

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
RIBEIRÃO PRETO

Efeitos da grandisina sobre o sistema hematopoético,
em camundongos

RITA DE CÁSSIA FIGUEIREDO

Ribeirão Preto
2006

RITA DE CÁSSIA FIGUEIREDO

Efeitos da grandisina sobre o sistema hematopoético,
em camundongos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas a Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Souza

Ribeirão Preto
2006

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Figueiredo, Rita de Cássia

Efeitos da grandisina sobre o sistema hematopoético, em camundongos.

Ribeirão Preto, 2006.

101p. il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Souza, Ana Maria

1. *Virola surinamensis* 2. grandisina 3. leucócitos

Autor (a): Rita de Cássia Figueiredo

Título: **Efeitos da grandisina sobre o sistyema hematopoético, em camundongos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas a Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a) Ana Maria de Souza
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
Orientador(a)

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em ___/___/_____

Dedico esta dissertação

*Aos meus queridos pais, **Manoel** que me ensinou os valores da vida e **Tereza** que me ensinou a alegria de viver e me estimulou a estudar cada vez mais.*

*A minhas irmãs, **Maria José e Carina** que nesses anos longe de casa, pacientemente me estimularam e me transmitiram valores espirituais, possibilitando-me ultrapassar dificuldades e limitações.*

*A meus avôs, **Lázaro e Hercília**, pelo incentivo constante e pelas orações.*

*A minha finada bisavó (**Mariquinha**), de quem eu tanto tenho lembranças e que com certeza, em qualquer lugar que esteja, está torcendo por mim.*

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, por atender meus pedidos, me proteger em outra cidade e sempre guiar meus passos.

À Prof^a Dr^a **Ana Maria de Souza**, que desde o início depositou confiança em mim, me aceitando primeiramente como estagiária e em seguida, como pós- graduanda, dando-me a oportunidade da realização concreta deste trabalho. Ana, muito obrigada por tudo.

Aos meus **tios(as) e primos(as)** pela força e torcida.

À **Zita Maria de Oliveira Gregório**, pela colaboração na realização dos experimentos e pela amizade.

À **Solange Bocado** pela amizade e apoio.

Ao amigo **Felipe Saldanha de Araújo**, que desde o início do meu estágio neste laboratório, demonstrou grande amizade e consideração. Saudades do convívio.

Ao **Alexandre Freire Pinto**, pelo prazeroso convívio no início do meu mestrado.

Ao **Pablo Leonardo Viana de Souza**, pela ajuda e ensinamentos no início do meu trabalho.

À amiga **Flávia Aparecida Paina**, pela ajuda em meus experimentos, pelas conversas e pela amizade.

Às amigas **Elainy Patrícia Lino Gasparotto** e **Iêda Maria Martinez Paino**, pela amizade e companherismo.

À aluna de iniciação científica, **Lívia Andrade Cruz** pela amizade.

Ao amigo, **Rodrigo Proto de Siqueira**, pela amizade e incentivo constante.

À pós-graduanda **Carla Agostinho Biella** pelas conversas e torcida pelo meu sucesso.

Aos **amigos (as)** do laboratório de Farmacologia: Renes, Denis, Juliano, David, Dani Longhi, Daniel, Bruno, Dani Bona, Matheus, Alice, Juliana, Mayara, Miriam e Dna. Nina pelo convívio e amizade.

Ao Prof. Dr. **Sérgio de Albuquerque** e Prof. Dr. **José Clóvis do Prado Júnior** pela atenção e sugestões enriquecedoras.

Ao Prof. Dr. **Norberto Peporine Lopes**, pela colaboração cedendo a grandisina utilizada em meu estudo.

Aos Profs. **Adalberto de Oliveira Gonçalves** e **Amadeu Pasqualim Neto** do curso de Biomedicina do Centro Universitário Barão de Mauá, que sempre me incentivaram e torceram por mim.

Ao Sr. **Vicente** do Centro Universitário Barão de Mauá, que mesmo de longe sempre torceu pelas minhas conquistas.

Aos funcionários da FCFRP-USP, em especial: Srs. **Antônio, Henrique, Paulo, Zé, Alison, Claudinho, Nivaldo, Edson, Zulu, Cássio, Marlene, Vera, Dita**, que sempre me trataram com respeito.

Aos funcionários do Biotério da FCFRP-USP, **Aldo e Reinaldo** pela atenção.

À **todos** que de alguma maneira contribuíram, direta ou indiretamente, para que este trabalho fosse concluído.

Aos camundongos **BALB/c**, modelos experimentais que involuntariamente doaram suas vidas para a realização deste trabalho.

A **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto** – USP, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

A **CAPES**, pela concessão de bolsa de Mestrado.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar; que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver...”

(Martin Luther King)

RESUMO

FIGUEIREDO, R.C. **Efeitos da grandisina sobre o sistema hematopoético, em camundongos.** 2006. 101f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

A *Virola surinamensis*, também conhecida como ucuúba branca, é muito difundida na floresta amazônica e, popularmente, usada no tratamento de erisipelas, cólicas e dispepsias. Estudos experimentais demonstraram atividades anti-parasitárias de diferentes componentes da planta contra *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi*. Com a possibilidade de utilização farmacológica da planta evidencia-se a necessidade de avaliar os possíveis efeitos sobre o sistema hematopoético. O presente trabalho teve por objetivo verificar os efeitos da grandisina, uma lignana extraída da *Virola surinamensis*, sobre o sistema hematopoético, em camundongos. Para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros: números globais de eritrócitos, leucócitos e plaquetas no sangue periférico, celularidade na medula óssea e baço (utilizando câmara de Neubauer); contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico e medula óssea (em extensões coradas com May-Grünwald/ Giemsa); caracterização da população de linfócitos da medula óssea e baço (por imunocitoquímica). A grandisina, em dose única de 100µg/g de peso corpóreo induziu, no sangue periférico, diminuição significativa do número de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos, após 7 e 14 dias, e redução significativa do número de monócitos, após 14 dias do tratamento. Houve uma tendência de aumento do número de células nucleadas da medula óssea após 7 dias da administração da substância, com aumento significativo após 14 dias do tratamento, mas não ocorreu nenhuma alteração na celularidade do baço. Foi observado aumento das células da linhagem linfocítica e

monocítica em evolução, na medula óssea, após 7 e 14 dias do tratamento, enquanto no sangue periférico, o número de linfócitos e monócitos continuaram reduzidos. A grandisina, na dose de 100µg/g de peso corpóreo, por cinco dias, provocou uma redução no número de leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos no sangue periférico após 7 dias do tratamento. Houve uma tendência de redução do número de leucócitos, linfócitos e monócitos, com redução significativa do número de neutrófilos, após 14 dias da administração da substância. O número de células da medula óssea reduziu, após 7 e 14 dias do tratamento. Quanto a celularidade do baço, não foi observado qualquer alteração. Ocorreu ainda uma redução no número de células mononucleares e polimorfonucleares em evolução na medula óssea, após 7 e 14 dias do tratamento. No experimento de dose única, a imunohistoquímica dos sedimentos medulares mostrou uma tendência de diminuição do número de Linfócitos T totais, Linfócitos T imaturos e Linfócitos B, após 14 dias do tratamento. No experimento de dose seriada houve redução destas populações de linfócitos, após 7 e 14 dias do tratamento, somente na medula óssea. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a dose de 100µg/g de peso corpóreo, tanto em dose única como seriada, causa importantes alterações nas células sanguíneas indicando que, para o uso terapêutico, doses inferiores a estas devem ser avaliadas.

Palavras chave: *Virola surinamensis*, grandisina, leucócitos.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, R.C. **Effects of grandisin on hematopoietic system, in mice** 2006. 102f.

Master Degree Dissertation – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Virola surinamensis, also known as ucuuba branca, is widespread in the Amazon forest and, popularly, used in the treatment of erysipelas, colic and dyspepsia. Experimental studies have shown antiparasitic activities of different components of the plant against *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*. The potential pharmacological use of the plant points towards the need to evaluate the possible effects on the hematopoietic system. The present work aims to verify the effects of grandisin, a lignan extracted from *Virola surinamensis*, on the hematopoietic system of mice. The following parameters were evaluated: the number of erythrocytes, leukocytes and platelets on peripheral blood, cell counts on bone marrow and spleen (with Neubauer chamber); differential leukocyte count on peripheral blood and bone marrow (on smears stained with May-Grünwald/Giemsa); the characterization of lymphocytes on bone marrow and spleen (by immunocytochemistry). The grandisin in a single dose of 100µg/g of body weight induced, on peripheral blood, significant decrease in the total count of leukocytes, lymphocytes and neutrophils, after 7 and 14 days and a significant decrease in the number of monocytes, after 14 days of treatment. A tendency in the increase of nucleated bone marrow cells occurred after 7 days of administration of the substance, with a significant increase after 14 days of treatment, but no alteration in the spleen cells occurred. An increase in the cells of lymphocytic and monocytic lineages was observed in evolution, in bone marrow after 7 and 14 days of treatment whereas in peripheral blood the number of lymphocytes and monocytes maintained low. Grandisin, administered during five consecutive days with a daily dose of 100µg/g of body weight, caused a decrease in the number of leukocytes, lymphocytes, monocytes and neutrophils in peripheral blood after 7

days of treatment. A tendency of decrease in the number of leukocytes, lymphocytes and monocytes occurred with a significant decrease in the number of neutrophils, after 14 days of administration of the substance. The number of bone marrow cells decreased after 7 and 14 days of treatment. For the spleen cells no alterations were observed. A decrease in the number of mononuclear and polimorfonuclear cells in evolution on bone marrow after 7 and 14 days of treatment was observed. In a single dose experiment, the immunocytochemistry of medullar sediments showed a tendency of decrease in the total number of T lymphocytes, T immature lymphocytes and B lymphocytes after 14 days of treatment. The serial dose caused a decrease in the population of lymphocytes after 7 and 14 days of treatment in bone marrow. The results obtained in this study demonstrated that the dose of 100µg/g of body weight, either in single or in serial doses, cause important alterations on blood cells indicating that for therapeutic use inferior doses must be evaluated.

Keywords: *Virola surinamensis*, grandisin, leukocytes

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGM – Aorta-gonada-mesonefron

CD – *cluster* de diferenciação

CFU-S – Unidade formadora de colônia esplênica

CTH – Célula tronco hematopoética

CTLs – Linfócitos T citotóxicos ou citolíticos

DAB – Diaminobenzidina

DMSO – Dimetilsulfóxido

G-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos

IFN – Interferon

IFN- γ - Interferon gama

Ig – Imunoglobulina

ILs – Interleucinas

LT – Linfotoxinas

M-CSF – Fator estimulador de colônias de monócitos

NK – *Natural killer*

SCF – *stem cell factor*

SMF – Sistema mononuclear fagocitário

TNF – Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 Hematopoese x Avaliação hematológica de camundongos	13
1.2 Doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
1.2.1 Imunologia da Doença de Chagas	17
1.3 <i>Virola surinamensis</i>	19
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Animais	25
3.2 Substância	25
3.3 Grupos experimentais	26
3.4 Medula óssea	27
3.4.1 Coleta do material	27
3.4.1.1 Celularidade medular e contagem diferencial dos leucócitos	27
3.5 Classificação das células hematopoéticas	28
3.6 Sangue periférico	29
3.7 Baço	29
3.8 Caracterização da população de linfócitos, por imunocitoquímica	30
3.9 Análise estatística	31

4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO 1	75
APÊNDICES	77

1.INTRODUÇÃO E REVISÃO

DA LITERATURA

INTRODUÇÃO

O sistema hematopoético é um conjunto complexo de células responsáveis pelo transporte de oxigênio, defesa contra infecções microbianas, controle da hemostasia, supervisão contra transformações neoplásicas e produção de um grande número de citocinas e fatores de crescimento que agem no próprio sistema hematopoético e em outros sistemas. Aproximadamente $4 \cdot 10^{11}$ células são produzidas na medula óssea, por dia, em adultos humanos (VEIBY; MIKHAIL; SNODGRASS, 1997).

Células hematopoéticas são formadas primeiro no saco vitelínico e populam o fígado em desenvolvimento. Esta é uma população transitória que é substituída por um segundo conjunto de células hematopoéticas originadas na região AGM (aorta-gonada-mesonefron) do embrião. Estas são as células definitivas que sustentam a hematopoese na medula óssea, fígado e baço. Ambos os eventos têm duração finita, significando que, para o resto da vida, a hematopoese deve ser mantida pela capacidade da célula tronco de auto renovar-se e gerar progênes (MARSHALL ; THRASHER, 2001).

A existência de células tronco pluripotentes que são capazes de iniciar a produção de células em todas as linhagens hematopoéticas foi primeiro proposto por Maximow e este conceito ganhou aceitação na primeira metade do século XX. Entretanto, somente em 1961, Till e McCulloch documentaram a existência desta célula tronco hematopoética. Estas células foram chamadas de unidades formadoras de colônias esplênicas (CFU-S) e reconhecidas como célula tronco hematopoética (CTH). Entretanto, estudos posteriores revelaram que as CFU-S não são células tronco hematopoéticas verdadeiras, mas sim uma população pluripotente mais madura com uma limitada capacidade para gerar células hematopoéticas (METCALF, 2001)

A habilidade do sistema hematopoético em manter a produção de células sanguíneas durante a vida depende da capacidade da célula tronco hematopoética de auto renovar-se e também produzir células filhas, que diferenciam e suprem todas as linhagens de células sanguíneas maduras. Isto significa que células tronco dividem-se para produzir duas células filhas idênticas (divisão simétrica) ou assimetricamente produzindo duas células filhas que adotam diferentes destinos ou duas progênes diferentes. A regulação do balanço entre as duas divisões é crítico para manter o número apropriado de CTH e a demanda de células diferenciadas (ABBOUD; LICHTMAN, 2006).

O equilíbrio entre auto-renovação e diferenciação pode ser alcançado por um dos três modelos: 1) o resultado da divisão celular pode ser determinado antes da mitose, como consequência de distribuição desigual de fatores de transcrição nas células mãe; assim, uma célula tronco divide-se para formar uma nova célula tronco e uma célula diferenciada; este modelo não permite regeneração ou expansão de células tronco; 2) células filhas são semelhantes a célula mãe mas são expostas diferentemente a sinais de diferenciação extracelulares, como as citocinas; a desvantagem deste modelo é que, apesar de resultar no aumento do número de células tronco, este provavelmente é menor ou temporário; 3) células tronco dividem simetricamente, algumas dando duas novas células tronco, outras duas células diferenciadas; este modelo é o mais provável (MARLEY; LEWWIS; GORDON, 2003).

O sistema hematopoético pode ser dividido em compartimentos funcionais: a) compartimento de células tronco, composto de raras células pluripotentes com alta capacidade de auto-renovação e com capacidade de formar células sanguíneas e uma baixa incidência de células mitoticamente ativas; o estado G_0 confere às células tempo para

reparar danos as DNA, permitindo assim manter a integridade genética da população de células tronco; b) compartimento de progenitores, composto na maioria por progenitores unipotentes, alguns bipotentes e raros multipotentes; estes progenitores demonstram pouca, se alguma, capacidade de auto-renovação e são mais numerosos e mitoticamente mais ativos do que a célula tronco; c) compartimento de precursores onde estão presentes os precursores diferenciados sem capacidade de auto-renovação, unipotentes e a maioria em ciclo celular ativo (OGAWA, 1993).

A hematopoese é um processo dinâmico com significativa complexidade no qual um conjunto de células tronco hematopoéticas dá origem a células das linhagens mielóide e linfóide (MORRISON; UCHIDA; WEISSMAN, 1995), na presença de várias citocinas (AKASHI et al., 2000). A diferenciação das células tronco hematopoéticas por um dos dois caminhos, linfóide e mielóide, origina células T, B e NK ou monócitos, granulócitos, eritrócitos e plaquetas, respectivamente (AKASHI, 2005; ABKOWITZ et al., 2000).

No processo de produção de células sanguíneas a medula óssea fornece o microambiente necessário para a proliferação e diferenciação celular, de onde migram para o espaço sinusóide e daí para a circulação (HEISSIG et al., 2005). O microambiente da medula óssea é um complexo onde as células hematopoéticas diferenciam-se, sendo formado por células endoteliais dos vasos sanguíneos, células reticulares, adipócitos, células estromais fibroblásticas, osteoblastos e macrófagos e pela matriz extracelular que contém proteoglicanas, fibronectina, tenascina, colágeno, laminina, hemonectina, trombospondina. Neste microambiente ocorrem interações célula - célula, célula - matriz extracelular e a secreção de citocinas e fatores de crescimento que regulam a hemopoese (ABBOUD; LICHTMAN, 2006).

As células tronco estão localizadas em um microambiente conhecido como “nichos” de células tronco, onde elas são mantidas em um estado quiescente e não diferenciado (HEISSIG, 2002). Estes nichos são decisivos para regular a auto-renovação e a decisão do destino da célula (HEISSIG, 2002; ARAI; HIRAO; SUDA, 2005). Os mecanismos moleculares que regulam a quiescência das células tronco não estão completamente definidos embora seja conhecido que fatores extrínsecos fornecidos por células e por componentes da matriz extracelular do microambiente são essenciais nesta regulação (HAYLOCK; NILSSON, 2005). A auto-renovação das células tronco requer uma combinação de eventos: manutenção do seu potencial proliferativo, inibição da apoptose e bloqueio da diferenciação (ZHANG; LI, 2005). O estado quiescente é considerado uma peculiaridade indispensável para a manutenção das células tronco hematopoéticas e interações das células tronco hematopoéticas com o microambiente são essenciais para a hematopoese adulta na medula óssea (ARAI et al., 2004).

Embora a maior parte das células tronco resida na medula óssea, um pequeno número destas células, ou de células funcionalmente semelhantes a elas, pode ser encontrado em circulação no sangue. O número de células tronco e células progenitoras circulantes podem aumentar pelo estresse fisiológico, tais como, exercício, stress e infecções. O processo de passagem das células tronco da medula óssea para o sangue periférico é referido como mobilização ou saída (VELDERS; FIBBE, 2005). Sob condições normais, a grande maioria das células tronco hematopoéticas não se divide (LERNER; HARRISON, 1990) mas, sob condições de estresse ou durante a repopulação, elas podem se expandir e auto renovar (KELLER; SNODGRASS, 1990).

A perda do balanço entre auto-renovação e diferenciação da célula tronco leva ao crescimento descontrolado da célula ou a pré - maturação e resulta em tumores, câncer ou

defeitos nos tecidos. Por esta razão, o conhecimento da complexa regulação do desenvolvimento da célula tronco é essencial para futuras aplicações terapêuticas (ZHANG; LI, 2005).

A proliferação, diferenciação e sobrevivência de células progenitoras hematopoéticas são sustentadas por uma família de glicoproteínas, os fatores de crescimento hematopoético. Além dos efeitos sobre as células imaturas, estes fatores também influenciam a sobrevivência e as funções de células maduras. Embora esteja bem estabelecido que as citocinas tenham uma importante função na regulação de linhagens hematopoéticas distintas, esta função não está completamente definida (RICHARDS et al., 2003).

A descoberta e o desenvolvimento de reguladores da hematopoese começaram com a eritropoetina (MIYAKE; KUNG; GOLDWASSER, 1977) e quatro fatores estimuladores de colônias (METCALF, 1993), sendo seguidos pela identificação de mais que vinte reguladores. Estes avanços têm permitido que células sanguíneas maduras sejam geradas “in vitro”, sob condições controladas e tem aumentado a expectativa de uma produção em massa de célula tronco hematopoética “in vitro” para o transplante em pacientes, o que teria uma óbvia importância clínica (METCALF, 2001).

Os leucócitos e outros tipos celulares secretam as citocinas que são glicoproteínas regulatórias do sistema imune e da resposta inflamatória. Elas interferem na hematopoese tanto por efeitos estimulatórios como inibitórios. São agrupadas de acordo com sua função e entre elas estão as interleucinas (ILs), fatores de crescimento hematopoético, interferons (IFNs) e fatores de necrose tumoral (TNFs) (OPPENHEIM; RUSCETTI; FALTYNEK, 1991; SOCOLOVSKY et al., 1998).

Várias interleucinas (ILs) mostram efeito direto na proliferação de célula tronco hematopoética ou um efeito indireto por produzir outras citocinas a partir de células

acessórias. Com exceção da IL-3 e IL-5, nenhuma interleucina induz sozinha a proliferação da célula progenitora, mas em conjunto com outros fatores, tais como, os fatores estimuladores de colônias (CSFs) e fator de célula tronco (SCF) e muitas interleucinas podem significativamente aumentar a resposta proliferativa de células progenitoras primitivas (VEIBY; MIKHAIL; SNODGRASS, 1997).

A IL-3 é conhecida como fator multilinhagem, pois age sobre inúmeras células alvo. Sobre células tronco pluripotentes primitivas estimula a geração e proliferação de macrófagos, neutrófilos, mastócitos, basófilos, megacariócitos, eritrócitos. A atuação da IL-3 em sinergismo com o M-CSF e IL-1 aumenta a eficiência na produção de macrófagos, enquanto que com o G-CSF, aumenta a eficiência na produção de neutrófilos (ALEXANDER, 1998). O G-CSF é o principal fator de crescimento que regula a granulopoese (RICHARDS et al., 2003), sua maior fonte fisiológica são os linfócitos T ativados (ALEXANDER, 1998).

