMORE, S. A. Enhanced histopathology of the thymus. **Toxicol. Pathol**., v.34, p.656-665, 2006b.

FERREIRA, E. O.; DIAS, D. A. A methylenedioxyflavonol from aerial parts of *Blutaparon portulacoides.* **Phytochemistry***,* Oxford. v.53, p. 145-7, 2000.

FIRENSTEIN, G. S. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **J. Clin. Rheumatol**., v. 11, S39-S44, 2005.

FURLAN, A. A. **Família *Amaranthaceae* na Serra do Cipó, Minas Gerais,** São Paulo, 1986. 271p. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

GALLEGOS OLEA, R. S.; SILVEIRA, L. M. S.; OLIVEIRA, A. V.; MENDES, A. M. C.; CARVALHO, L. C. F. Atividade antibacteriana de frações polares de partes aéreas de *Alternanthera tenella Colla (Amaranthaceae).* "XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL", Recife, Pernambuco – Brasil, 17 a 20 de outubro, **Resumos**, XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, resumo 124, 2000.

GOKHALE, A. B.; DAMRE, A. S.; SARAF, M. N. Investigations into the immunomodulatory activity of *Argyreia speciosa.* **J. Ethnopharmacol.,** Lausanne. v. 84, p. 109-114, 2003.

GOLDBLATT, F.; ISENBERG, D. A. New therapies for rheumatoid arthritis. **Clin. Exp. Immunol**., v.140, p.195-204, 2005.

GOLDFRANK, L. e*t al.* The Pernicious Panacea: Herbal Medicine. **Hospital Physician**, v. 10, p. 64-86, 1982.

GORINSTEIN, S. *et al.* Alcohol-soluble and total proteins from *Amaranth* seeds and their comparison with other cereals. **J. Agric. Food Chem***.,* Washington. v.39, p.851-4, 1991.

GUERRA, R. N. M.; PEREIRA, H. –A. W.; SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G. Immunomodulatory properties of *Alternanthera tenella Colla* aqueous extracts in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.,** São Paulo. v.36, p. 1215-1219, 2003.

HALE, L. P.; HAYNES, B. F. Pathology of rheumatoid arthritis and associated disorders. In: KOOPMAN, W. J. (Ed.) Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology. 13th ed. P.993-1016, 1997.

HASTINGS, K. L.; AHN, C.; ALAM, S. N.; ASZALOS, A.; CHOI, Y. S.; JESSOP, J. J.; WEAVER, J. L. Considerations in assessing the immunotoxic potential of investigational drugs. **Drug Inf. J.**, New York. v. 31, p. 1357-61, 1997.

HERKYK, D. J.; GORE, E. Adequate immunotoxicity testing in drug development. **Toxicol. Lett**., v.149, p.115-122, 2004.

HINSON, R. M.; WILLIAMS, J. A.; SHACTER, E. Elevated interleukin 6 is induced by prostaglandin E2 in a murine model of inflammation: Possible role of cyclooxygenase-2*. Proc. Natl. Acad. Sci*., v.93, p. 4885-4890, 1996.

HOLMDAHL, R.; LORENTZEN, J. C.; LU, S.; OLOFSSON, P.; WESTER, L.; HOLMBERG, J.; PETTERSSON, U. Arthritis induced in rats with non-immunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. **Immunol. Rev.,** Copenhagen. v. 184, p. 184-202, 2001.

IELPO, M. T. L. BASILE, A., MIRANDA, R. et al. Immunopharmacological properties of flavonoids. **Fitoterapia**, Milano. v.71, p. S101-S109, 2000.

JERNE. N. K.; NORDIN, A. A. Plaque formation in agar by single antibody producing cells. **Science**, Washington. v. 140, p.405, 1963.

KIRKPATRICK, P. Antibacterial drugs: stitching together naturally. **Nat Rev Drug Discov**, London. v. 1, p. 748, 2002.

KLEINAU, S.; MARTINSSON, P.; HEYMAN, B. Induction and suppression of collagen-induced arthritis is dependent on distinct Fcγ receptors. **J. Exp. Med.,** v.191, p.1611-1616, 2000.

LI, X. Y. Immunomodulating Chinese herbal medicines. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz***,* Rio de Janeiro. v.86, suppl.2, p.159-64, 1991.

LIN, B-F.; CHIANG, B-L; LIN, J-Y. *Amaranthus spinosus* water extract directly stimulates proliferation of B lymphocytes in vitro. **Int. Immunopharmacol**., Amsterdam. v. 5, 711-722, 2005.