O *stem-cell factor* (SCF), descoberto recentemente, é essencial para o crescimento de mastócitos, desenvolvimento de melanócitos, gametogênese e hematopoese (GALLI; ZSEBO; GEISLER, 1994; BROUDY, 1997).

O SCF é produzido principalmente por células estromais da medula óssea e sua atuação com outras citocinas hematopóéticas dá origem a células maduras, a partir de seus precursores. Em conjunto com a eritropoetina estimula “in vitro” a proliferação de células eritróides, com a IL-7 induz o desenvolvimento em células pré - B e com o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) tem-se a proliferação de granulócitos (SCHWARZMEIER, 1996).

O GM-CSF está envolvido na regulação da sobrevivência, diferenciação, proliferação e função dos granulócitos e macrófagos, sendo capaz de induzir a geração de neutrófilos,

eosinófilos, macrófagos, megacariócitos, precursores eritróides e células dendríticas a partir de progenitores hematopoéticos. Para a diferenciação completa em células maduras requer outros fatores adicionais como: eritropoetina para os eritrócitos, G-CSF para neutrófilos, IL-5 para eosinófilos ou trombopoetina para megacariócitos (ALEXANDER, 1998).

O M-CSF estimula a formação de colônias de macrófagos, regulando “in vivo” a produção de fagócitos mononucleares. É produzido por vários tipos celulares incluindo as células endoteliais, fibroblastos, osteoclastos, células estromais da medula óssea, linfócitos T e B ativados e outros (SUZUKI et al., 2004).

A produção do G-CSF é feita pelas células endoteliais, macrófagos ativados e fibroblastos. Este fator aumenta a produção de neutrófilos “in vivo” e “in vitro” e controla a resposta neutrofílica ao estímulo inflamatório (DEMETRI; GRIFFIN, 1991).

A vida média da maioria das células é extremamente curta, de horas a dias. As células maduras do sangue são constantemente destruídas e repostas o que requer uma rápida geração de milhões de novas células sanguíneas (FORSBERG et al., 2005). Estima-se que 10^{10} eritrócitos e 10^8 a 10^9 leucócitos são produzidos por hora para atender as necessidades fisiológicas (OGAWA, 1993).

A produção de células eritróides ocorre como resultado da hipóxia tecidual como, por exemplo, em altas altitudes, anemias, perdas sangüíneas enquanto o aumento na produção e maturação dos leucócitos ocorre em infecções (SOCOLOVSKY et al., 1998).

A proporção de eritrócitos produzidos e destruídos diariamente corresponde à 0,83% do total (cerca de 200 bilhões de células). Numerosos fatores contribuem para o controle da produção de eritrócitos dos quais os mais importantes são os fatores de

crescimento, eritropoetina e interleucina 3 (IL - 3) e os hormônios tireoidianos e andrógenos (FALCÃO; CALADO, 2001).

A função primordial dos glóbulos vermelhos é transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos, mantendo a perfusão tissular adequada. Eles também promovem a eliminação de dióxido de carbono dos tecidos (FALCÃO; CALADO, 2001).

Após cerca de 120 dias em circulação, em virtude de seu esgotamento metabólico e alterações degenerativas, os eritrócitos são removidos e destruídos por células do sistema mononuclear fagocitário, especialmente no baço, fígado e medula óssea (DEISS, 1998).

Os leucócitos desempenham papel de defesa do organismo e, cada subtipo detém funções bastante específicas e distintas entre si, que em conjunto, estruturam o sistema imunológico. São agrupados em duas categorias: os leucócitos mononucleares e os polimorfonucleares. Os primeiros incluem os linfócitos, plasmócitos e monócitos, e os últimos, também chamados de granulócitos pela presença de granulação citoplasmática, incluem os neutrófilos, eosinófilos e basófilos (FALCÃO; CALADO, 2001).

Os neutrófilos são granulócitos que participam da fagocitose, morte de bactérias e certos fungos além de participarem da reação inflamatória aguda (VELDERS; FIBBE, 2005).

Os neutrófilos são produzidos e armazenados na medula óssea, sendo liberados para o sangue periférico onde sua vida média é bastante curta, cerca de 8 horas. A massa de neutrófilos maduros ou quase maduros disponíveis como reserva na medula óssea para a liberação é cerca de 10 a 15 vezes maior do que a massa de neutrófilos que se encontram no compartimento intravascular em um determinado momento. Estas células podem ser mobilizadas rapidamente, em resposta a agressões variadas, como a presença de uma lesão tissular ou invasão de bactérias (LOWELL, 2000).

Os neutrófilos do sangue podem ser separados em dois grupos: os neutrófilos circulantes e os neutrófilos marginados. Os dois grupos estão em constante equilíbrio e parecem conter aproximadamente o mesmo número de células. Fatores como exercício físico ou liberação de adrenalina fazem com que os neutrófilos marginados circulem, aumentando a contagem de neutrófilos sem que haja uma liberação significativa de células da medula óssea (ZAGO, 2001).

O eosinófilo tem função importante na mediação de processos inflamatórios associados à alergia, defesa contra parasitas metazoários helmínticos, em certos distúrbios cutâneos alérgicos e neoplásicos. São células tóxicas capazes de matar helmintos, protozoários e células tumorais “in vitro” (SANDERSON, 1992).

Os eosinófilos circulantes normalmente compõem cerca de 1-3% das células brancas do sangue periférico. A meia vida do eosinófilo na circulação é de cerca de 6 a 12 horas, mas estimulados pela IL – 5 e outras citocinas sobrevivem por duas semanas (LOWELL, 2000).

Os basófilos são células efectoras das reações de hipersensibilidade imediata, asma, urticária, rinite alérgica e anafilaxia dependente de IgE (GALLI, 1993), apresentam uma vida média de dias (GAY ; PARKER, 2003).

As plaquetas são células formadas na medula óssea a partir da fragmentação do citoplasma do seu precursor, o megacariócito, e são responsáveis por elaborados processos químicos envolvidos na hemostasia e trombose. As plaquetas vivem em média cerca de 10 dias na circulação sanguínea. A maioria é removida após este período e uma boa parte delas é consumida no processo de hemostasia (BAIN, 1998).

Os monócitos - macrófagos constituem a primeira linha de defesa do organismo contra parasitas intracelulares, capazes de destruir várias espécies de bactérias e fungos. Os

monócitos não são muito abundantes no sangue periférico, correspondem à cerca de 1-6% de todas as células nucleadas do sangue (LOWELL, 2000).

Após entrarem em circulação, os monócitos têm vida média curta, de 4 a 8 horas, logo migrando para diferentes tecidos, onde recebem o nome de macrófagos tissulares de morfologia e fisiologia semelhantes às dos monócitos. Nos diferentes tecidos, participam da fagocitose de células senescentes ou mortas e de corpos estranhos, regulação da função de outras células, processamento e apresentação de antígenos, reações inflamatórias e destruição de micróbios e células tumorais (SUZUKI et al., 2004).

Existem dois tipos principais de linfócitos: os linfócitos B, que, quando ativados, diferenciam-se em células plasmáticas secretoras de anticorpos, e linfócitos T, que consistem em populações funcionalmente distintas sendo que as melhores caracterizadas são as células T auxiliares (*helper*) e os linfócitos T citolíticos ou citotóxicos (CTLs). Em resposta a estimulação antigênica, as células T auxiliares secretam citocinas envolvidas na proliferação e diferenciação das células T e B, macrófagos e outros leucócitos. Os CTLs destroem células infectadas por vírus e outros microrganismos intracelulares. Uma terceira classe de linfócitos, as células matadoras naturais ou *natural killer* (NK), que derivam da mesma célula progenitora, circulam no sangue como grandes linfócitos com diferentes grânulos tóxicos. São capazes de reconhecer e matar células anormais, tais como algumas células tumorais e células infectadas por vírus (JANEWAY et al., 2002; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A diversidade funcional das células T foi demonstrada por análises de clones de células T *helper* para os padrões de secreção de citocinas. Em camundongos e humanos foram identificados dois grupos de clones T CD4. O grupo T_{H1}, que secreta IFN- γ ,

linfotóxicas (LT), fator de necrose tumoral (TNF) e IL-2, e o grupo T_{H2} , que produz IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. As células T_{H1} determinam funções associadas à citotoxicidade e às reações inflamatórias. As células T_{H2} são mais eficazes na estimulação da proliferação e da produção de anticorpos pelas células B, além de serem importantes pela defesa contra infecções por helmintos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

As classes de linfócitos funcionalmente distintas expressam tipos diferentes de proteínas em sua superfície, sendo chamadas de antígenos, pois podem levar a produção de anticorpos contra si. Esses antígenos expressos na membrana celular podem ser identificados através de algumas técnicas como, por exemplo, a imunohistoquímica. O linfócito B expressa em sua superfície, o CD19, CD20 e CD22, sendo estes os principais marcadores utilizados na identificação de células B humanas e de camundongos. Os linfócitos maduros encontrados no sangue periférico e em órgão linfóides secundários expressam em sua superfície o CD2 e CD3. As subpopulações de células T podem ser distinguidas pela presença de diferentes marcadores, de tal modo que as células *T helper*, apresentam o marcador CD3 e CD4 e, as células T citotóxicas, apresentam o marcador CD3 e CD8; as células NK apresentam como marcador o CD16 e CD56, sendo possível que ambos também sejam encontrados em uma minoria de linfócitos T (LAI; ALAVERDI; MALTAIS et al., 1998; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os linfócitos T correspondem à cerca de 80% dos linfócitos circulantes, enquanto os linfócitos B correspondem a 10% e as células NK a 10% dos linfócitos circulantes (HANNET et al., 1992).

1.1 Hematopoese x Avaliação hematológica de camundongos

Um dos procedimentos mais importantes para a avaliação hematológica é o exame cuidadoso dos elementos figurados do sangue, no qual se incluem a quantificação de cada elemento, cálculo dos índices hematimétricos e a observação microscópica meticulosa da morfologia celular. A maioria das disfunções hematológicas pode ser definida pelas anormalidades encontradas nestes procedimentos.

Há diferenças bem evidente ao analisar o sangue periférico de camundongo em relação ao do ser humano. Estudos experimentais de anemia por falência renal crônica, realizados por Zhang et al., (1996) mostraram que fêmeas C57BL/6J adultas normais de camundongos possuíam eritrócitos de menor volume, além de uma porcentagem mais alta de linfócitos em relação ao número total de leucócitos e uma contagem mais alta de plaquetas quando comparados com os valores de referência para mulheres saudáveis.

Em camundongos, a formação de ilhas de células sangüíneas no saco vitelínico, ocorre por volta do 7° - 8° dia de gestação. Os eritrócitos primitivos entram na circulação no 9° dia de gestação, sendo produzidos no saco vitelínico até o 12° dia. A maioria das células que se diferenciam no saco vitelínico são eritrócitos, mas progenitores de outras linhagens hematopoéticas também estão presentes (HUANG; AWERBACH, 1993).

O sangue do camundongo adulto contém cerca de 10^{10} eritrócitos por mL e 4 - 10. 10^6 leucócitos por mL. Os linfócitos correspondem cerca de 80 a 90% dos leucócitos, sendo que os neutrófilos compreendem de 5 a 20% dos leucócitos do sangue, observando-se uma inversão em relação ao ser humano. Os eosinófilos correspondem à cerca de 1 - 2% dos leucócitos, enquanto os monócitos à cerca de 1 - 5%, sendo rara a presença de basófilos. Com relação às plaquetas, existem cerca de 10^9 plaquetas por mL de sangue (FREDRICKSON; HARRIS, 2000).

Nos camundongos adultos, o baço divide com a medula óssea a função de suprir o sangue com os elementos figurados, sendo identificados precursores granulocíticos, eritrocíticos e megacariocíticos nas secções histológicas deste órgão (FREDRICKSON; HARRIS, 2000). Devido a esta função importante torna-se sempre necessário uma análise da celularidade esplênica dos camundongos.

A hematologia do camundongo é afetada pela linhagem, ambiente, *status* de saúde e estresse do animal. Linhagens particulares de camundongos podem apresentar valores hematológicos normais diferentes de outra linhagem sem comprometimento da saúde do animal.

Tem sido muito útil utilizar modelos animais para responder questões de diferenciação e especialização celular, onde os resultados obtidos têm contribuído para o entendimento da hematopoese em vertebrados sendo diretamente relevante para a patogênese e tratamento de doenças hematológicas ou não hematológicas (EVANS, 1997)

1.2. Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

A Doença de Chagas é uma importante doença tropical causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (NIHEI et al., 2004), endêmica em 21 países, com 16 a 18 milhões de pessoas infectadas na América Latina e com aproximadamente 100 milhões de pessoas vivendo em risco de adquirir a doença (COURA, 2003; FILHO et al., 1997). Deste modo, a doença tem causado aproximadamente 3 milhões de incapacitados para o trabalho a cada ano, representando um sério problema econômico e de saúde pública nestes países (NIHEI et al., 2004).

Descoberta por Carlos Chagas em 1909, a tripanossomíase americana é causada pelo hemoflagelado digenético *Trypanosoma cruzi*. A maior parte dos casos de infecção é

produzida pelo contato da pele ou mucosas com fezes ou urina de insetos hematófagos da família Reduviidae contaminados com *T. cruzi*. Os principais mecanismos de infecção são: transmissão vetorial, congênita, amamentação e via transfusional (BRENER et al., 2000), sendo o último um dos mecanismos mais importantes de transmissão da doença (COURA; CASTRO, 2002). Existem também formas de transmissões excepcionais como: transmissão acidental em laboratório, por transplante de órgãos, via oral e sexual (BRENER et al., 2000).

Durante o ciclo de vida, *Trypanosoma cruzi* diferencia-se em três estágios, epimastigota no intestino do inseto, tripomastigota, a forma contagiosa na corrente sanguínea, e amastigota como forma intracelular (ABE et al., 2002)

O triatomíneo (barbeiro) infectado ao fazer o repasto sanguíneo em um indivíduo, elimina fezes contendo formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Estas penetram na pele ou mucosa íntegra durante o ato de coçar, invadem as células, principalmente do sistema mononuclear fagocitário (SMF), transformam-se em amastigotas que se multiplicam por divisão binária e retornam a forma tripomastigota antes mesmo da ruptura celular. Após a ruptura da célula, formas tripomastigotas são liberadas no sangue podendo invadir novas células ou serem ingeridas pelo triatomíneo. As células parasitadas, ao serem destruídas, liberam os parasitos, surgindo no local a primeira reação inflamatória do organismo, com infiltração de células polimorfonucleares, linfócitos e monócitos e, em seguida, de histiócitos que predominam na parte central do processo infeccioso. No triatomíneo, as formas tripomastigotas se transformam em epimastigotas (intestino) e se multiplicam por divisão binária. No reto do inseto, as formas epimastigotas se transformam em tripomastigotas, sendo esta a forma infectante para os vertebrados (LANA; TAFURI, 2005; NEVES, 2006).

No homem, a doença de Chagas possui várias apresentações clínicas. Após a infecção parasitária, há uma fase aguda curta (3 a 4 meses) caracterizada por uma abundante parasitemia, muitas vezes assintomática para adultos. As pessoas podem apresentar alguns sintomas inespecíficos, que dificultam o reconhecimento do contágio. Sinais clínicos como reação inflamatória local na porta de entrada do parasita (chagoma de inoculação, sinal de Romana), febre, esplenomegalia e miocardite são frequentes principalmente em crianças. As alterações histopatológicas observadas no miocárdio, durante esta fase, incluem a presença de infiltrado inflamatório, miocardite degenerativa, formação de cistos. Em menos de 5% dos casos, problemas neurológicos fatais e/ou complicações cardíacas da fase aguda podem ser observados (ANSELMÍ; MOLEIRO, 1972; PRATA, 2001).

À medida que a resposta imune progride e a parasitemia é controlada, as alterações cardíacas podem retornar ao normal e os infiltrados inflamatórios tendem a regredir. Assim, a doença evolui para a fase intermediária, sem manifestação clínica, quando os parasitas são detectados por xenodiagnóstico, hemocultura, e mais recentemente, pela técnica molecular de PCR (BRENER, 1980; GUHL et al., 2002).

A fase indeterminada pode persistir por toda a vida do indivíduo e é nela que se encontra o maior número de pessoas infectadas. Entretanto, em cerca de 30% dos pacientes infectados, a infecção prossegue para a fase crônica, com escassa parasitemia e um curso clínico imprevisível que se estende de ausência de sintomas à doença grave com comprometimento cardiovascular e/ou gastrointestinal (PRATA, 2001).

Não existe até o momento, quimioterapia segura disponível para o tratamento da doença, responsável por alta morbidade nos indivíduos infectados que apresentam a forma crônica determinada (PEREIRA et.al., 2003).

No final da década de 1960, surgiram o nifurtimox e o benzonidazol, as primeiras drogas efetivas para o tratamento da fase aguda e recente da infecção chagásica humana. Apesar dos índices de cura muito baixo na fase crônica da doença e de causar efeitos colaterais indesejáveis, essas drogas ainda são as únicas existentes para o uso terapêutico (COURA; CASTRO, 2002).

Devido a grande dificuldade no tratamento da Doença de Chagas por medicamentos que apresentam uma toxicidade bastante elevada, torna-se importante o desenvolvimento de novos fármacos que apresentem o mínimo de efeitos adversos.

1.2.1 Imunologia da Doença de Chagas

Sabe-se que a grande maioria das infecções que envolvem a participação de agentes infecciosos parasitários, virais ou bacterianos causa no hospedeiro um estado de imunossupressão que, na realidade, é uma forma do agente etiológico estabelecer nesse novo ambiente, condições necessárias para sua perpetuação.

Como ocorre em outras parasitoses, a infecção por *T. cruzi* sensibiliza diferentes compartimentos do sistema imune, levando ao aparecimento de resposta humoral e celular específica com a finalidade de reduzir a carga parasitária. Mas, por outro lado, pode contribuir para o aparecimento das manifestações crônicas.

A resposta imune gerada na fase aguda é responsável pela redução da parasitemia, porém não é capaz de eliminar totalmente o parasita do organismo do hospedeiro (BRENER et al., 2000)

A invasão de diversos tipos celulares, em especial de macrófagos, por *T. cruzi* inicia uma série de interações moleculares que mobilizam a resposta imune inata do hospedeiro (REED, 1995; ALIBERTI et al., 1996). Desta forma, os macrófagos secretam interleucina – 12 (IL-12) que ativa as células NK (*natural killer*) a produzirem o interferon gama (IFN- γ)

(ALIBERTI et al., 1996). Este age sobre os macrófagos, ativando-os para atividade microbocida (REED, 1995; GAZZINELLI, et al., 1992). A citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), produzida por macrófagos durante a infecção por *T. cruzi* (TARLETON, 1988), participa dessa interação de forma sinérgica com IL-12 e IFN- γ (OSWALD et al., 1992). O papel protetor do IFN- γ no início da infecção foi amplamente demonstrado por REED em 1995. Esses estudos foram confirmados utilizando camundongos suscetíveis à infecção, geneticamente deficientes do IFN- γ (ROTTENBERG et al., 1996).

Na fase crônica da infecção, observa-se ativação de linfócitos T e B, em camundongos (MARINHO et al., 1999). Células NK, bem como linfócitos B e T também são encontrados ativados no sangue periférico de pessoas cronicamente infectadas (DUTRA et al., 1994; SATHLER-AVELAR et al., 2003).

Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são fundamentais no estabelecimento da resistência do hospedeiro ao *T. cruzi*. Camundongos deficientes de T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, quando infectados pelo parasita revelam uma susceptibilidade aumentada à infecção (RUSSO et al., 1988; TARLETON, 1990; ROTTENBERG et al., 1995).

É claro que os linfócitos T têm uma importante função protetora na imunidade contra *T. cruzi*. Entretanto a função na imunidade protetora e a contribuição de subgrupos de linfócitos T não está completamente determinada. Provavelmente, mecanismos de ação da resposta protetora das células T incluem: a) aumento de anticorpos específicos aos parasitas; b) secreção de linfocinas ativadoras de macrófagos, tais como IFN- γ ou IL-4 ; c) efeito direto, talvez incluindo citólise (NICKELL; STRYKER; AREVALO, 1993).

1.3 *Virola surinamensis*

Virola surinamensis (Myristicaceae) popularmente conhecida como “ucuúba branca” é muito difundida na floresta Amazônica. A resina da casca desta árvore é usada no tratamento de erisipelas e o chá de sua folha é usado para cólicas e dispepsia. Os índios da Venezuela usam sua seiva para o tratamento de feridas bucais (YOSHIDA, 1995).

Os diferentes usos medicinais das espécies de Myristicaceae por pessoas locais e índios estimularam uma avaliação etnobotânica entre os índios Waiãpi que moram em área entre os estados do Pará e Amapá. Um dos interessantes usos etnofarmacológicos de *Virola surinamensis* é o tratamento da malária com componentes voláteis obtido de suas folhas. Estes índios Waiãpi tratam a malária com uma inalação de vapor obtido do óleo das folhas de *Virola surinamensis*. Um estudo recente demonstrou que 100 µg/mL de óleos essenciais ou nerolidol obtido das folhas de *Virola surinamensis* inibem totalmente o desenvolvimento de trofozoitos jovens de *P. falciparum* para o estágio esquizonte (LOPES et al., 1999).