LIN, S. C.; LIN, Y. H.; SHYUU, S.J.; LIN, C.C. Hepatoprotective effects of Taiwan folk medicine – *Alternanthera sessilis* on liver damage induced by various hepatotoxins. **Phytotherapy Res.**, London. v.8, p.391-398, 1994.

LIU, X. I.; DURHAM, G.; RICHARDS, R. M. E. Vancomycin resistance reversal in enterococci by flavonoids. **J. Pharm. Pharmacol***.,* London. v.53, p.129-32, 2001.

LOONEY, R. J. Will targeting B cells be the answer for Sjögren´s Syndrome? **Arthritis Rheum**., v.56, p.1371-1377, 2007.

LUSTER, M. I.; PORTIER, C.; PAIT, D. G.; WHITE K. L. Jr.; GENNINGS, C.; ROSENTHAL, G. J. Risk assessment in immunotoxicology. I. Sensitivity and predictability of immune tests. **Fundam. Appl. Toxicol**., Akron. v. 18, p. 200-10, 1992.

MACEDO, A. F.; BARBOSA, N. C.; ESQUIBEL, M. A.; SOUZA, M. N.; CECHINEL-FILHO, V. Pharmacological and phytochemical studies of callus culture extracts from *Alternanthera brasiliana.* **Pharmazie**, Berlin. v. 54, p. 776-777, 1999.

MARTINEZ-GAMBOA, L.; BREZINSCHEJ, H-P.; BURMERSTER, G. R.; DÖRNER, T. Immunopathologic role of B lymphocytes in rheumatoid arthritis: rationale of B-cell directed therapy. **Autoimmun. Rev**., v.5, p.437-442, 2006.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Receptores for immunoglobulin G. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 38, p.82-95, 2005.

MEDIRATTA, P. K.; SHARMA, K. K.; SINGH, S. Evaluation of Immunomodulatory potential of *Ocimum sanctum* seed oil and its possible mechanism of action. **J. Ethnopharmacol.**, Lausane. v. 80, p.15-20, 2002.

MEHROTRA, S.; MISHRA, K. P.; MAURYA, R.; SRIMAL, R. C.; YADAV, V. S.; PANDEY, R.; SINGH, V. K. Anticellular and immunosuppressive properties of ethanolic extract of *Acorus calamus* rhizome. **Int. Immunopharmacol.**, Amsterdam, v. 3, p. 53-61, 2003.

MEYER, A. V.; DIAS, D. A.; ALENCAR, R. E.; BARBUTO, J. A. M.; NOMIZO, A. Antineoplasic activity of aqueous extracts of *Peschiera fuchsiaefolia, Gomphrena globosa* and *Alternanthera tenella* Cola on human tumor cell lines *in vitro.* **Boll. Chim. Farm.***,* Milano v.136, p.82, 1997.

MORAES, V.J.G.; SANTOS, L.F.M.; CASTRO, S.B.; LOUREIRO, L.H.; LIMA, O.A.; SOUZA, M.L.M.; YIEN, L.M.K.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S. Inibition of lymphocyte activation by extracts and fractions of Kalanchoe, Alternanthera, Paullinia and Mikania species. **Phytomedicine.,** Stuttgart. vol.1, 199-204, 1994.

NETO, A. G., COSTA, J. M. L. C; BELATI, C. C. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **J. Ethnopharmacol**. Lausane, v. 96, p. 87-91, 2005.

NIIZAWA, A.; KOGURE, T.; HAI, L. X.; FUJINAGA, H.; TAKAHASHI, K.; SHIMADA, Y.; TERASAWA, K. Clinical and immunomodulatory effects of fun-boi, an herbal medicine, on collagen-induced arthritis *in vivo.* **Clin. Exp. Rheumatol.**, Pisa. v. 21(1), p. 57-62, 2003.

OMS – Organizacion Mundial de la Salud. Pautas para la evaluacion de medicamentos herbários. Ginebra, 1991.

PATTERSON, W. G.; XU, S.; SALT, T. A. Sterol of *Caryophyllales* with emphasis on *Amaranthaceae.* **Phytochemistry***,* Oxford. v.30, p.523-6, 1991.

PATWARDHAN, B.; MANISH, G. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. **Drug Discov. Today,** Irvington. v. 10, p. 495-502, 2005.

PLAEGER, S. F. Clinical immunology and traditional herbal medicines. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington. v. 10, p. 337-338, 2003.