Um número de investigações descreveu o isolamento de compostos com efeitos tripanocidas, dentre eles as lignanas (LOPES et al., 1998; ABE et al., 2002; DA SILVA FILHO, 2004). Lopes et al (1998) obtiveram extratos dos brotos da *Virola surinamensis* e através de técnicas cromatográficas e de ressonância magnética nuclear isolaram e caracterizaram duas lignanas, a grandisina e a veraguensina, entre outras. Ensaio biológicos posteriores mostraram alta atividade tripanocida “in vitro” da grandisina e da veraguensina contra as formas tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*. Os resultados obtidos pelos autores sugerem uma importante ação preventiva das lignanas, principalmente a grandisina (Figura 1), na transmissão da Doença de Chagas via transfusão sanguínea.

Nihei et. al., desde 1998, investigavam produtos naturais como uma potencial fonte de drogas tripanocidas quando as lignanas grandisina e veraguensina foram descobertas

como produtos naturais ativos contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Estas lignanas foram primeiramente isoladas de brotos da *Viola surinamensis* (NIHEI et al., 2004). Os dois compostos são ativos em concentrações tão baixas como 5 µg/mL (LOPES et al., 2000).



Figura 1. Estrutura química da grandisina

A surinamensina, uma neolignana isolada das folhas da *Viola surinamensis*, com atividade anti-schistosomal (BARATA et al.,1978), é ativa “in vitro” contra a forma promastigota de *Leishmania donovani*, mas não mostra toxicidade quando testada contra a forma amastigota de *Leishmania donovani* no modelo de macrófagos peritoneais de camundongos (BARATA et al.,2000).

Nos últimos anos verifica-se um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (FILHO; YUNES, 1998) e embora as drogas sintéticas constituam a maioria nas farmácias domésticas, os fitoterápicos, vêm ganhando um espaço cada vez maior no combate e tratamento de diversas doenças.

Para o desenvolvimento de um novo fármaco, alguns passos devem ser cumpridos para se obter informações necessárias sobre sua eficácia e segurança para o uso humano, envolvendo experimentação em animais de laboratório ou estudos pré-clínicos e avaliação no próprio ser humano ou estudos clínicos.

Os estudos pré-clínicos podem ser subdivididos em duas etapas: estudos em espécies roedoras e estudos em espécies não roedoras. Os estudos em espécies roedoras incluem a avaliação das atividades farmacológicas, que são conduzidas separadamente ou em conjunto com os estudos de toxicidade. Nos estudos pré-clínicos é comum a determinação de uma série de parâmetros laboratoriais frequentemente utilizados na clínica médica, cujos resultados podem detectar alterações significativas de órgãos e/ou sistemas do organismo, mesmo na ausência de sintomatologia característica (RODRIGUES, 2002).

Devido a grande diversidade da flora brasileira e de grupos étnicos com tradição no preparo de remédios caseiros a partir de plantas, cabe aos pesquisadores elucidar as propriedades medicinais destas plantas e o seu desenvolvimento como medicamento, sendo a avaliação dos efeitos tóxicos, colaterais e adversos dessas substâncias uma etapa crítica neste processo.

Existindo a possibilidade de utilizar a planta como medicamento, torna-se importante investigar seus possíveis efeitos sobre o sistema hematopoético. Em um estudo preliminar realizado em nosso laboratório, verificamos que a injeção intraperitoneal de uma dose única de grandisina na concentração de 10 μ g/g de peso corpóreo, não provocou alterações em parâmetros hematológicos de camundongos, após 3, 6 e 13 dias de tratamento. Apenas a população linfocitária foi discretamente afetada. Estes estudos foram ampliados testando-se outras doses, tempos diferentes de exposição e mais parâmetros hematológicos, pretendendo-se assim contribuir com os estudos pré-clínicos de utilização desta planta.

2.OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar os possíveis efeitos da grandisina sobre o sistema hematopoético, em camundongos, através da determinação de alguns parâmetros hematológicos, no sangue periférico, na medula óssea e no baço.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar o número de eritrócitos, leucócitos e plaquetas no sangue periférico.
- Realizar a contagem específica de leucócitos, no sangue periférico.
- Determinar a celularidade e realizar contagem específica, na medula óssea.
- Caracterizar a população de linfócitos da medula óssea, por imunocitoquímica.
- Determinar a celularidade e caracterizar a população de linfócitos do baço, por imunocitoquímica.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais:

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/C, com idade entre 10-12 semanas e com peso entre 22-24g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Estes animais foram mantidos à temperatura de 24° C e luminosidade controlada (ciclo claro/escuro de 12 h) com livre acesso a água e ração. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Campus da USP-Ribeirão Preto (Anexo 1).

3.2. Substância

GRANDISINA

Substância purificada a partir do extrato dos brotos da planta amazônica *Virola surinamensis* (Myristicaceae). Essa substância foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Sérgio Albuquerque, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas e pelo Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, do Departamento de Física e Química, ambos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

A substância foi diluída em DMSO 5% preparado em solução de NaCl 0,9% (m/v) e submetida à ultra-som para melhorar a solubilização. A via de administração utilizada foi a intraperitoneal sendo a substância injetada em doses únicas de 25, 50 ou 100 µg/g de peso corpóreo ou em dose seriada de 100µg/g de peso corpóreo, por cinco dias consecutivos.

3.3. Grupos experimentais

Dose única

Grupo controle 1 (n=18): Cada animal recebeu uma dose única de 500µL de solução de NaCl 0,9%, veículo usado no preparo da suspensão de grandisina.

Grupo controle 1' (n=19): Cada animal recebeu uma dose única de 500µL de uma solução DMSO 5%, também utilizado no preparo da suspensão de grandisina

Grupo 1 (n=18): Cada animal recebeu dose única de 500µL na concentração de 25 µg/g de peso corpóreo.

Grupo 2 (n=18): Cada animal recebeu dose única de 500µL na concentração de 50 µg/g de peso corpóreo.

Grupo 3 (n=19): Cada animal recebeu dose única de 500µL na concentração de 100 µg/g de peso corpóreo.

Os animais controle e estudo foram avaliados 7 e 14 dias após o tratamento (n=8-10 para 7 dias e n=9-10 para 14 dias).

Dose seriada

Grupo controle 1 (n=20): Cada animal recebeu, por cinco dias consecutivos, uma dose de 500µL de solução de NaCl 0,9%, veículo usado no preparo da suspensão de grandisina.

Grupo controle 1' (n=20): Cada animal recebeu, por cinco dias consecutivos, uma dose de 500µL de uma solução DMSO 5%, também utilizado no preparo da suspensão de grandisina.

Grupo 1 (n=19): Cada animal recebeu, por cinco dias consecutivos, uma dose de 500 μ L na concentração de 100 μ g/g de peso corpóreo.

Os animais controle e estudo foram avaliados 7 e 14 dias após o tratamento (n=9-10 para 7 dias e n=10 para 14 dias).

3.4. Medula Óssea

3.4.1 Coleta do material

Os animais foram anestesiados com éter etílico, via inalatória, por um período de 30 a 60 segundos. Foram colhidas amostras de sangue da veia femural. Em seguida os animais foram sacrificados por deslocamento cervical sendo extraídos o fêmur e o baço. Com o auxílio de uma seringa, foi injetada solução de Hanks (1mL) em cada uma das extremidades do osso para obtenção do lavado medular. Com 25 μ L do lavado foram preparados sedimentos celulares obtidos por citocentrifugação a 1000rpm por 05 minutos.

3.4.1.1 Celularidade medular e contagem diferencial de leucócitos: uma alíquota do lavado medular foi examinada em câmara de Neubauer para determinação do número de células nucleadas contidas em cada fêmur. As lâminas contendo os sedimentos foram coradas com May-Grünwald / Giemsa. Foram obtidas as porcentagens relativas de cada série hematopoética em 300 células contadas. Os valores absolutos de cada série foram determinados através da multiplicação das porcentagens relativas pelo número de células nucleadas de cada animal.

3.5. Classificação das Células Hematopoéticas

Na classificação das células hematopoéticas de camundongos foram levados em consideração a relação núcleo-citoplasma, padrão de cromatina nuclear, presença ou não de nucléolos, diâmetro e segmentação do núcleo, afinidade tintorial do citoplasma e presença ou não de granulações primárias e secundárias no citoplasma.

Para a linhagem granulocítica foram consideradas três etapas maturativas: formas jovens (mieloblastos, promielócitos e mielócitos), formas em anel (metamielócitos e bastonetes) e formas segmentadas (com núcleo lobulado e segmentados). Quando a classificação da etapa maturativa foi duvidosa as células da linhagem granulocítica foram consideradas em conjunto como células mielóides.

Os precursores eritróides foram classificados em proeritroblastos (células com características blásticas identificáveis como da linhagem eritrocítica), eritroblastos basófilos/policromáticos (células com cromatina pouco condensada e citoplasma basófilo ou policromático) e eritroblastos ortocromáticos (cromatina condensada, picnose nuclear e citoplasma eosinofílico). Quando a classificação da etapa maturativa era duvidosa, as células da linhagem eritrocítica foram consideradas em conjunto como células eritróides.

Os linfoblastos, linfócitos e plasmócitos foram agrupados como células linfóides seguindo os critérios morfológicos de padrão de cromatina nuclear e basofilia citoplasmática. Os monócitos e seus precursores foram classificados como células monocíticas.

Megacarioblasto, megacariócito basófilo e megacariócito acidófilo foram agrupados como série megacariocítica.

A contagem diferencial dos sedimentos medulares foi obtida contando-se 300 células por lâmina. Foram obtidas as porcentagens relativas de cada série hematopoética e

os valores absolutos de cada série foram determinados através da multiplicação das porcentagens relativas pelo número de células nucleadas de cada animal.

3.6. Sangue Periférico

Amostras de cerca de 1,0 mL de sangue foram obtidas da veia femural e anticoaguladas com quantidade suficiente de etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA Na₂) a 10% para determinação dos seguintes parâmetros (COATES & MAEDEL, 1995):

- a) Contagem de eritrócitos: 20 µL de sangue periférico foi diluído em 4,0 mL de líquido de Hayem, em uma proporção 1:200, e uma pequena alíquota da suspensão de células foi examinada ao microscópio óptico, em câmara de Neubauer;
- b) Contagem global de leucócitos: 20 µL de sangue foi diluído em 0,38 mL de líquido de Turk, na proporção de 1:20. Os leucócitos foram contados em microscópio óptico, em câmara de Neubauer;
- c) Fórmula leucocitária: foram contadas 100 células em extensão sangüínea corada com May-Grünwald/Giemsa e estabelecida a proporção relativa entre os leucócitos, em microscopia ótica.
- d) Contagem de plaquetas: 20µL de sangue periférico foi diluído, na proporção 1:100, em oxalato de amônio a 1% e a contagem se processou, em câmara de Neubauer, utilizando microscopia ótica.

3.7. Baço

Suspensão de células esplênicas foi obtida a partir do divulsionamento do órgão com o auxílio de pinças em placas de Petri contendo solução de Hanks. A suspensão foi

homogeneizada com pipeta Pasteur completando-se o volume para 10 mL com solução de Hanks, em tubo falcon. A lise dos eritrócitos foi processada utilizando solução de Turk (líquido estromalizante) na proporção de 1:1. Alíquotas de suspensões de células esplênicas, após lise dos eritrócitos, foram examinadas em câmara de Neubauer para avaliação da celularidade do baço destes animais. No cálculo do número de células totais foi considerado o volume em que as mesmas foram suspensas e a diluição final com o líquido estromalizante.

3.8. Caracterização da População de Linfócitos, por Imunocitoquímica

Os anticorpos primários CD3, CD7 e CD19, os anticorpos secundários biotinizados, a estreptavidina ligada a peroxidase, o cromógeno diaminobenzidina (DAB), bem como outras substâncias necessárias ao protocolo da reação imunológica foram adquiridas na SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., USA.

A caracterização da série linfocítica foi feita pela pesquisa dos antígenos de superfície CD3, CD7 e CD19, empregando – se a técnica de imunocitoquímica, em sedimentos medulares e do baço. As lâminas preparadas para cada animal foram devidamente acondicionadas em papel alumínio e armazenadas a -20°C.

Antes da realização da contagem das lâminas, as mesmas foram retiradas do freezer e mantidas a temperatura ambiente por cerca de 2 horas, pois a condensação da água poderia destruir estruturas de células não fixadas. As preparações foram então fixadas com acetona e metanol na proporção de 1:1, a 4°C, por 90 segundos, para preservar a morfologia celular e prevenir a perda de células durante a realização da técnica. A técnica

de imunohistoquímica nas lâminas fixadas foi realizada segundo as instruções do fabricante. As preparações foram contracoradas com May-Grunwald/Giemsa.

A caracterização da série linfocítica foi feita contando-se 100 células onde se obteve as porcentagens relativas de cada tipo, de acordo com o anticorpo primário utilizado e em seguida foi determinado o número absoluto de células positivas através da multiplicação das porcentagens relativas pelo número de células nucleadas de cada animal.

3.9. Análise Estatística

Foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunns que compara pares de colunas, para $p < 0,05$. O programa utilizado foi o Graph Pad Prism versão 3.0, para análise estatística e realização dos gráficos.

4. RESULTADOS

RESULTADOS

Foram realizados experimentos com injeção intraperitoneal de grandisina nas doses únicas de 25, 50 ou 100 μ g/g de peso corpóreo e com injeção intraperitoneal de grandisina na dose seriada de 100 μ g/g de peso corpóreo, por 5 dias consecutivos. Os resultados que apresentaram alterações significativas das análises imunohistoquímicas em preparações citológicas do baço e medula óssea e das determinações de alguns parâmetros hematológicos no sangue periférico, medula óssea e baço, após 7 e 14 dias de tratamento, serão apresentados graficamente a seguir.

4.1. Experimentos com doses únicas

Efeito da grandisina sobre o número de leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos no sangue periférico.

A administração da grandisina (100 μ g/g de peso corpóreo) reduziu significativamente o número de leucócitos, linfócitos e neutrófilos no sangue periférico após 7 e 14 dias da aplicação quando comparado aos controles e reduziu o número de monócitos apenas 14 dias após a aplicação da substância quando comparado aos controles (Fig. 1, 2, 3 e 4 e Apêndices 1 e 7).

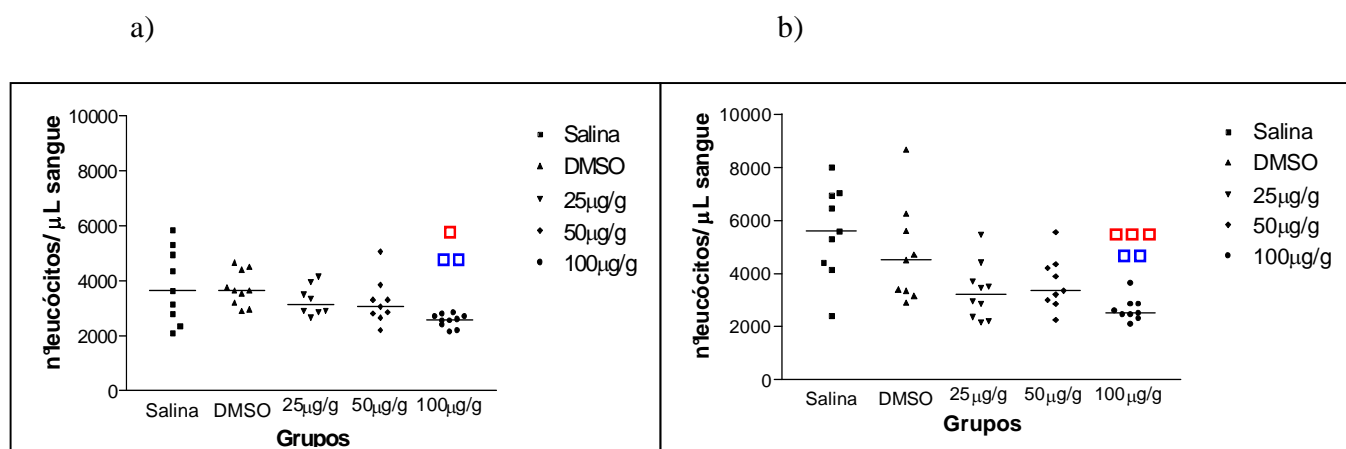


Fig. 1 - Número global de leucócitos circulantes de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,01$ em relação ao DMSO, \square $p < 0,05$ em relação à Salina,

□□ p<0,001 quando comparado à Salina.

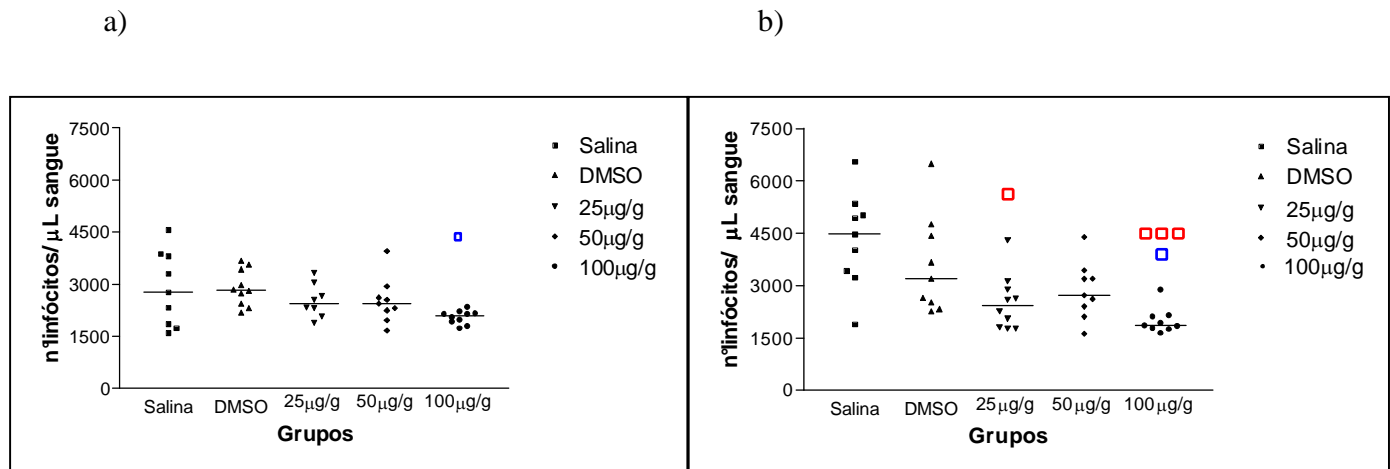


Fig. 2 - Número de linfócitos circulantes de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. □ p<0,05 em relação ao DMSO, □□ p<0,001 em relação à Salina, □ p<0,05 em relação à Salina.

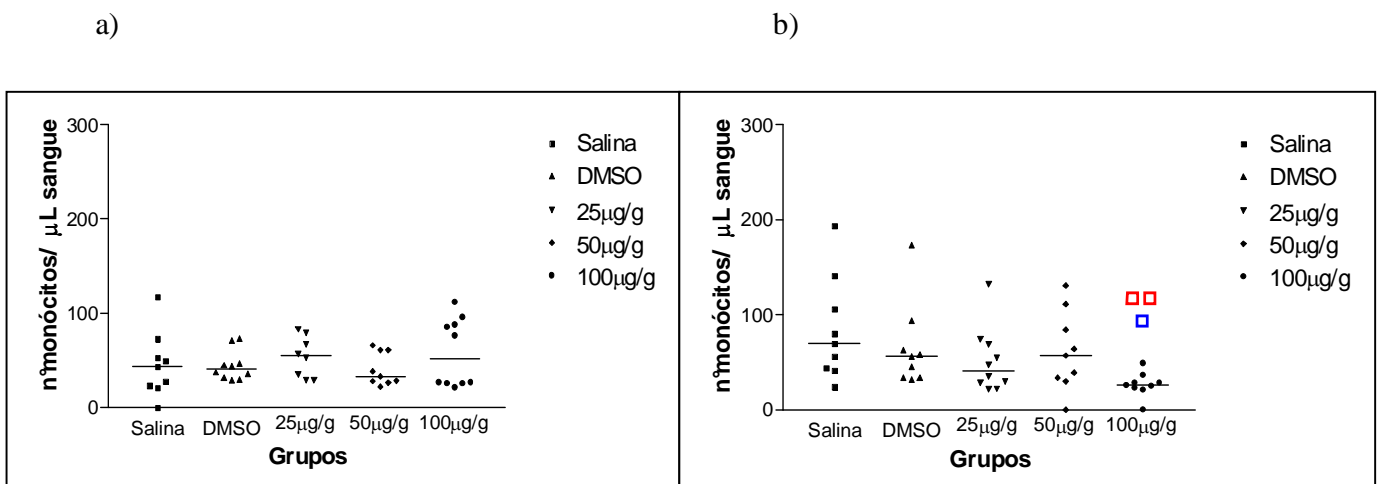


Fig. 3 - Número de monócitos circulantes de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. □ p<0,05 em relação ao DMSO, □□ p<0,01 em relação à Salina.

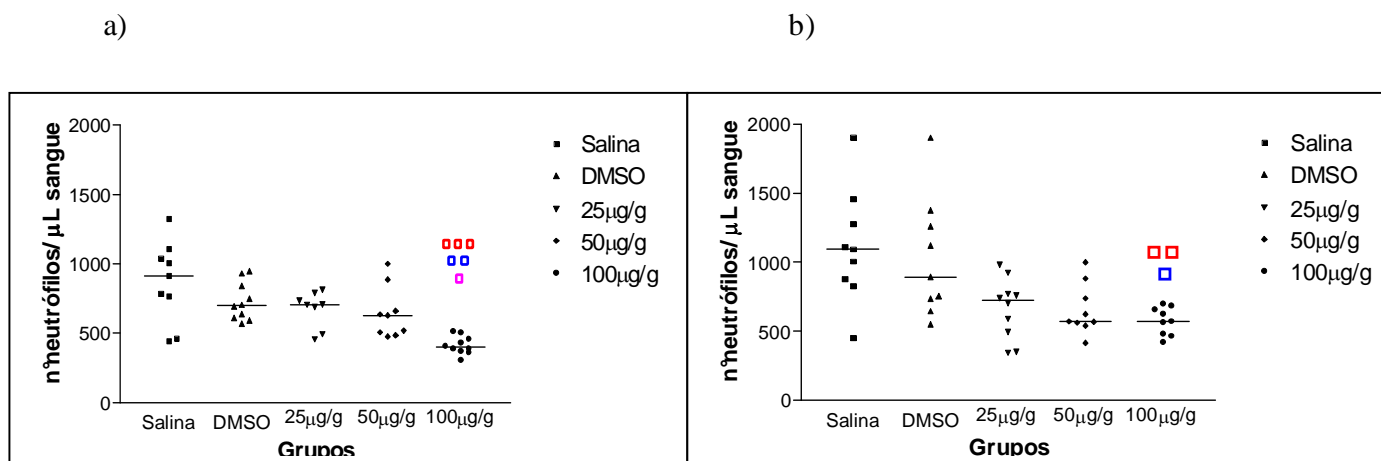


Fig. 4 - Número de neutrófilos circulantes de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,05$ em relação à dose de 25µg, \square $p < 0,01$ em relação ao DMSO, \square $p < 0,001$ em relação à Salina, \square $p < 0,05$ em relação ao DMSO, \square $p < 0,01$ em relação à Salina.

Efeito da grandisina sobre o número de células mononucleares e polimorfonucleares do sangue periférico.

Para melhor visualizar as alterações induzidas, os leucócitos foram reunidos em 2 grupos: células mononucleares e polimorfonucleares.

A administração de grandisina (100µg/g de peso corpóreo) provocou redução no número de células mononucleares e polimorfonucleares após 7 e 14 dias de tratamento quando comparado aos controles (Fig. 5 e 6 e Apêndices 2 e 8).

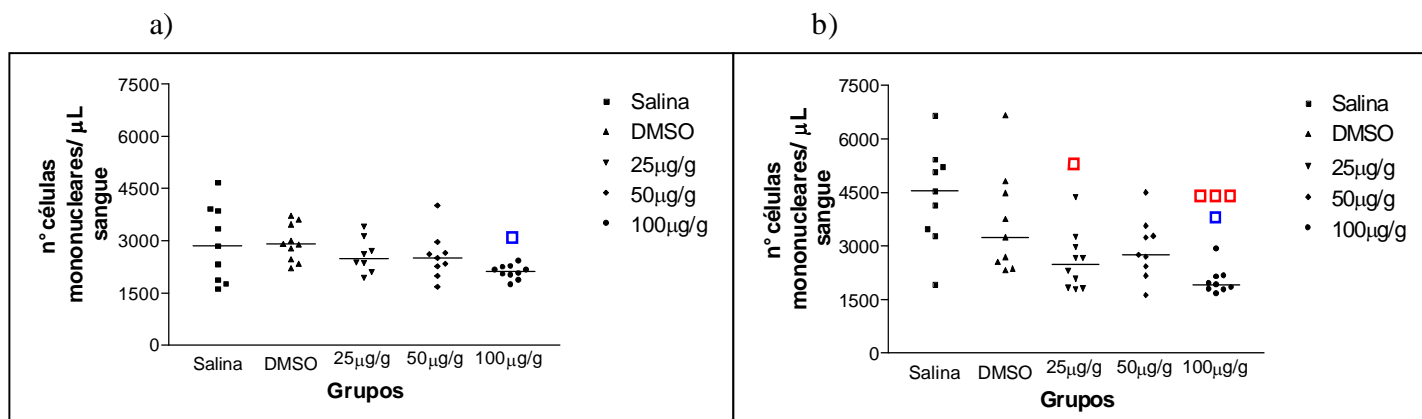


Fig. 5 - Número de células mononucleares circulantes de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,05$ em relação ao DMSO, $\square\square$ $p < 0,001$ em relação à Salina, \square $p < 0,05$ em relação à Salina.

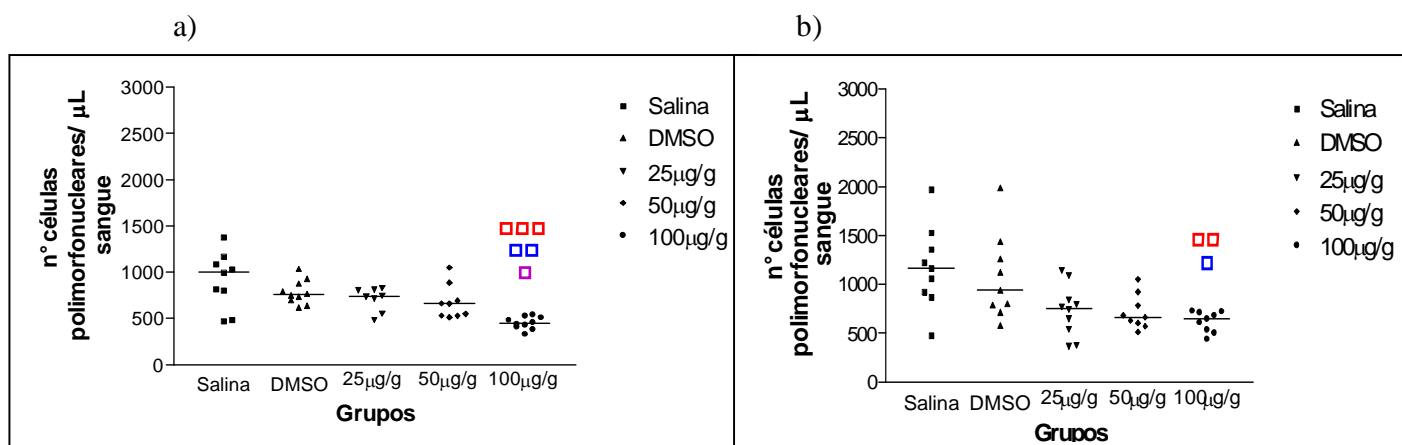


Fig. 6 - Número de células polimorfonucleares circulantes de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. $\square\square$ $p < 0,001$ em relação à Salina, $\square\square$ $p < 0,01$ em relação ao DMSO, \square $p < 0,05$ em relação à dose de 25 µg/g, $\square\square$ $p < 0,01$ em relação à Salina, \square $p < 0,05$ em relação ao DMSO.

Efeito da grandisina sobre o número de eritrócitos, basófilos e eosinófilos no sangue periférico.

Após 7 e 14 dias da administração de grandisina nas doses únicas de 25µg/g, 50µg/g ou 100µg/g de peso corpóreo, não foi observado alterações no número de eritrócitos, basófilos e eosinófilos quando comparado aos controles (Apêndices 3 e 9). O exame das extensões sanguíneas coradas não demonstrou quaisquer alterações relacionadas à morfologia dos eritrócitos e leucócitos.

Efeito da grandisina sobre o número de plaquetas circulantes no sangue periférico.

A grandisina na dose de 100µg/g de peso corpóreo elevou o número de plaquetas após 14 dias do tratamento quando comparado às outras dosagens, embora a significância estatística tenha sido verificada apenas quando comparado com a dose de 25µg/g de peso corpóreo (Fig. 7 e Apêndices 3 e 9).

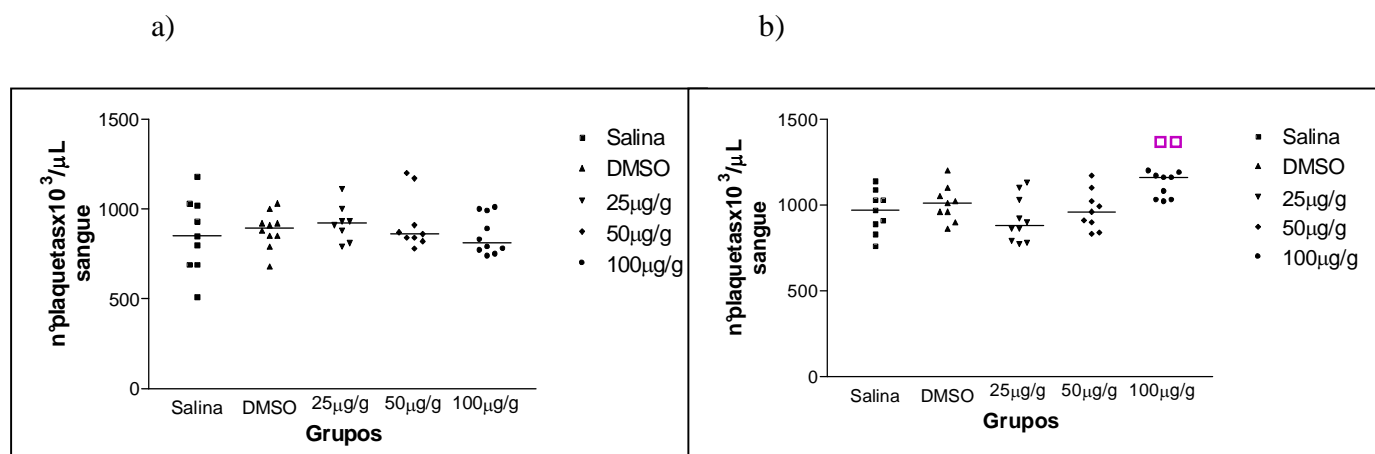


Fig. 7 – Número de plaquetas circulante no sangue periférico de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. □ p<0,01 em relação à dose de 25µg/g de peso corpóreo.

Efeito da grandisina sobre o número total de células nucleadas na medula óssea e baço.

Observou-se um aumento significativo do número total de células nucleadas na medula óssea, nas doses de 50 μ g/g e 100 μ g/g de peso corpóreo, após 14 dias do tratamento, sendo que uma tendência de aumento já havia sido notada na administração de 100 μ g/g de peso corpóreo, após 7 dias do tratamento. Não houve alteração na celularidade do baço nos dias em que foram realizados os experimentos (Fig. 8 e 9 e Apêndices 4 e 10).

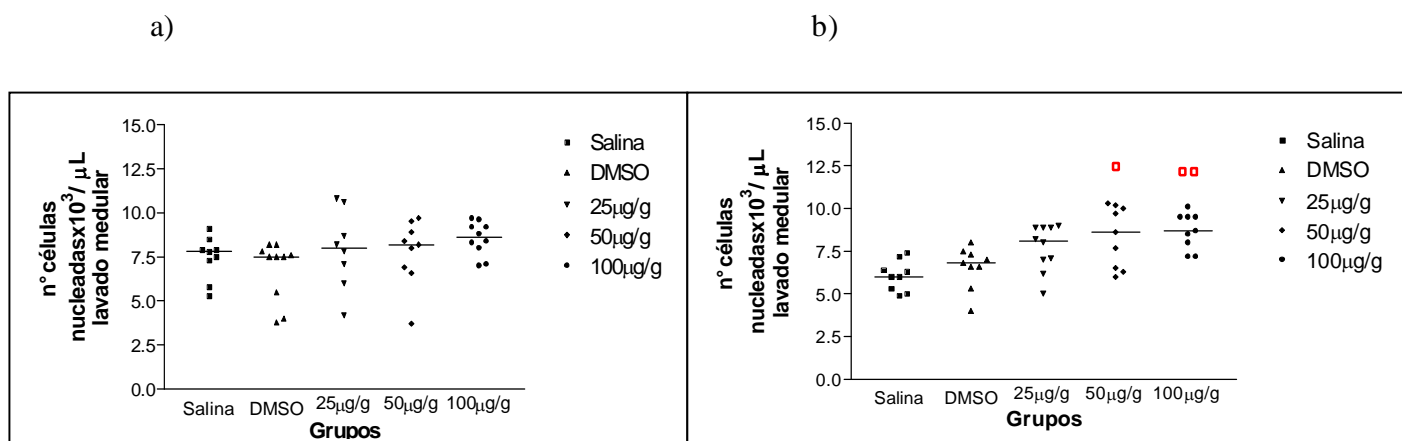


Fig. 8 – Celularidade medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square p < 0,01 em relação à Salina, \square p < 0,05 em relação à Salina.

a)

b)

39

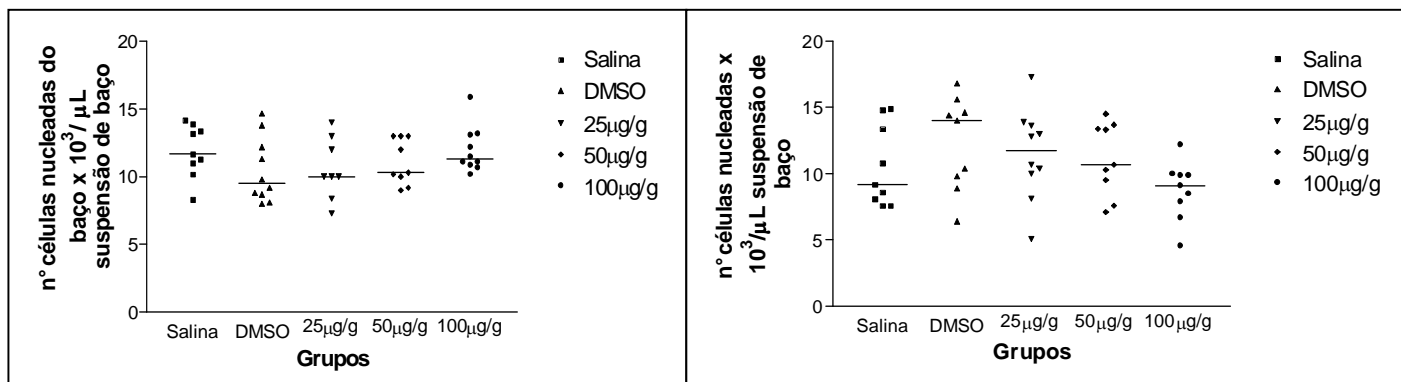
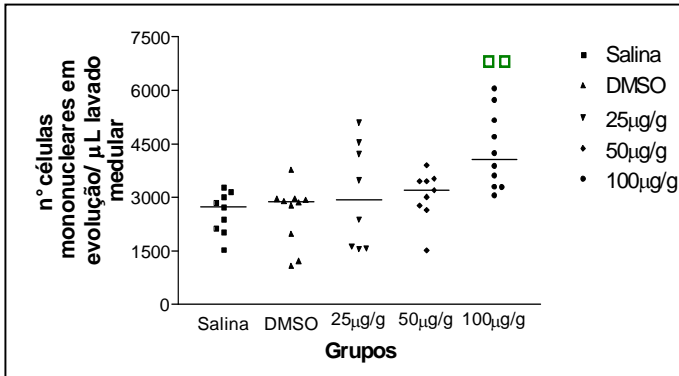


Fig. 9 – Celularidade esplênica de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas.

Efeito da grandisina sobre o número de células mononucleares e polimorfonucleares em evolução na medula óssea.

A grandisina na dose de 100μg/g de peso corpóreo provocou um aumento no número de células mononucleares em evolução, tanto das células em evolução linfocítica como das em evolução monocítica, após 7 e 14 dias do tratamento quando comparado aos controles. Houve uma tendência de aumento na produção de células mononucleares em evolução na dose de 50μg/g de peso corpóreo após 7 dias do tratamento sendo que, após 14 dias da injeção de grandisina, o aumento foi estatisticamente significativo na produção das células em evolução monocítica quando comparado aos controles (Fig. 10, 11 e 12 e Apêndices 5, 6, 11 e 12). Nas três doses testadas não foi observado alterações na produção de células polimorfonucleares na medula óssea, após 7 dias da administração da substância, embora tenha ocorrido uma tendência de aumento, em especial das células em evolução neutrofílica após 14 dias da administração da grandisina (Fig. 13 e 14 e Apêndices 5, 6, 11 e 12).

a)



b)

40

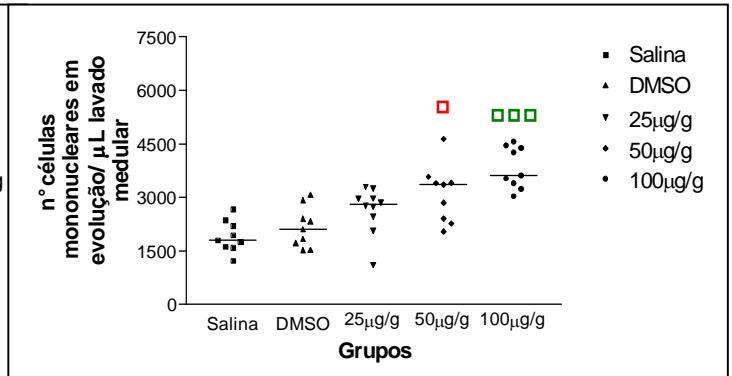
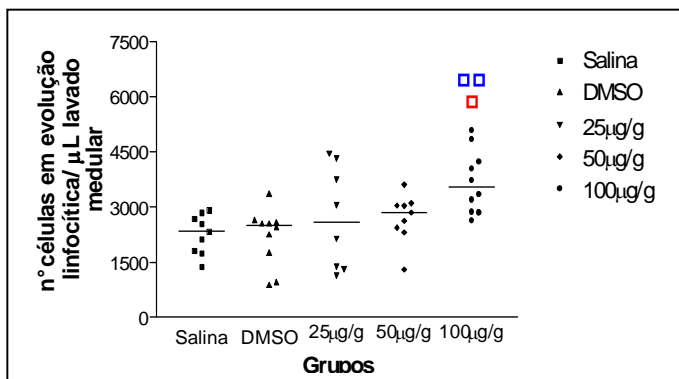


Fig. 10 - Número de células mononucleares em evolução presentes no lavado medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,01$ em relação à Salina e ao DMSO, \square $p < 0,05$ em relação à Salina, $\square\square$ $p < 0,001$ em relação à Salina e ao DMSO.

a)



b)

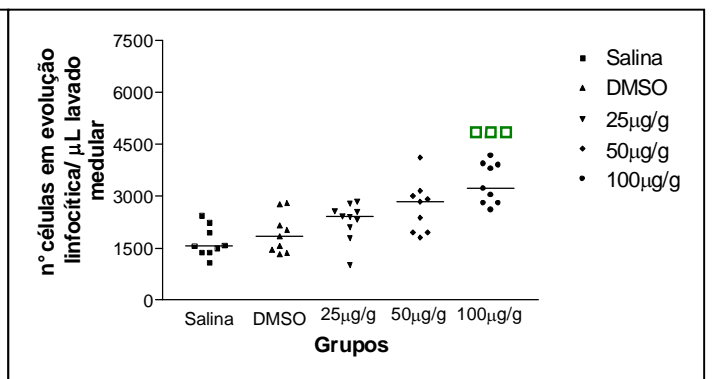


Fig.11 - Número de células em evolução linfocítica presentes no lavado medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,01$ em relação ao DMSO, \square $p < 0,05$ em relação à Salina, $\square\square$ $p < 0,001$ em relação à Salina e ao DMSO.

a)

b)

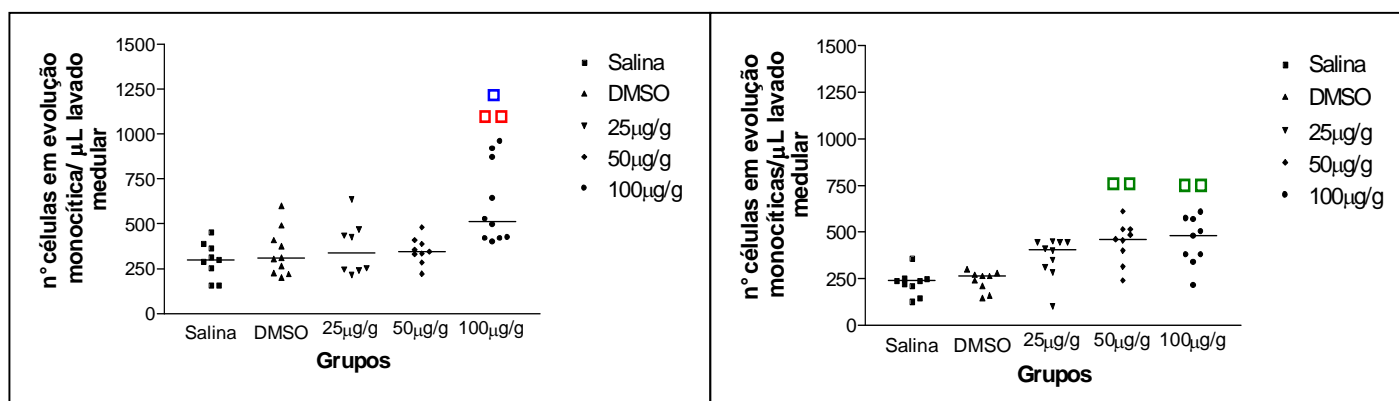


Fig. 12 – Número de células em evolução monocítica presentes no lavado medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,01$ em relação à Salina, \square $p < 0,05$ em relação ao DMSO, \square $p < 0,01$ em relação à Salina e ao DMSO.