POMILIO, A. B.; SOLÁ, G. A. R.; MAYER, A. M. S. Antitumor and cytotoxic screen of 5,6,7-trisubstituted flavones from *Gomphrena martiana.* **J. Ethnopharmacol***.,* Lausane. v.44, p. 25-33, 1994.

POTTER, M.; WAX, J.; JONES, G. M. Indomethacin is a potent inhibitor of pristane and plastic disc induced plasmacytomagenesis in a hypersusceptible BALB/c congenic strain. **Blood**, v.90, p.260-269, 1997.

PUTMAN, E.; VAN LOVEREN, H; BODE, G. et al. Assessment of the immunotoxic potential of human pharmaceuticals: a workshop report. **Drug Inf. J.** New York, v.36, p.417-427, 2002.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, New York. v. 39, p. 603-613, 2001.

REGO, T. J. A. Fitogeografia das Plantas Medicinais no Maranhão. Ed: EDUFMA, São Luís, MA, Brasil, 2ª ed. p. 108-109, 1995.

REZAEIPOOR, R.; SAEIDNIA, S.; KAMALINEJAD, M. Immunosupressive activity of *Achillea talagonica* on humoral immune responses in experimental animals. **J. Ethnopharmacol.**, Lausane. v. 65, p. 273-276, 1999.

ROSS, R. G.; SELVASUBRAMANIAN, S.; JAYASUNDAR, S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits – a preliminary study. **J. Ethnopharmacol.**, Lausane. v. 78, p.85-87, 2001.

SAI-RAM, M.; SHARMA, S.K.; ILAVAZHAGAN, G.; KUMAR, D.; SELVAMURTHY, W. Immunomodulatory effects of NIM-76, a volatile fraction from Neem oil. **J. Ethnopharmacol.,** Lausane. v.55, p.133-139, 1997.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nature Immunol**., v.6, p.345-352, 2005.

SALVADOR, M. J. **Estudo químico, biológico e biotecnológico de *Alternanthera marítima* e *Alternanthera tenella* (Gomphrena, Amaranthaceae).** 2005. 407p. Tese (Doutorado em química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SALVADOR, M. J. ;ITO, I. Y.; DIAS, D. A. Evaluation of the antibacterial activity of the crude extracts and sterols (β-sitosterol, campesterol and stigmasterol) from *Alternanthera maritima.* **Boll. Chim. Farm.***,* Milano. v.138, LXVI, 1999.

SALVADOR, M.J.; ITO, I. Y.; FERREIRA, E. O.; DIAS, D. A. Atividade biológica dos extratos brutos e do metilenodioxiflavonol de *Blutaparon portulacoides* (Gomphreneae, Amaranthaceae), "XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL", Recife, Pernambuco – Brasil, 17 a 20 de outubro, **Resumos**, XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, p.162, 2000.

SALVADOR, M. J.; PRAL, E. M. F.; FERREIRA, E. O.; ALFIERI, S. C.; DIAS, D. A. Effect of crude extracts and compounds isolated from *Blutaparon portulacoides* on viability of *Leishmania amazonensis* amastigotas. **Eur. J. Pharm. Sci***.,* Amsterdam. v.13 (suppl. 1), S96, 2001a.

SALVADOR, M. J.; ITO, I. Y.; DIAS, D. A. Phytochemical study of the hexanic phase from ethanolic extract (roots) of *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). **Eur. J. Pharm . Sci.,** Amsterdam. v.13 (suppl.1), S95, 2001b.

SALVADOR, M. J.; FERREIRA, E. O.; MERTENS-TALCOTT, S. U. et al. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. Z. Naturforsch. v.61c, p.19-25, 2006.

SALVADOR, M. J.; FERREIRA, E.Q.; PRAL, E.M.F.; ALFIERI. S.C.; ALBUQUERQUE, S.; ITO, I.Y.; DIAS, D.A. Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae). **Phytomedicine**, Stuttgart. v. 6, p.566-571, 2002.

SALVADOR, M. J.; DIAS, D. A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera marítima* (Mart) St. Hil. (Amaranthaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 32; p. 107-110, 2004.

SILVEIRA, L. M. S. Caracterização fitoquímica, biológica e mineral de partes aéreas de *Alternanthera tenella Colla (Amaranthaceae)*. 2000. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil, 2000.