a)

b)

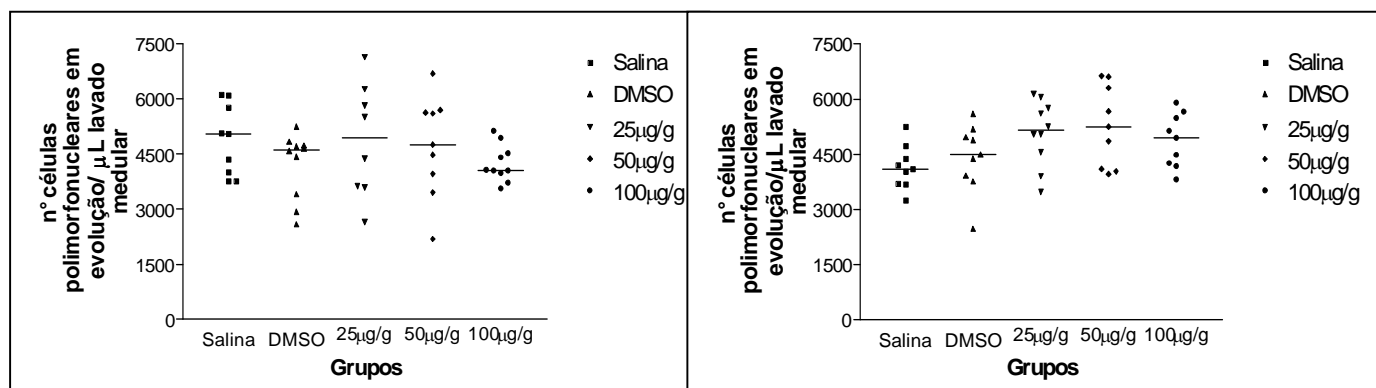


Fig. 13 - Número de células polimorfonucleares em evolução presentes no lavado medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas.

a)

b)

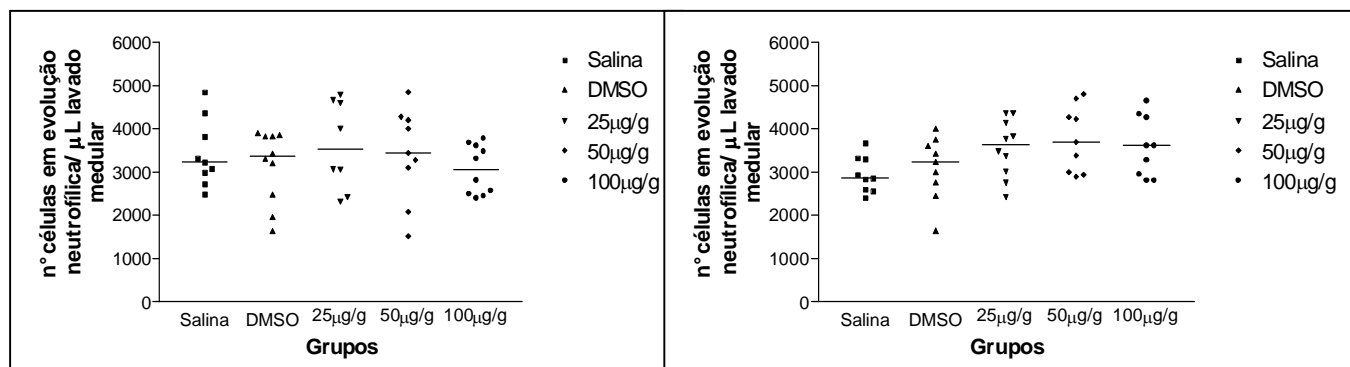


Fig. 14 - Número de células em evolução neutrofílica presentes no lavado medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas.

Efeito da grandisina sobre o número de células em evolução eritrocítica, megacariocítica, eosinofílica e basofílica na medula óssea.

Não houve alteração no número de células em evolução eritrocítica, megacariocítica, eosinofílica e basofílica da medula óssea nos grupos tratados com a grandisina na dose única de 25µg/g, 50µg/g ou 100µg/g de peso corpóreo, quando comparado aos controles (Apêndices 6 e 12).

4.2. Experimentos com doses seriadas

Na tentativa de melhor compreender as alterações induzidas pela grandisina administrada em dose única, nosso próximo passo foi administrar a grandisina na dose de 100µg/g por cinco dias consecutivos e observar as alterações nas células do sangue periférico, medula óssea e baço, após 7 e 14 dias do tratamento.

Efeito da grandisina sobre o número de leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos no sangue periférico.

Na avaliação das células da série branca do sangue periférico, observamos que os números de leucócitos, linfócitos e monócitos reduziram no sangue periférico, após 7 e 14 dias do tratamento quando comparado aos controles, embora somente após 7 dias estas reduções tenham sido estatisticamente significantes (Fig. 15, 16 e 17 e Apêndices 13 e 19). Houve redução significativa do número de neutrófilos, 7 e 14 dias após o tratamento quando comparado aos controles (Fig. 18 e Apêndices 13 e 19).

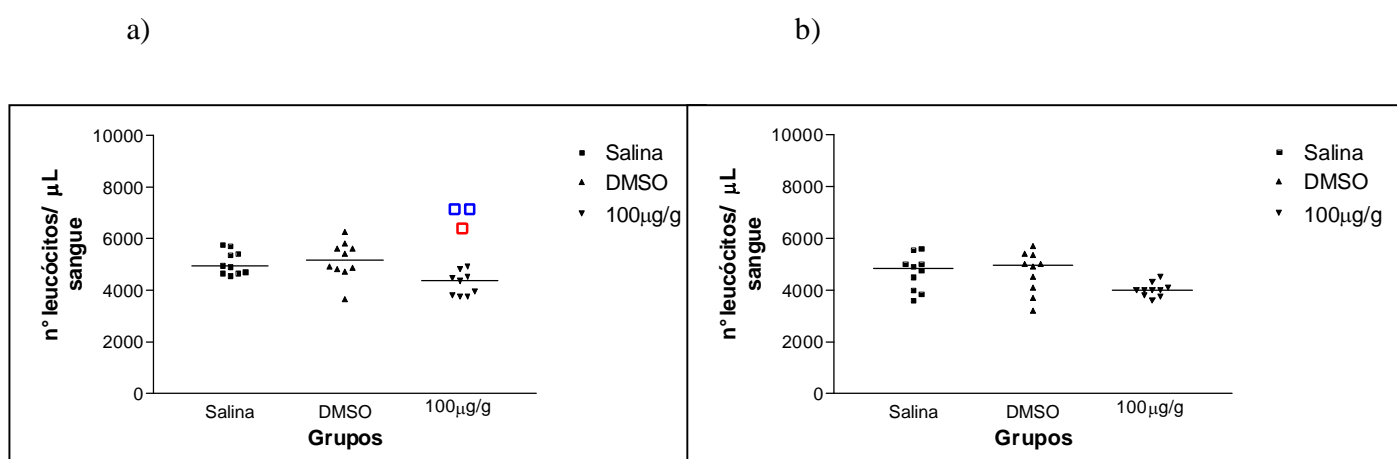
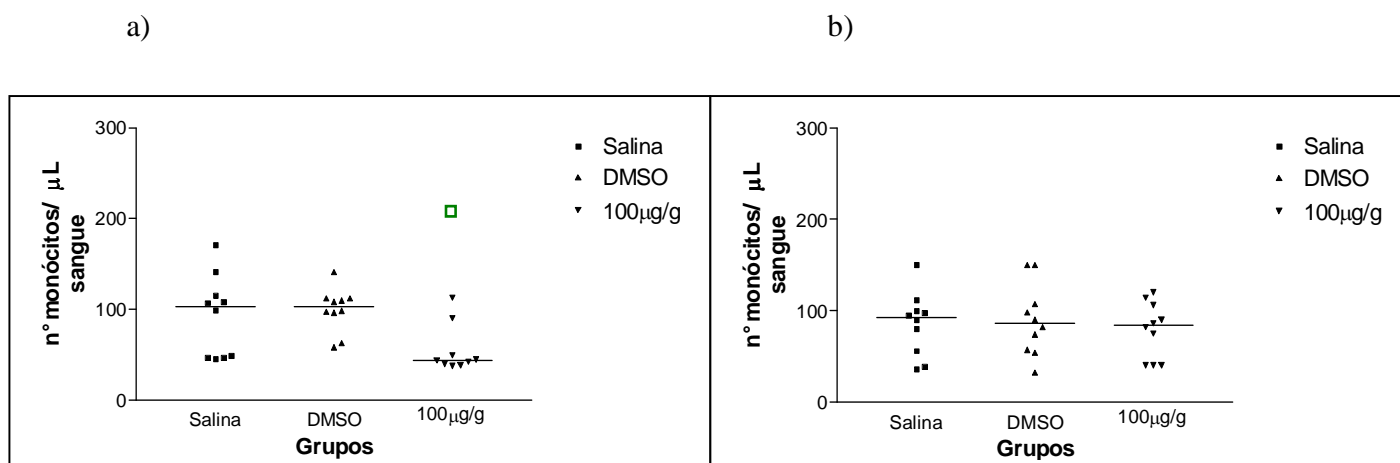
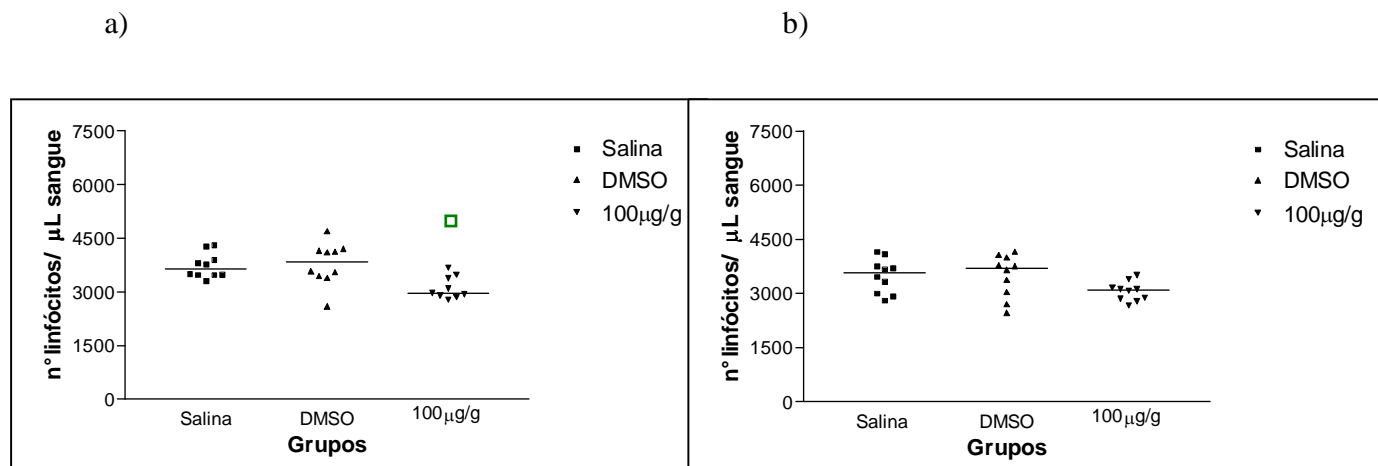


Fig. 15 - Número global de leucócitos circulantes de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,01$ em relação ao DMSO, \square $p < 0,05$ em relação à Salina.



a)

b)

45

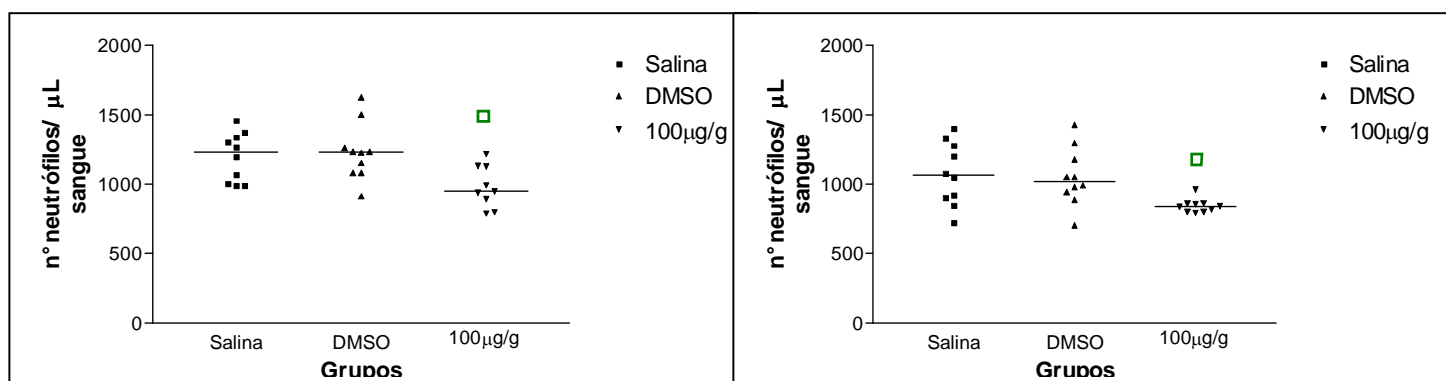
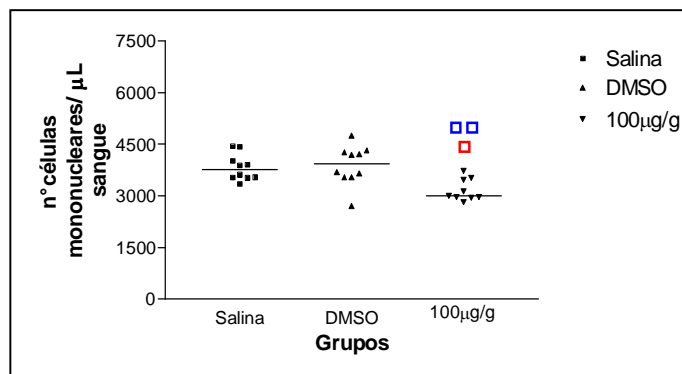


Fig. 18 - Número de neutrófilos circulantes de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. □ $p < 0,05$ em relação à Salina ao DMSO.

Efeito da grandisina sobre o número de células mononucleares e polimorfonucleares do sangue periférico.

A administração de grandisina promoveu redução do número de células mononucleares após 7 e 14 dias do tratamento, embora somente após 7 dias esta tenha sido significativa (Fig. 19 e Apêndices 14 e 20). Houve redução do número de células polimorfonucleares após 7 e 14 dias do tratamento quando comparado aos controles (Fig. 20 e Apêndices 14 e 20).

a)



b)

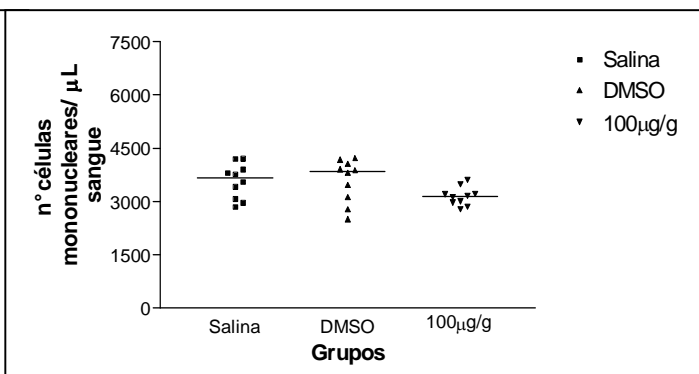
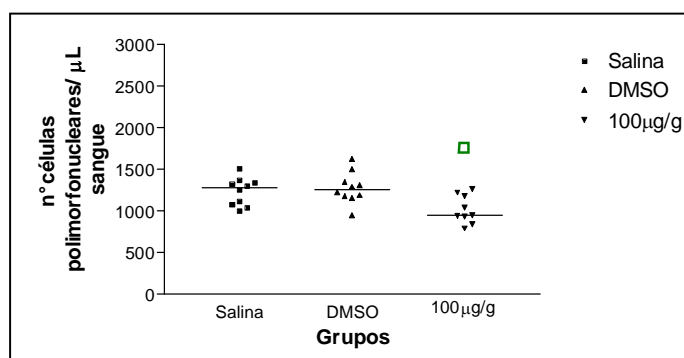


Fig. 19 - Número de células mononucleares circulantes de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,01$ em relação ao DMSO, \square $p < 0,05$ em relação à Salina.

a)



b)

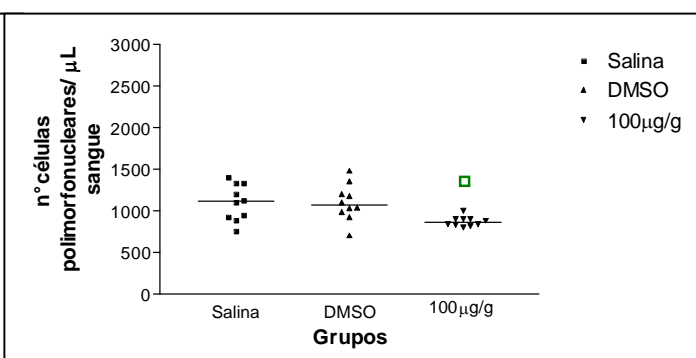


Fig. 20 - Número de células polimorfonucleares circulantes de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,05$ em relação à Salina e ao DMSO.

Efeito da grandisina sobre o número de eritrócitos, basófilos e eosinófilos no sangue periférico.

O número de eritrócitos, basófilos e de eosinófilos no sangue periférico não se alterou após 7 e 14 dias do tratamento com grandisina quando comparado aos controles. Não observamos quaisquer alterações na morfologia dos eritrócitos e leucócitos ao analisarmos as extensões sanguíneas (Apêndices 15 e 21).

Efeito da grandisina sobre o número de plaquetas circulantes no sangue periférico.

Observou-se uma redução estatisticamente significativa do número de plaquetas após 14 dias do tratamento quando comparado aos controles (Fig. 21 e Apêndices 15 e 21).

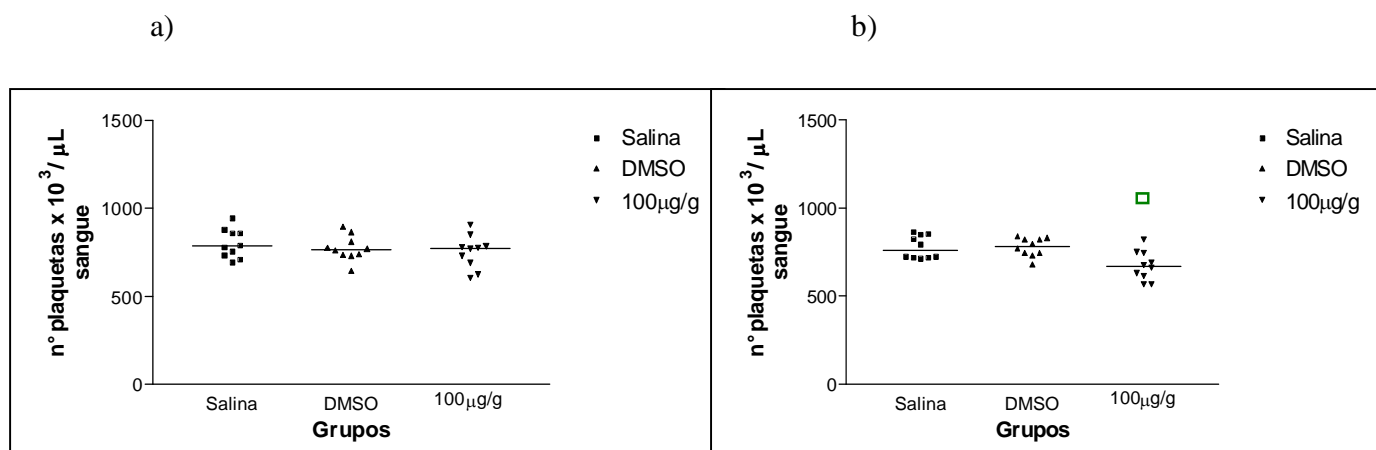


Fig. 21 – Número de plaquetas circulante no sangue periférico de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. □ p<0,01 em relação à Salina e ao DMSO.

Efeito da grandisina sobre o número total de células nucleadas na medula óssea e baço.

Na avaliação da celularidade medular notou-se uma redução estatisticamente significativa no número de células, quando comparado aos controles, após 7 e 14 dias do tratamento (Fig. 22 e Apêndices 16 e 22). Não houve alteração significativa da população de células esplênicas no mesmo período (Fig. 23 e Apêndices 16 e 22).

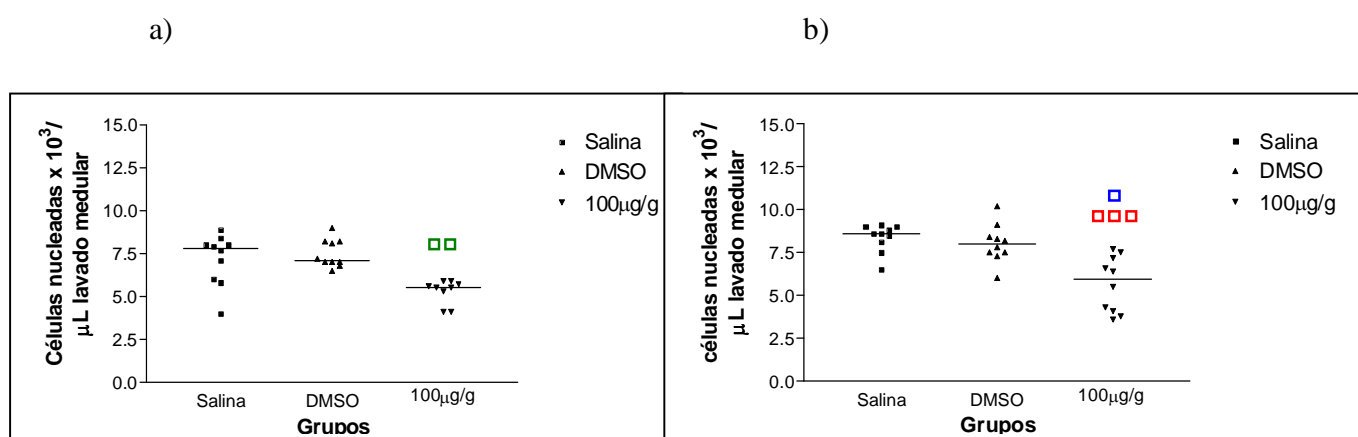


Fig. 22 – Celularidade medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. □□ $p < 0,01$ em relação à Salina e ao DMSO, □ $p < 0,05$ em relação ao DMSO, □□□ $p < 0,001$ em relação à Salina.

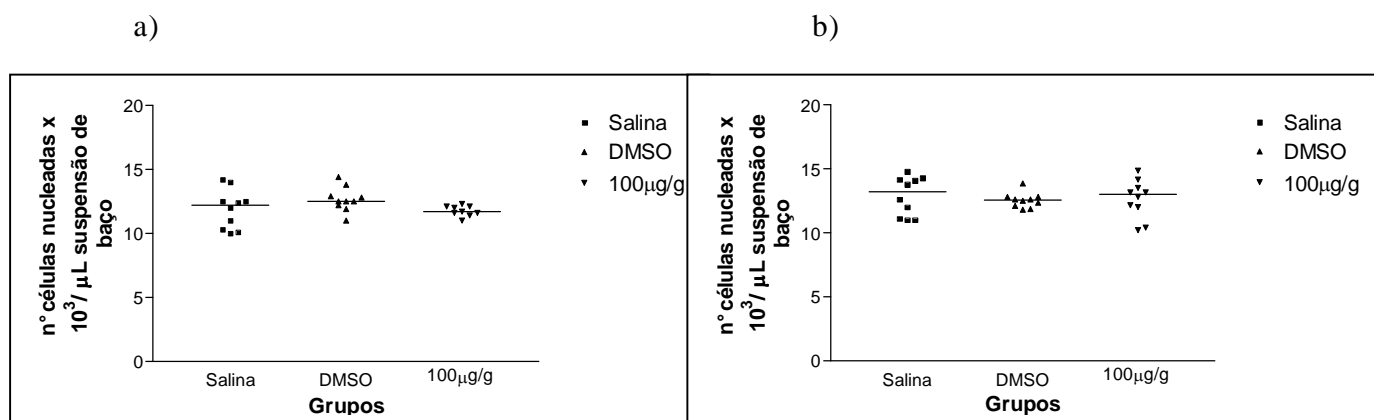


Fig. 23 – Celularidade esplênica de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas.

Efeito da grandisina sobre o número de células mononucleares e polimorfonucleares em evolução na medula óssea.

Houve redução do número de células mononucleares em evolução, tanto da linhagem linfocítica como da linhagem monocítica, 7 e 14 dias após o tratamento quando comparado aos controles (Fig. 24, 25 e 26 e Apêndices 17, 18, 23 e 24). Foi observado redução do número de células polimorfonucleares em evolução, após 7 e 14 dias do tratamento, causada principalmente pela redução do número de células da linhagem neutrofílica, embora tenha ocorrido também uma redução estatisticamente significativa das células da linhagem eosinofílica, após 14 dias da injeção de grandisina quando comparado aos controles (Fig. 27, 28 e 29 e Apêndices 17, 18, 23 e 24).

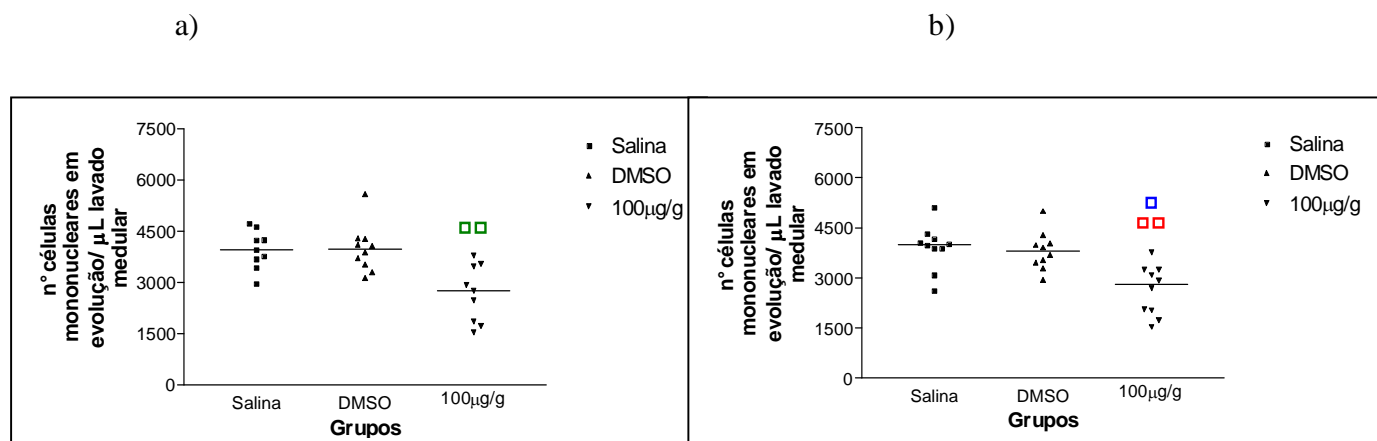


Fig. 24 - Número de células mononucleares em evolução presentes no lavado medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,01$ em relação à Salina e ao DMSO, \square $p < 0,05$ em relação ao DMSO, \square $p < 0,01$ em relação à Salina.

a)

b)

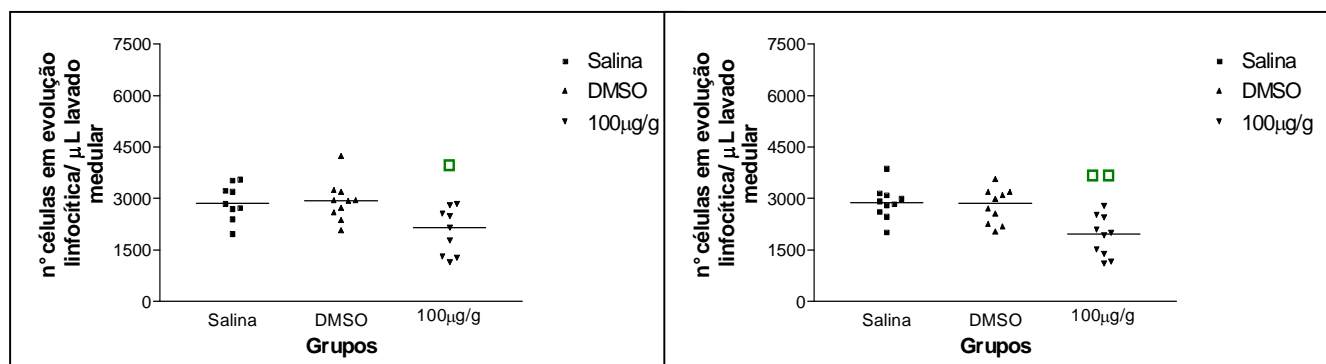


Fig. 25 – Número de células em evolução linfocítica presentes no lavado medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,05$ em relação à Salina e ao DMSO, \square $p < 0,01$ em relação à Salina e ao DMSO.

a)

b)

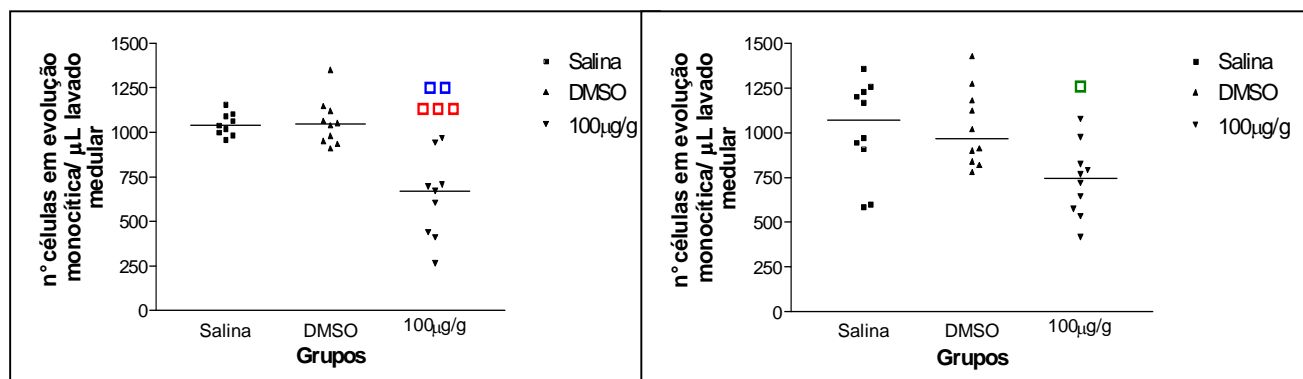


Fig. 26 – Número de células em evolução monocítica presentes no lavado medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,01$ em relação ao DMSO, \square $p < 0,001$ em relação à Salina, \square $p < 0,05$ em relação à Salina e ao DMSO.

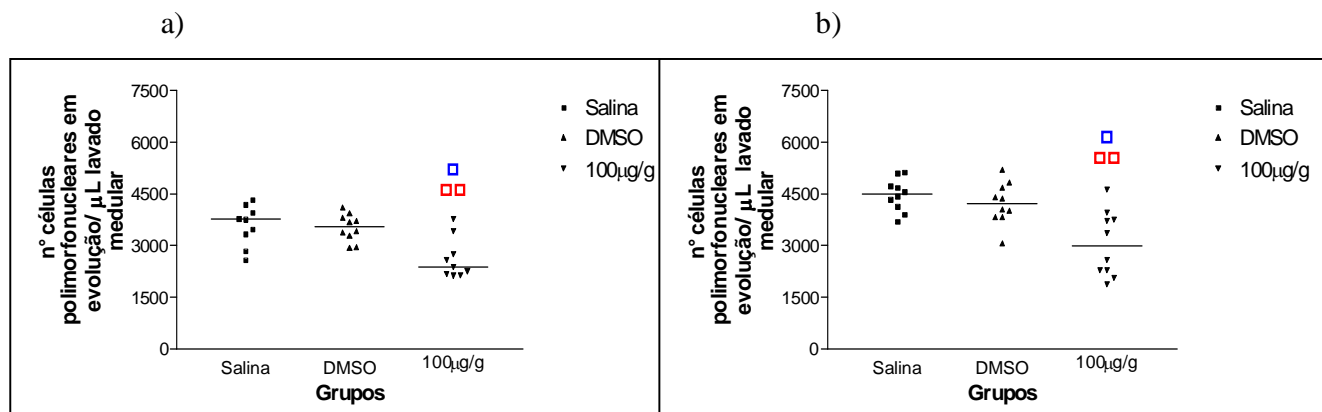


Fig. 27 - Número de células polimorfonucleares em evolução presentes no lavado medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,01$ em relação à Salina, \square $p < 0,05$ em relação ao DMSO.

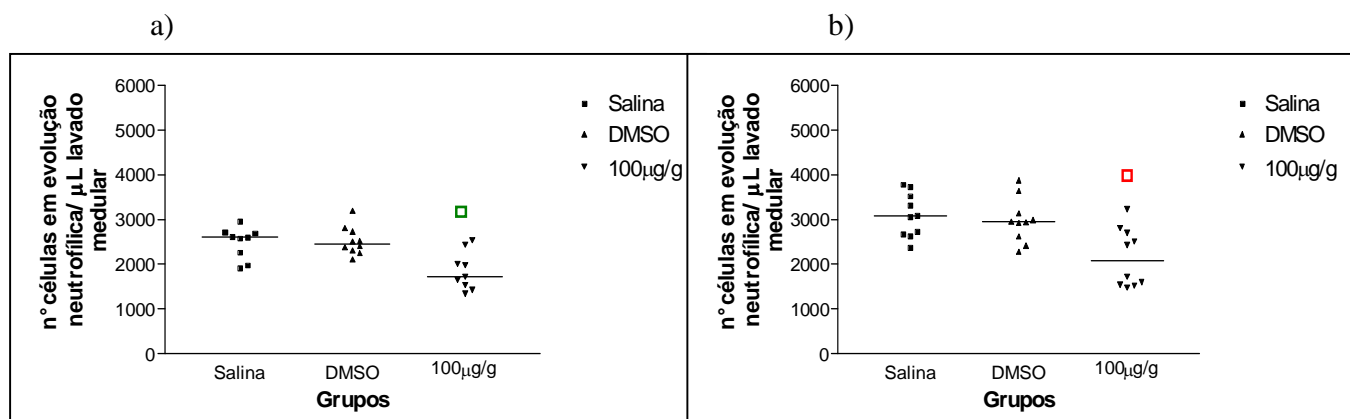


Fig. 28 - Número de células em evolução neutrofílica presentes no lavado medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,05$ em relação à Salina e ao DMSO, \square $p < 0,05$ em relação à Salina.

a)

b)

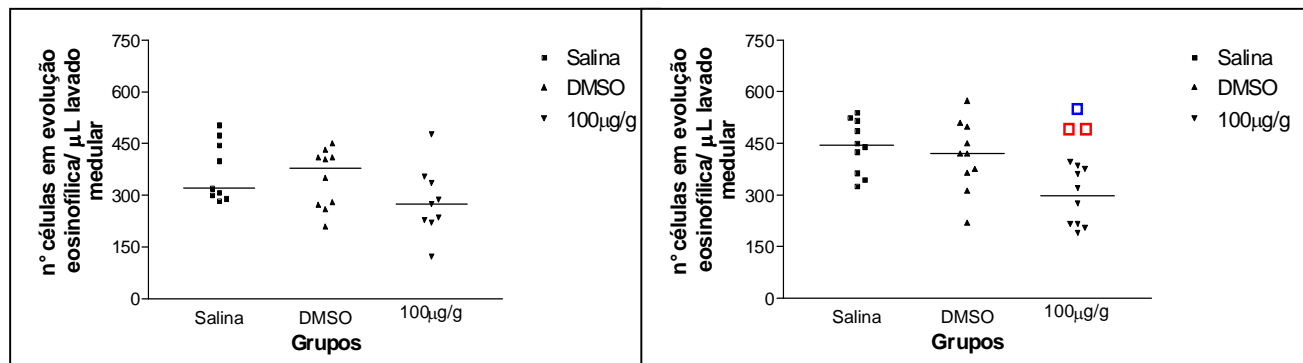


Fig. 29 – Número de células em evolução eosinofílica presentes no lavado medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. ◻ $p < 0,05$ em relação ao DMSO, ◻◻ $p < 0,01$ em relação à Salina.

Efeito da grandisina sobre o número de células em evolução eritrocítica, megacariocítica e basofílica na medula óssea.

No experimento de dose seriada, foi observado pela primeira vez alteração na série eritrocitária, tendo ocorrido redução estatisticamente significativa do número das células em evolução eritrocítica, após 14 dias do término do tratamento quando comparado aos controles (Fig. 30 e Apêndices 18 e 24). Não houve alterações nos números de células em evolução megacariocítica e basofílica da medula óssea.

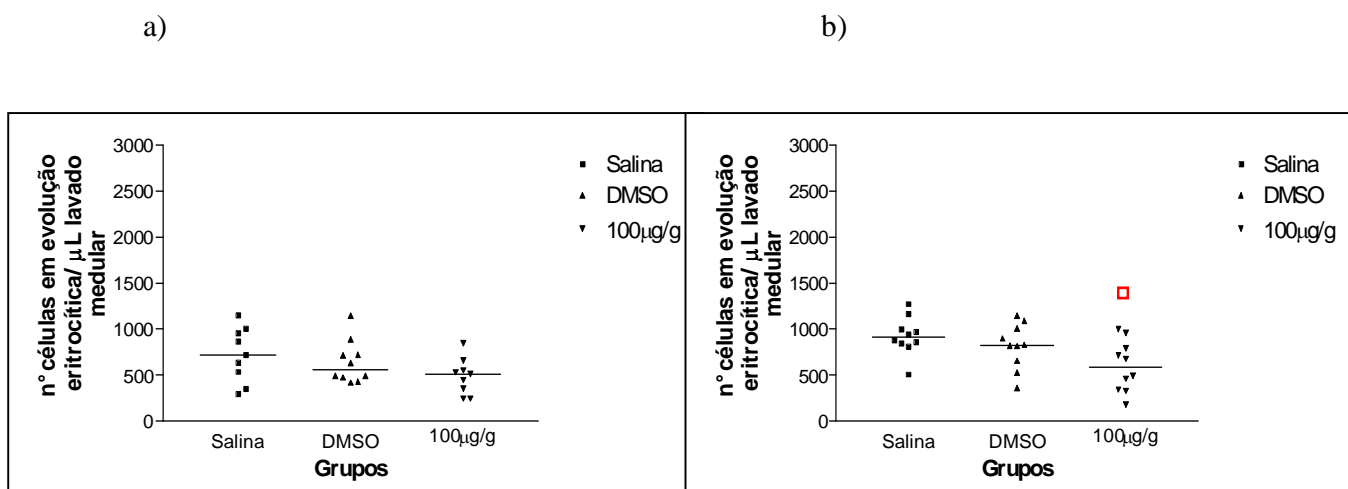


Fig. 30 – Número de células em evolução eritrocítica presentes no lavado medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,05$ em relação à Salina.

4.3. Caracterização fenotípica dos linfócitos da medula óssea e baço

Buscando investigar a população de linfócitos presente no lavado medular e no baço, nosso próximo passo foi realizar análise imunocitoquímica onde pesquisamos os antígenos de superfície CD3, CD7 e CD19 para caracterizar as populações de linfócitos T, T imaturos e B, respectivamente.

Estas análises foram realizadas nas preparações obtidas nos experimentos de dose única e seriada, na concentração de 100µg/g de peso corpóreo. No armazenamento dos sedimentos celulares ocorreram algumas perdas que justificam pequenas variações no número de preparações avaliadas.

Efeitos da grandisina sobre a população de linfócitos presentes no lavado medular e no baço.