SI-MAN, Z. *et al.* Inhibitor against three human immunodeficiency virus in aqueous extract of *Alternanthera philoxeroides.* **London Clin. Med. J***.,* London.v.101, p.861-6, 1988.

SINGER, G. G.; CARRERA, A. C.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A.; ABBAS, A. K. Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL-*lpr/lpr* model. **Curr. Opin. Immunol.**, v.6, p.913-920, 1994.

SIQUEIRA, J. C. A família *Amaranthaceae* nas restingas do Brasil. **Acta Biológica Leopoldensia***,* Rio de Janeiro. v.9, p.99-110, 1987a.

SIQUEIRA, J. C. Importância alimentícia e medicinal das *Amaranthaceaes* do Brasil. **Acta Biológica Leopoldensia***,* Rio de Janeiro. v.9, p. 5-22, 1987b.

SIQUEIRA, J. C. Phytogeography of brasilian *Amaranthaceae.* **Pesquisa Botânica***,* **0**(45), p. 5-21, 1994/1995.

SIQUEIRA, J. C.; GUIMARÃES, E. F. Amaranthaceae no Rio de Janeiro – gênero *Alternanthera* forsskal. **Rodriguésia***,* Rio de Janeiro. v. 36, p. 21-40, 1984.

SMIT, H. F.; KROES, B. H.; VAN DEN BERG, A. J. J.; VAN DER WAL, D.; VAN DER WORM, E.; BEUKELMAN, C. J.; VAN DIJK, H.; LABADIE, R. P. Immunomodulatory and anti-inflammatory activity of *Picrorhiza scrophulariiflora*. **J. Ethnopharmacol.**, Lausane. v. 73, p.101-109, 2000.

SOEKEN, K. L.; MILLER, S. A.; ERNST, E. Herbal medicines for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review. **Rheumatology**, v. 42, p. 652-659, 2003.

SOLDATI, F. The registration of medical plant products, what quality of documentation should e required? The industrial point of view. In: World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare, **Abstracts,** Mendoza: ICMPA/ISHS/SAIPOA, P. L-48, 1997.

SOUZA, M. M., KERN, P., FLORIANI, A.E.O., CECHINEL-FILHO, V. Analgesic properties of a hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. **Phytoter. Res**., v. 12, p. 279-281.

STIFELL, C.; IBAÑEZ, O. M.; RIBEIRO, O. G.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of acute inflammation: inflammatory reaction in inbred lines of mice and their interline crosses. **Exp. Clin. Immunogenet.**, Basel. v. 7, p. 221-233, 1990.

SUNDY, J. S.; HAYNES, B. F. Rheumatoid Arthritis. In: **The Autoimmune Diseases.** London: Academic Press, 1998. cap. 20, p. 342-380.

TEMPLE, L.; KAWABATA, T. T.; MUNSON, A. E.; WHITE Jr., K. L. Comparison of ELISA and Plaque-Forming Cells Assays for Measuring the Humoral Immune Response to SRBC in Rats and Mice Treated with Benzo[a]pyrene or Cyclophosphamide. **Fundam. Appl. Toxicol.**, Akron. v. 21(4), p. 412-419, 1993.

UECKER, M.; BIELLA, C. A.; CORRÊA, P. B. F.; SALVADOR, M. J.; DIAS, D. A.; CROTT, L. S. P. Avaliação do Potencial Imunomodulatório de Extratos Aquosos de *Alternanthera maritima.* XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, Bahia - Brasil, 28 - 31 de agosto de 2002. **Resumos XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE**, p. 162, 2002.

UECKER, M.; BIELLA, C. A.; SALVADOR, M. J.; OGASAWARA, T. M. C.; DIAS, D. A.; CROTT, L. S. P. Screening of *Alternanthera maritima* extracts for immunomodulatory activity - 4th Congress of Pharmaceutical Sciences – CIFARP, Ribeirão Preto – SP, Brasil, 29 de junho a 02 de julho de 2003. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,** São Paulo. v. 39, p.249, 2003.

UECKER, M. **Avaliação do Potencial imunomodulatório de extratos e flavonóides isolados de *Alternathera maritima (Amaranthaceae)***. 2003. 110p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

VIGAR, N. D.; CABRERA, W. H. K.; ARAÚJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; OGATA, T. R. P.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO M. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim. v.30, p. 431-437, 2000.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenan oedema in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore. v. 166, p. 96–103, 1969.

VULTO, A. G.; SMET, P. A. G. M. In: Dukes, M. M. G. (Ed.). **Meyler's Side Effects of Drugs**, 11th Ed. Amsterdan: Elsevier, 1988, pp. 999-1005.

WINTER, C. A., RISLEY, E. A., NUSS, G. W. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Malden. v. 111, p. 544-547, 1962.

WOOLEY, P. H.; SEIBOLD, J. R.; WHALEN, J. D.; CHAPDELAINE, J. M. Pristane-induced arthritis. The Immunologic and Genetic Features of an Experimental Murine Model of Autoimmune Disease. **Arthritis and Rheum.**, Atlanta. v. 32, p.1022-30, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. **Bulletin WHO/TRM/98.1**, Geneva, p.1-43, 1998.

YAMAGUCHI, H. Immunomodulation by medicinal plants. **Adv Exp. Med. Biol.**, New York. v. 319, p. 287-297, 1992.

ZUCCHI, O. L. A. D.; DIAS, D. A.; NASCIMENTO FILH, V. F.; SALVADOR, M. J. Characterization of two medicinal plants by X-ray spectrometry. **J. Trace Microprobe Tech***.,* Washington. v.18, p. 9-16, 2000.

ANEXO

Tris – NH_4Cl (*Cloreto de Amôneo tamponado com Tris*)

NH_4Cl 0,16 M ..... 8,3 g/L

Tris 0,17 M ..... 20,6 g

Dissolver o Tris base em 900 mL de água. Ajustar o pH para 7,65 com HCl. Completar para 1litro.

Solução de trabalho:

90 mL de NH_4Cl 0,16 M + 10 mL de Tris 0,17 M (pH 7,65)

Ajustar o pH para 7,2 com HCl

Solução Balanceada de Sais de Hanks (HBSS)

NaCl 8,0g

KCl 0,4g

$CaCl_2.2H_2O$ 0,185g

$MgCl_2.6H_2O$ 0,1g

$MgSO_4.7H_2O$ 0,1g

Na_2HPO_4 ..... 0,048g

KH_2PO_4 ..... 0,06g

Glicose 1,0g

$NaHCO_3$..... 0,350g

Água destilada ..... q.s.p. 1000Ml

Acertar pH a 7,2

PBS (Phosphate buffered saline)

NaCl 80,0g

KCl..... 2,0g

Na_2HPO_4..... 11,5g

KH_2HPO_4..... 2,0g

Água destilada..... q.s.p. 1000mL (10x conc.)

PBS Tween 20 – 0,05%

PBS (10x conc.) ..... 25 mL

Tween 20 ..... 125 μL

H_2O .....qsp..... 250 mL

Solução STOP

H_2SO_4 2M P.M. 98,08

d = 1,84 g/mL V = 50 mL

Figura 1 – Pata de camundongo AIRmax apresentando inflamação.

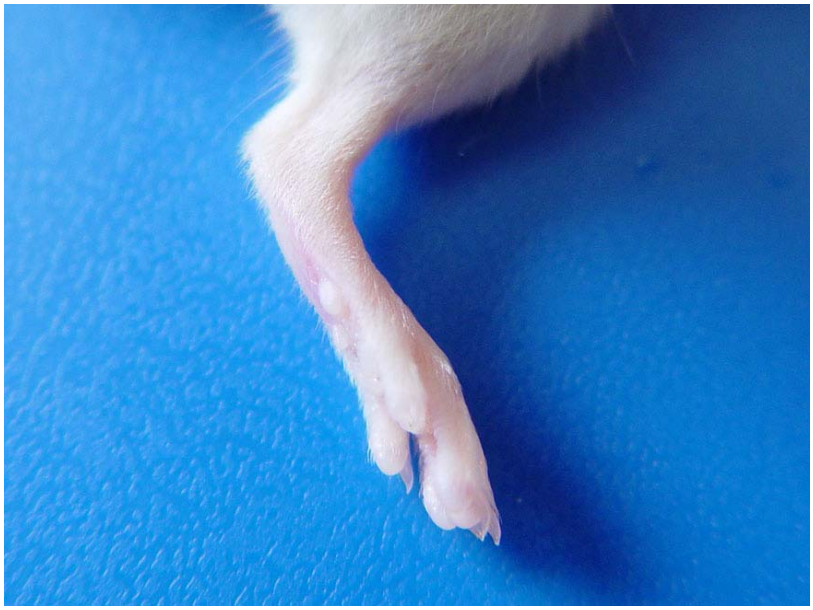

Figura 2 – Pata normal de camundongo AIRmax.