Observamos uma redução estatisticamente significativa na população de linfócitos T totais (CD3), bem como na população de linfócitos T imaturos (CD7) e na população de Linfócitos B (CD19), do lavado medular, 7 e 14 dias após o tratamento, apenas na utilização da grandisina em dose seriada (Fig. 31, 32 e 33 e Apêndices 25 e 27). No baço, essas populações de linfócitos não sofreram alterações após 7 e 14 dias do tratamento (Fig. 34, 35 e 36 e Apêndices 26 e 28).

a)

b)

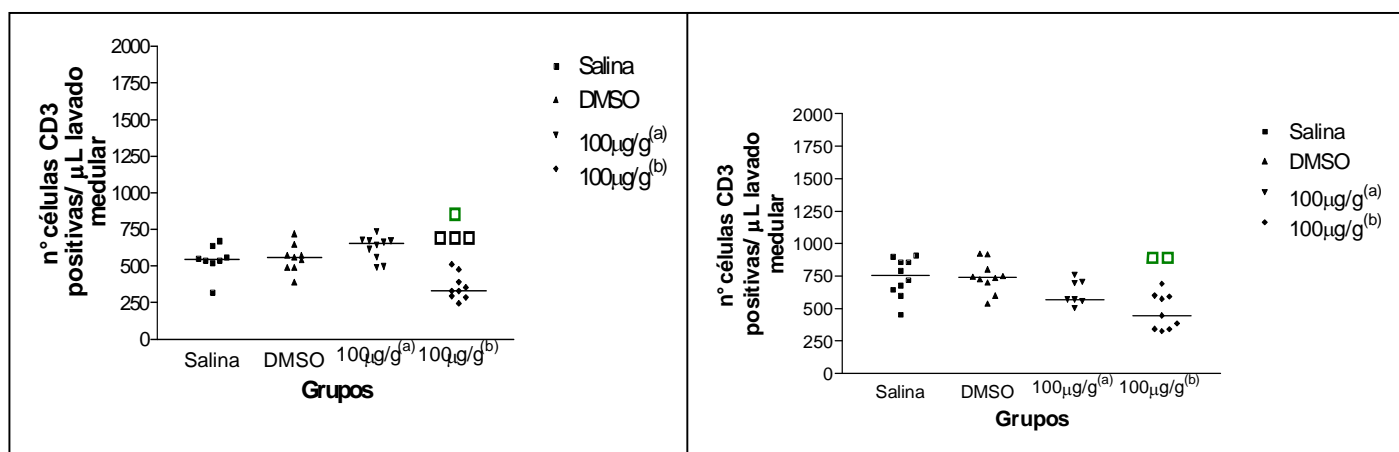


Fig. 31 – Número de células CD3 positivas no lavado medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. □ $p < 0,05$ em relação à Salina e ao DMSO, □□ $p < 0,001$ em relação à dose única de $100\mu\text{g/g}^{(a)}$ de peso corpóreo, □□ $p < 0,01$ em relação à Salina e ao DMSO. $100\mu\text{g/g}^{(a)}$ (dose única de $100\mu\text{g/g}$ de peso corpóreo) e $100\mu\text{g/g}^{(b)}$ (dose seriada de $100\mu\text{g/g}$ de peso corpóreo)

a)

b)

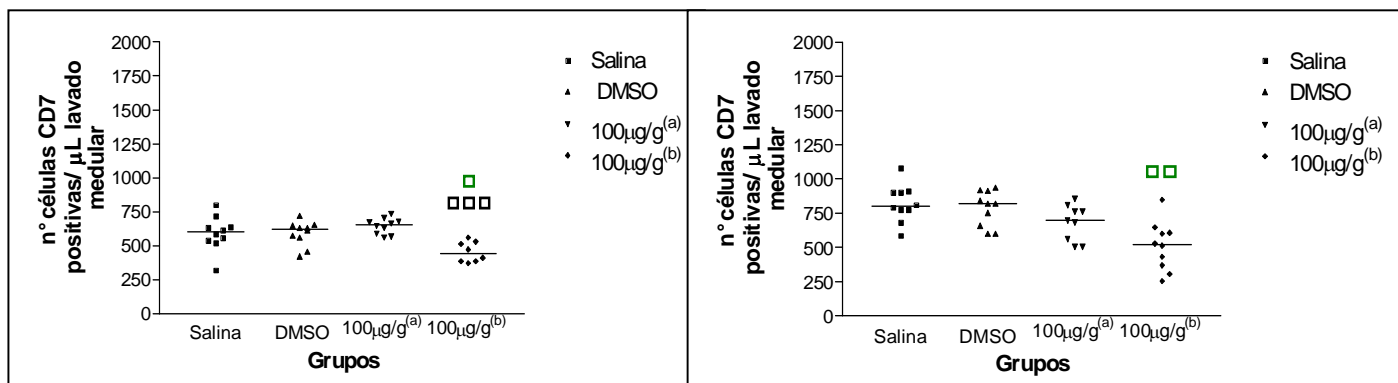


Fig. 32 – Número de células CD7 positivas no lavado medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,05$ em relação à Salina e ao DMSO, $\square\square\square$ $p < 0,001$ em relação à dose única de $100\mu\text{g/g}^{(a)}$, \square com ponto $p < 0,01$ em relação à Salina e ao DMSO. $100\mu\text{g/g}^{(a)}$ (dose única de $100\mu\text{g/g}$ de peso corpóreo) e $100\mu\text{g/g}^{(b)}$ (dose seriada de $100\mu\text{g/g}$ de peso corpóreo)

a)

b)

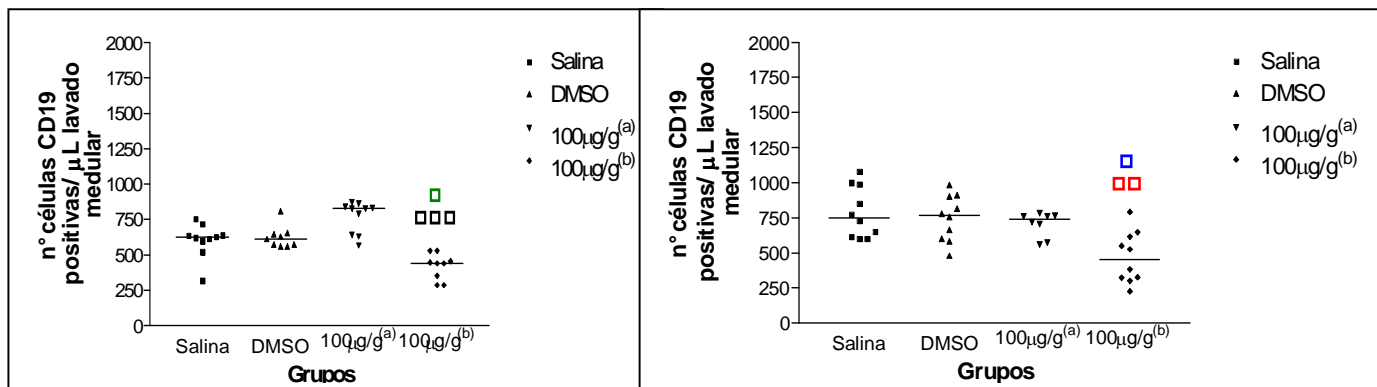


Fig. 33 – Número de células CD19 positivas no lavado medular de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas. \square $p < 0,05$ em relação à Salina e ao DMSO, $\square\square\square$ $p < 0,001$ em relação à dose de $100\mu\text{g/g}^{(a)}$, \square com ponto $p < 0,01$ em relação à Salina, \square $p < 0,05$ em relação ao DMSO.

$100\mu\text{g/g}^{(a)}$ (dose única de $100\mu\text{g/g}$ de peso corpóreo) e $100\mu\text{g/g}^{(b)}$ (dose seriada de $100\mu\text{g/g}$ de peso corpóreo)

a)

b)

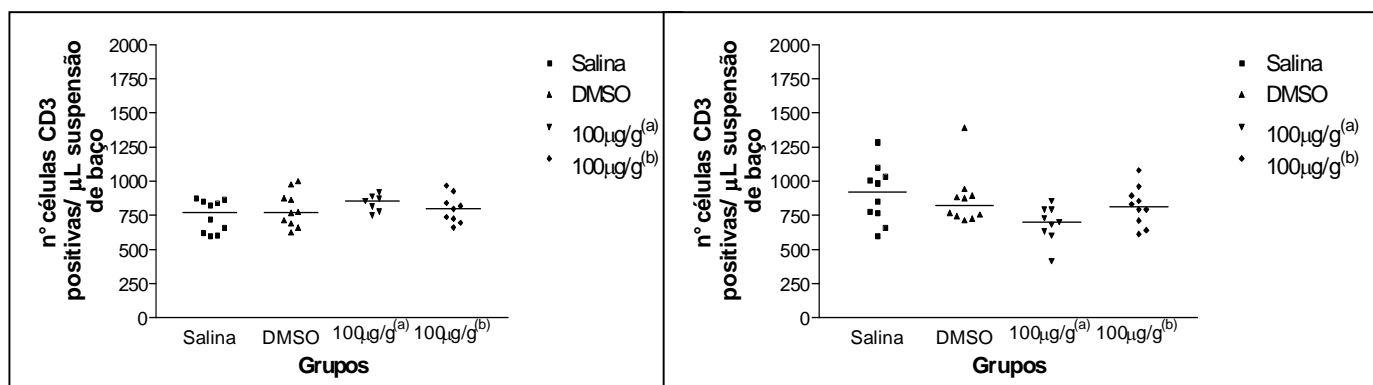


Fig. 34 – Número de células CD3 positivas no baço de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas.

$100\mu\text{g/g}^{(a)}$ (dose única de $100\mu\text{g/g}$ de peso corpóreo) e $100\mu\text{g/g}^{(b)}$ (dose seriada de $100\mu\text{g/g}$ de peso corpóreo)

a)

b)

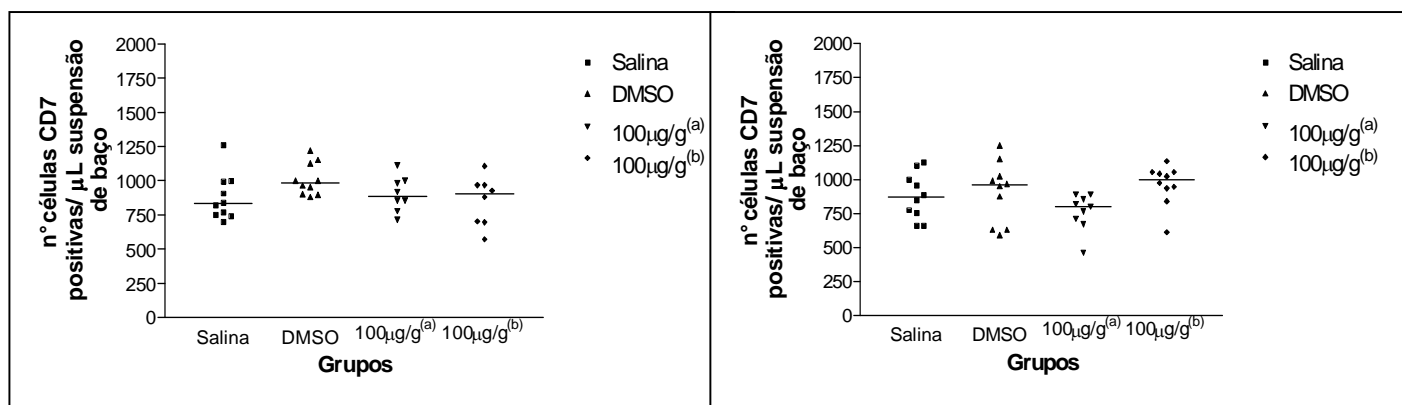


Fig. 35 – Número de células CD7 positivas no baço de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas.

$100\mu\text{g/g}^{(a)}$ (dose única de $100\mu\text{g/g}$ de peso corpóreo) e $100\mu\text{g/g}^{(b)}$ (dose seriada de $100\mu\text{g/g}$ de peso corpóreo)

a)

b)

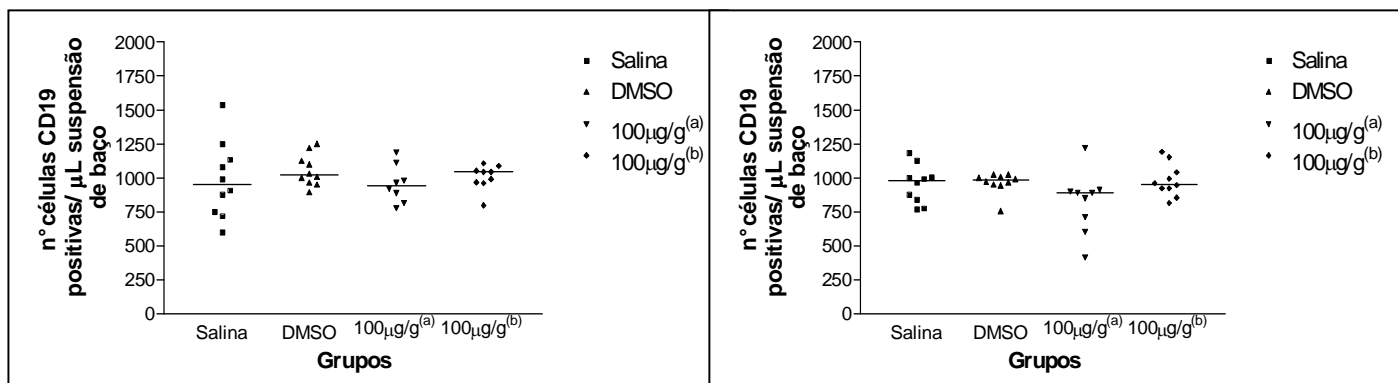


Fig. 36 – Número de células CD19 positivas no baço de camundongos tratados com grandisina após 7 dias do tratamento (a) e após 14 dias do tratamento (b). As barras representam as medianas.

100µg/g^(a) (dose única de 100µg/g de peso corpóreo) e 100µg/g^(b) (dose seriada de 100µg/g de peso corpóreo)

5.DISSCUSSÃO

Um dos interessantes usos etnofarmacológicos da *Virola surinamensis* é o tratamento da malária com componentes voláteis obtidos de suas folhas. As lignanas, grandisina e veraguensina, isoladas de extratos dos brotos desta planta, mostraram alta atividade tripanocida “in vitro” contra as formas tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*. Os dois compostos são ativos em concentrações tão baixas como 5 µg/mL (Lopes et al., 1998 e 2000; NIHEI et al., 2004).

Frente à possibilidade de utilizar a planta como medicamento, é importante investigar seus possíveis efeitos sobre o sistema hematopoético. A produção de células sanguíneas obedece a um controle complexo e estas células têm funções vitais, de forma que quaisquer alterações provocadas neste sistema devem ser consideradas antes da utilização como medicamento de princípios ativos isolados de plantas.

No presente estudo, investigamos inicialmente se a grandisina administrada em dose única induzia alterações nas células sanguíneas de camundongos BALB/C, após o sétimo e décimo quarto dia de sua administração. As doses de 25, 50 e 100µg/g de peso foram testadas, sendo que a dose de 100µg/g de peso induziu as alterações mais significativas nos parâmetros analisados.

Na tentativa de melhor compreender as alterações induzidas pela grandisina em dose única, foram realizados experimentos em dose seriada administrando a substância, por cinco dias consecutivos, na concentração de 100µg/g de peso corpóreo sendo as análises dos parâmetros hematológicos feitas após 7 e 14 dias do tratamento.

A concentração de 100µg/g de peso corpóreo, em dose única, reduziu o número de leucócitos totais no sangue periférico no sétimo e no décimo quarto dia após o tratamento (Fig. 1a e 1b). Esta alteração refletiu nos números absolutos de linfócitos (Fig. 2a e 2b) e neutrófilos que também diminuíram (Fig. 4a e 4b), além disso, houve redução do número

de monócitos 14 dias após a administração (Fig. 3b). A redução dos números de linfócitos, monócitos e neutrófilos do sangue periférico mostra que a grandisina, na dose de 100 µg/g de peso corpóreo, afeta a população de células no sangue periférico.

A redução do número de leucócitos do sangue periférico, após 7 dias do tratamento (Fig. 1a), foi confirmada quando a substância foi administrada por cinco dias consecutivos, causando também uma redução do número de linfócitos, monócitos e neutrófilos (Fig 16a, 17a e 18a), mostrando que a grandisina afeta a população de leucócitos (Fig. 15a). Houve uma diminuição, embora não significativa da população de leucócitos, linfócitos e monócitos (Fig. 15b, 16b e 17b) e redução significativa do número de neutrófilos, após 14 dias do tratamento em dose seriada (Fig 18b).

Para melhor visualizar as alterações induzidas pela grandisina, os leucócitos foram reunidos em 2 grupos: células mononucleares e polimorfonucleares, sendo que a administração da substância nas doses única e seriada de 100 µg/g de peso corpóreo provocou uma redução estatisticamente significativa dos dois grupos de células, após 7 e 14 dias do tratamento (Fig. 5a, 5b, 6a, 6b, 19a, 20a e 20b), embora a redução do número de células mononucleares após 14 dias de tratamento em dose seriada não tenha sido significativa (Fig. 19b).

Não observamos alterações nos números absolutos de eosinófilos e basófilos, bem como alterações morfológicas nas extensões sanguíneas coradas do sangue periférico, nas doses única e seriada, mostrando que a substância não altera a produção destas células.

Em relação à série vermelha, não observamos alterações em seu número, bem como na morfologia, ao analisar as extensões sanguíneas coradas, nas doses e concentrações avaliadas.

O número de plaquetas aumentou após 14 dias do tratamento com grandisina na concentração de 100µg/g de peso corpóreo administrada em dose única, embora a significância tenha sido em relação à dose de 25µg/g de peso corpóreo (Fig. 7b). Na dose seriada, inversamente ocorreu uma redução desta população, após 14 dias do tratamento (Fig. 21b). Isto nos leva a pensar que estas alterações não estão relacionadas à grandisina e sim às variações biológicas no grupo de animais.

Na análise da celularidade medular, após 7 dias do tratamento com dose única, observamos aumento não significativo da celularidade na dose de 100µg/g de peso corpóreo (Fig. 8a). Este aumento foi significativo, na mesma dose após 14 dias do tratamento (Fig. 8b). O aumento da celularidade associado à redução do número de leucócitos do sangue periférico sugere que a grandisina afeta a produção e/ou distribuição dos leucócitos. Quando analisamos as alterações do número de células nucleadas do lavado medular em amostras de experimentos realizados em dose seriada, constatamos uma redução da celularidade medular, após 7 e 14 dias do tratamento (Fig. 22a e 22b). Essa redução provavelmente se deve ao fato da grandisina causar uma depressão da medula óssea com conseqüente diminuição do número de células na medula e no sangue periférico.

Não foi observado qualquer alteração na celularidade esplênica, após 7 e 14 dias do tratamento, nos experimentos realizados em dose única e seriada (Fig. 9a, 9b, 23a e 23b). O baço é um importante órgão hematopoético para camundongos, mas sua função parece não ser afetada pela administração da grandisina.

Na contagem diferencial realizada na amostras de medula óssea, nos experimentos de dose única com 100µg/g de peso corpóreo, observamos aumento significativo do número de células mononucleares em evolução, após 7 e 14 dias do tratamento (Fig. 10a e

10b), tanto da linhagem linfocítica (Fig. 11a e 11b) como da linhagem monocítica (Fig. 12a e 12b). Embora tenha ocorrido um aumento na produção das células mononucleares em evolução, pudemos notar que o número de linfócitos (Fig 2a e 2b) e monócitos (Fig 3b) no sangue periférico continuou reduzido, o que pode indicar uma parada na maturação dessas células na medula óssea, com conseqüente diminuição do número de células circulantes. Nos experimentos de dose seriada houve uma redução do número de células mononucleares em evolução, após 7 e 14 dias do tratamento (Fig. 24a e 24b) e essa redução foi observada tanto na linhagem linfocítica (Fig. 25a e 25b) quanto monocítica (Fig 26a e 26b). Houve também uma redução estatisticamente significativa das células polimorfonucleares em evolução após 7 e 14 dias do tratamento (Fig. 27a e 27b), principalmente das células em evolução neutrofílica (Fig. 28a e 28b), o que contribui para a hipótese de depressão causada na medula óssea. Foi observado ainda redução do número de células em evolução eosinofílica (Fig. 30b), após 14 dias do tratamento.

Não houve alteração no número de células em evolução eritrocítica na medula óssea, após 7 e 14 dias do tratamento com dose única. Na dose seriada, notamos uma tendência de queda destas células, após 7 dias do tratamento (Fig. 29a) e uma redução significativa após 14 dias do tratamento (Fig. 29b), mostrando que a substância quando administrada na concentração de 100 μ g/g de peso corpóreo por cinco dias consecutivos, provoca alterações mais significativas que não são observadas nos experimentos de dose única.

Para melhor caracterizar as alterações provocadas na população de células mononucleares pela administração de grandisina na dose única e seriada de 100 μ g/g de peso corpóreo, foi realizada análise imunocitoquímica para fenotipagem da população de linfócitos da medula óssea e do baço, sendo pesquisados os antígenos de superfície CD3,

CD7 e CD19 que caracterizam a população de linfócitos T (totais), T imaturos e B, respectivamente.

A observação dos sedimentos medulares mostrou que no sétimo dia após a administração de grandisina na dose seriada houve uma redução dos números de linfócitos T totais, linfócitos T imaturos e linfócitos B, o que não ocorreu na administração da grandisina na dose única de 100µg/g de peso corpóreo (Fig. 31a, 32a e 33a). Após o décimo quarto dia da injeção de grandisina houve uma diminuição não significativa nas três populações de linfócitos quando a grandisina foi administrada em dose única de 100µg/g de peso corpóreo (Fig. 31b, 32b e 33b). Esta redução foi estatisticamente significativa quando a grandisina foi administrada em dose seriada de 100µg/g de peso corpóreo (Fig. 31b, 32b e 33b), mostrando mais uma vez que a grandisina administrada por cinco dias consecutivos provoca alterações na produção das células mononucleares em evolução, em especial da população de linfócitos.

Essas populações de linfócitos não se mostraram alteradas nos sedimentos do baço em dose única e seriada, após 7 e 14 dias do tratamento, o que contribui para a hipótese de que a produção de células sanguíneas no baço não está comprometida.

Nickell e colaboradores (1993) demonstraram uma importante função protetora de linfócitos T na imunidade contra o *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da Doença de Chagas.

Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são fundamentais no estabelecimento da resistência do hospedeiro ao *T. cruzi*. Camundongos deficientes de T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, quando infectados pelo parasita revelam uma susceptibilidade aumentada à infecção (RUSSO et al., 1988; TARLETON, 1990; ROTTENBERG et al., 1995).

A literatura aponta que as células T CD4⁺ aparentemente são mais importantes na proteção contra a infecção por *Trypanosoma cruzi* na fase aguda da infecção, devido a produção de citocinas, como IFN- γ , e pelo estímulo de produção de anticorpos líticos que auxiliam na destruição dos parasitas intra e extracelulares. As células T CD8⁺ parecem ter participação mais importante na fase crônica da infecção e na gênese das lesões, estando associadas a fenômenos de citólise, fibrose tecidual e, portanto, às manifestações cardíacas e intestinais da doença (LANA; TAFURI, 2005).

A resposta imune gerada na fase aguda é responsável pela redução da parasitemia, porém não é capaz de eliminar totalmente o parasita do organismo do hospedeiro (BRENER et al., 2000)

A invasão de diversos tipos celulares, em especial de macrófagos, por *T. cruzi* inicia uma série de interações moleculares que mobilizam a resposta imune inata do hospedeiro (REED, 1995; ALIBERTI et al., 1996).

A destruição de células hospedeiras infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* por linfócitos T citotóxicos (CD8) parece constituir um mecanismo de defesa efetivo porque a replicação do parasito tem limitada infectividade (LEY et al., 1988).

As alterações induzidas pela grandisina poderiam ser benéficas, pois reduziu o número de monócitos, que são as células preferencialmente invadidas pelo *T. cruzi*. Entretanto, o número de linfócitos também diminuiu com a administração de grandisina, o que pode comprometer a defesa contra o protozoário. Assim, antes da utilização terapêutica da grandisina mais estudos precisam ser realizados, especialmente no sentido de caracterizar os efeitos sobre as sub-populações de linfócitos T.

6. CONCLUSÕES

A grandisina em dose única na concentração de 100µg/g de peso corporal:

- Afeta a distribuição e/ou produção dos leucócitos, em camundongos, pois ocorre redução dos números de leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos no sangue periférico, aumento das células nucleadas da medula óssea e aumento do número de células mononucleares em evolução na medula óssea.

A grandisina em dose seriada, por cinco dias consecutivos, na concentração de 100µg/g de peso corporal:

- Afeta de maneira mais marcada a distribuição e/ou produção, pois diminui o número de leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos no sangue periférico, diminui o número de células nucleadas da medula óssea e reduz o número de células mononucleares, polimorfonucleares e células eritrocíticas em evolução na medula óssea;
- Reduz as populações de linfócitos T totais, T imaturos e B, na medula óssea.

A grandisina não afeta a produção de células sanguíneas no baço nas doses e concentrações utilizadas.

Concluindo:

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a dose de 100µg/g de peso corpóreo, tanto em dose única como seriada, causa importantes alterações nas células sanguíneas indicando que, para o uso terapêutico, doses inferiores a estas devem ser avaliadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro. Elsevier, cap.1, p. 3-16; cap.2, p. 17-40; cap. 13, p. 307-326, 2005.

ABBOUD, C.N.; LICHTMAN, M.A. Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment. In: LICHTMAN, M.A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, V.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J.T. **Williams-Hematology**. 7th ed. New York. Mc Graw-Hall Medical, cap.4, p.35-72, 2006.

ABE, F.; NAGAFUJI, S.; YAMAUCHI, T.; OKABE, H.; MAKI, J.; HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGUILAR, A.; ESTRADA, M.J.; CHILPA, R.R. Tripanocidal constituentes in plants I. evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.25, n.9, p.1188-1191, 2002.

ABKOWITZ, J. L.; GOLINELLI, D.; HARRISON, D. E.; GUTTORP, P. In vivo kinetics of murine hematopoietic stem cells. **Blood**, New York, v. 96, n. 10, p. 3399-3405, 2000.

AKASHI, K. Lineage promiscuity and plasticity in hematopoietic development. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, Boston, v. 1044, p. 125-131, 2005.

AKASHI, K.; Traver, D.; Miyamoto, T.; Weissman, I. L. A clonogenic common myeloid progenitor that give rise to all myeloid lineages. **Nature**, London, v. 404, n. 6774, p. 193 – 197, 2000.

ALEXANDER, W. S. Cytokines in hematopoiesis. **Intern. Rev. Immunol**, New York, v.16, p. 651 – 682, 1998.

ALIBERTI, J.C.S.; CARDOSO, M.A.G.; MARTINS, G.A.; GAZZINELLI, R.T.; VIEIRA, L.Q.; SILVA, J.S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection and Immunity**. Bethesda, p. 1961-1967, 1996.

ANSELMINI, A.; MOLEIRO, F. Chagas' disease and chagasic cardiomyopathies. **Arch. Inst. Cardiol. Mex.**, México, v. 42, n. 4, p. 622-628, 1972.

ARAI, F.; HIAO, A.; OHMURA, M.; SATO, H.; MATSUOKA, S.; TAKUBO, K.; ITO, K.; KOH, G. Y.; SUDA, T. Tie2/ angiopoietin – 1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. **Cell**, Tokyo, v. 118, n. 2, p. 149-161, 2004.

ARAI, F.; HIAO, A.; SUDA, T. Regulation of hematopoietic stem cells by the niche. **Trends Cardiovasc. Med.**, Tokyo, v. 15, n. 2, p. 75-79, 2005.

BAIN, B. J. **Células sanguíneas: consulta rápida**. 2ª ed., Porto Alegre, Artmed, 1998.

BARATA, L.E.S.; BAKER, P.M.; GOTTLIEB, O.R.; RUVEDA, E.A. Neolignans of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, Oxford, v.17, p. 783-786, 1978.

BARATA, L.E.S.; SANTOS, L.S.; FERRI, P.H.; PHILLIPSON, J.D.; PAINE, A.; CROFT, S.L. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, p. 589-595, 2000.

BRENER, Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Adv. Parasitol.**, London, v. 18, p. 247-292, 1980.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, 2ª ed., **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, p. 55-60, 2000.

BROUDY, V. C. Stem Cell Factor and Hematopoiesis. **Blood**, New York, v. 90, n.4, p. 1345 – 1364, 1997.

COATES, C. A. Routine testing in hematology. In: RODAK, B. F. **Diagnostic hematology**. Philadelphia: W. B., Saunders, cap.12, p.127-144, 1995.

COURA, J. R. Tripanosomose, Doença de Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz**, Rio de Janeiro, p. 30-33, 2003.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo. Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

DA SILVA FILHO, A.A.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M.L.A.; EBERLIN, M.N.; TOMAZELA, D.M.; BASTOS, J.K. Tetrahydrofuran lignans from nectandra megapotamica with Trypanocidal activity. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.67, p. 42-45, 2004.

DEISS, A. Destrução de eritrócitos. In: LEE, G. R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. **Wintrobe. Hematologia Clínica**. 1ª ed. São Paulo, Manole, v. I, cap. 8, p. 208-238, 1998.

DEMETRI, G. D.; GRIFFIN, J. D. Granulocyte Colony – Stimulating factor and its receptor. **Blood**, New York, v. 78, n.11, p. 2791 – 2808, 1991.

DUTRA, W.O.; MARTINS-FILHO, O.A.; CANCADO, J.R.; PINTO-DIAS, J.C.; BRENER, Z.; FREEMAN JUNIOR, G.L.; COLLEY, D.G.; GAZZINELLE, G.; PARRA, J.C. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. **Int. Immunol.**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 499-506, 1994.

EVANS, T. Developmental biology of hematopoiesis. **Hematol. Oncol. Clin. N. Am.**, Philadelphia, v.11, n.6, p. 1115-1147, 1997.

FALCÃO, R.P.; CALADO, R.T. Heterogeneidade das células do sangue. Órgãos hematopoéticos e linfopoéticos. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia. Fundamentos e Prática**, São Paulo, Atheneu, cap. 1, p. 3-13, 2001.

FILHO, A. A. F.; LUQUETTI, A. O.; PRATA, A.; RASSI, A.; GONTIJO, E. D.; FERREIRA, H. DE O.; CANÇARDO, J. R.; COURA, J. R.; ANDRADE, S. G.; MACEDO, V.; NETO, V. A.; DE OLIVEIRA, JR. W.; BRENER, Z. Etiological treatment for Chagas disease. **Parasitol. Today**, Amsterdam, v. 13, n.4, p. 127-128, 1997.

FILHO, C.V.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v.21, n.1, p. 99-105, 1998.

FORSBERG, E. C.; PROHASKA, S. S.; KATZMAN, S.; HEFFINER, G. C.; STUART, J. M.; WEISSMAN, I. L. Differential expression of novel potential regulators in hematopoietic stem cells. **PLoS Genetics**, California, v. 1, n. 3, p. 281-292, 2005.

FREDRICKSON, T.N.; HARRIS, A.W. **Atlas of mouse hematopathology**. Amsterdam, Harwood Academic, cap. 6, p. 42-44, 2000.

GALLI, S. J. New concepts about the mast cell. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 328, p. 257-65, 1993.

GALLI, S. J.; ZSEBO, K. M.; GEISLER, E. N. The kit ligand: stem cell factor. **Adv. Immunol**, New York, v. 55, p. 1-96, 1994.

GAY, B.G.; PARKER, K. Understanding the complete blood count with differential. **J. Perianesth. Nurs.**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 96-114, 2003.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S. et al. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide mediated mechanism inhabitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur. J. Immunol**, Weinheim, v. 22, n.10, p. 2501-2506, 1992.

GUHL, F.; JARAMILLO, C.; CARRANZA, J.C.; VALLEJO, G.A. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. **Arch. Med. Res.**, México, v. 33, n. 4, p. 362-370, 2002.

HANNET, I.; ERKELLER-YUKSEL, F.; LYDYARD, P.; DENEYS, V.; DEBRUYERE, M. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. **Immunol Today**, Amsterdam, v. 13, n. 6, p. 215, 21, 1992.

HAYLOCK, D. N.; NILSSON, S. K. Stem cell regulation by the hematopoietic stem cell niche. **Cell Cycle**, Melbourne, v. 4, n. 10, p. 48-50, 2005.

HEISSIG, B.; HATTORI, K.; DIAS, S.; FRIEDRICH, M.; FERRIS, B.; HACKETT, N. R.; CRYSTAL, R. G.; BESMER, P.; LYDEN, D.; MOORE, M. A.; WERB, Z.; RAFII, S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. **Cell**, New York, v. 109, n. 5, p. 625-637, 2002.

HEISSIG, B.; OHKI, Y.; SATO, Y.; RAFII, S.; WERB, Z.; HATTORI, K. A role for niches in hematopoietic cell development. **Hematology**, Tokyo, v. 10, n. 3, p. 247-253, 2005.

HUANG, H.; AUERBACH, R. Identification and characterization of hematopoietic stem cells from the yolk sac of the early mouse embryo. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, Washington, v. 90, p. 10110-10114, 1993.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia**. O sistema imune na saúde e na doença. 5ª ed., Porto Alegre, Artmed, cap. 1, p. 21-54, 2002.

KELLER, G.; SNODGRASS, R. Life span of multipotential hematopoietic stem cells in vivo. **J. Exp. Med**, New York, v.171, p.1407-1418, 1990.

LAI, L.; ALAVERDI, N.; MALTAIS, L.; MORSE, H.C. Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. **J. Immun.**, Bethesda, v.160, n.8, p. 3861-3868, 1998.

LANA, M.; TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. 11ª ed. São Paulo, Atheneu, cap.11, p. 85-108, 2005.

LERNER, C.; HARRISON, D.E. 5-Fluorouracil spares hematopoietic stem cells responsible for long term repopulation. **Exp. Hematol**, Copenhagen, v. 18, p.114-118, 1990.

LEY, V.; ANDREWS, N.W.; ROBBINS, E.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **J. Exp. Med.**, New York, v. 168, n.2, p. 649-659, 1988.

LOPES, N.P.; CHICARO, P.; KATO, M.J.; ALBUQUERQUE, S.; YOSHIDA, M. Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Med**, Stuttgart, v.64, p.667-669, 1998.

LOPES, N.P.; KATO, M.J.; DE A. ANDRADE, E.H.; MAIA, J.G.S.; YOSHIDA, M.; PLANCHART, A.R.; KATZIN, A.M. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) warb. by waiãpi amazon Indians. **J. Etnopharmacol**, Lausanne, v.67, p. 313-319, 1999.

LOPES, N. P.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M. J.; YOSHIDA, M. BR Patent 9.903.472-7, 2000.

LOWELL, C. Fundamentos da biologia das células sanguíneas. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLOW, T. G. **Imunologia Médica**. 9ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, cap. 1, p. 7 – 18, 2000.

MAEDEL, L. B. Examination of the peripheral blood smears. In: RODAK, B. F. **Diagnostic hematology**. Philadelphia: W. B. Saunders, cap.13, p.145-157, 1995.

MARINHO, C.R.; DIMPERIO LIMA, M. R.; GRISOTTO, M.G.; ALVAREZ, J.M. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 67, n.1, p. 308-318, 1999.

MARLEY, S.B.; LEWIS, J.L.; GORDON, M.Y. Progenitor cells divide symmetrically to generate new colony-forming cells and clonal heterogeneity. **Brit. J. Haematol.**, Oxford, v. 121, p. 643-648, 2003.

MARSHALL, C. J.; THRASHER, A. J. The embryonic origins of human haematopoiesis. **Brit. J. Haematol**, Oxford, v.112, p. 838-850, 2001.

METCALF, D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? **Blood**, New York, v.82, n.12, p.3515-3523, 1993.

METCALF, D. Hematopoietic stem cells: old and new. **Biomed Pharmacother**, New York, v.55, p. 75-78, 2001.

MIYAKE, T.; KUNG, C.K.H.; GOLDWASSER, E. Purification of human erythropoietin. **J. Biol. Chem**, Baltimore, v. 252, n.15, p. 5558-5564, 1977.

MORRISON, S. J.; UCHIDA, N.; WEISSMAN, I. L. The biology of hematopoietic stem cells. **Annu Rev. Cell. Dev. Biol.**, California, v. 11, p. 35-71, 1995.

NEVES, D.P. **Parasitologia dinâmica**. 2ª ed., São Paulo, Atheneu, cap.19, p. 117-138, 2006.

NICKELL, S.P.; STRYKER, G.A.; AREVALO, C. Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8⁺, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 150, n. 4, p. 1446-1457, 1993.

NIHEI, K.I.; KONNO, K.; BERNARDES, L.S.C.; LOPES, N.P., ALBUQUERQUE, S.; CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; MARTINS, R.C.C., KATO, M.J. Synthesis of trypanocidal tetrahydrofuran lignans, **Arkivoc**, USA, p. 112-126, 2004.

OGAWA, M. C. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. **Blood**, New York, v. 81, n. 11, p. 2844-53, 1993.

OPPENHEIM, J. J.; RUSCETTI, F. W.; FALTYNEK, C. Cytokines. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLOW, T. G. **Basic and clinical Immunology**: 8th ed. New Jersey: Prentice Hall Int. Inc, cap. 9, p. 105-123, 1991.

OSWALD, I.P.; WYNN, T.A.; SHER, A.; JAMES, S.L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor α required as a co stimulatory factor for interferon- γ -induced activation. **Proc. Natl. Acad. Sci**, Washington, v. 89, n.18, p. 8676-8680, 1992.

PEREIRA, V.R.A.; DE LORENA, V.M.B.; DA SILVA, A.P.G.; NAKAZAWA, M.; DA SILVA, E.D.; FERREIRA, A.G.P.; MONTARROYOS, U.; COUTINHO, E.M.; GOMES, Y.M. Avaliação hematológica e histopatológica de camundongos BALB/c e C57BL/6 expostos aos antígenos recombinantes cytoplasmic repetitive antigen e flagellar repetitive antigen de *Trypanosoma cruzi* **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 6, p. 739-742, 2003.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect. Dis.**, New York, v. 1, n.2, p. 92-100, 2001.

REED, S.G. Cytokine control of the macrophage parasites *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. In: **Molecular approaches to Parasitology**. New York, Wiley-Liss, Inc, p.443-445, 1995.

RICHARDS, M.; LIU, F.; IWASAKI, H.; AKASHI, K.; LINK, D.C. Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway, **Blood**, New York, v.102, n.10, p.3562-3568, 2003.

RODRIGUES, E.R. Estudos pré-clínicos de possíveis efeitos adversos da cubebina. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. 2002. 126p. **Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas**

ROTTENBERG, M.E.; CASTANOS-VELES, E.; DE MESQUITA, R.; LAGUARDIA, O.G.; BIBERFIELD, P.; ORN, A. Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v.26, n.12, p. 3203-3213, 1996.

ROTTENBERG, M.E.; SPORRONG, L.; PERSSON, I.; WIGZELL, H.; ORN, A. Cytokine gene expression during infection of mice lacking CD4 and/or CD8 with *Trypanosoma cruzi*. **Scand. J. Immunol.**, Oslo, v. 41, n. 2, p. 164-170, 1995.

RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; MINOPRIO, P.; COUTINHO, A; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi*- infected mice after inactivation of helper T cells. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.**, Amsterdam, v. 139, n. 3, p. 225-236, 1988.

SANDERSON, C. J. Interleukin-5, eosinophils and disease. **Blood**, New York, v. 79, n. 12, p. 3101-9, 1992.

SATHLER-AVELAR, R.; LEMOS, E.M.; REIS, D.D.; MEDRANO-MERCADO, N.; ARAUJO-JORGE, T.C.; ANTAS, P.R.; CORREA-OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ELOI-SANTOS, S.M.; FAVATO, D.; MARTINS-FILHO, O.A. Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. **Scand. J. Immunol.**, Oslo, v. 58, n.6, p. 655-663, 2003.

SCHWARZMEIER, J. D. The role of cytokines in haematopoiesis, **Eur. J. Haematol**, Copenhagen, v. 57 (suppl), p. 69-74, 1996.

SOCOLOVSKY, M.; CONSTANTINESCU, S.N.; BERGELSON, S.; SIROTKIN, A.; LODISH, H.F. Cytokines in hematopoiesis: specificity and redundancy in receptor function, **Adv. Protein. Chem.**, New York, v. 52, p. 141-198, 1998.

SUZUKI, H.; KATAYAMA, N.; IKWTA, Y.; MUKAI, K.; FUJIEDA, A.; MITANI, H. et al. Activities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on monocytes. **Am. J. Hematol.**, New York, v. 75, p. 179-189, 2004.

TARLETON, R.L. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reserves vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 144, n. 2, p. 717-724, 1990.

TARLETON, R.L. Tumor necrosis factor (cachetin) production during experimental Chagas' disease. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 73, n.2, p. 186-190, 1988.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, **Rad. Res**, New York, v.14, p.213-222, 1961.

VEIBY, O.P.; MIKHAIL, A.A.; SNODGRASS, H.R. Growth factors and hematopoietic stem cells. **Hematol. Oncol. Clin. North Am**, Philadelphia, v.11, n.6, p.1173-1184, 1997.

VELDERS, G. A.; FIBBE, W. E. Involvement of proteases in cytokine – induced hematopoietic stem cell mobilization. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 1044, p. 60-69, 2005.

YOSHIDA, M. Biologically active neolignans from Amazonian trees. In: Seid/, P.R.; GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C. (Eds). **Chemistry of the Amazon**. American Chemical Society, Washington, 1995.

ZAGO, M. A. Granulócitos: produção, dinâmica e função. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia. Fundamentos e Prática**, São Paulo, Atheneu, cap. 4, p. 33-43, 2001.

ZHANG, F.; GAGNON, R. F.; RICHARDS, G. K.; BROX, A. G. Anemia of chronic renal failure: characterization in the mouse and correction with human recombinant erythropoietin, **Nephron**, Basel, v. 72, n.3/4, p. 654-661, 1996.

ZHANG, J.; LI, L. BMP signaling and stem cell regulation. **Developmental Biology**, Kansas City, v. 284, n. 1, p. 1-11, 2005.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto


Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 04.1.778.53.8), intitulado: "Estudo das Possíveis Alterações Hematológicas Induzidas pela Grandisina em Camundongos", de autoria de **Ana Maria de Souza**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 16.11.2004.

Ribeirão Preto, 22 de novembro de 2004


Presidente da CEUA
Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior


Secretária da CEUA
Maria Angélica S. Depiro

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Número global de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos de camundongos tratados com dose única de grandisina após 7 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	25µg/g	50µg/g	100µg/g
Leucócitos (n°/ µL sangue)	-	3550	-	2850	2700
	4950	3650	2850	3050	2600
(n=8-10)	5300	2950	2900	3300	2200
	5850	3750	-	2800	2550
	3650	2900	3500	2200	2850
	4350	4500	2900	2650	2400
	2100	3200	2650	5050	2550
	2800	4650	3350	3300	2700
	3150	3650	3950	3850	2800
	2350	4400	4150	-	2150
Mediana	3650	3650	3125	3050	2575
Neutrófilos (n°/ µL sangue)	-	568	-	484,5	513
	1039,5	693,5	456	518,5	390
	1325	590	493	627	308
(n=8-10)	1111,5	637,5	-	476	459
	766,5	609	735	506	370,5
	913,5	945	812	636	360
	462	704	689	1000	408
	1080	930	703,5	660	432
	787,5	841	790	885,5	504
	446,5	748	705,5	-	387
Mediana	913,5	698,75	704,5	627	399
Linfócitos (n°/ µL sangue)	-	2840	-	2308,5	2133
	3811,5	2810,5	2308,5	2440	2132
	3869	2301	2320	2607	1782
(n=8-10)	4563	2962,5	-	2240	1963,5
	2774	2175	2660	1650	2337
	3306	3420	2059	1961	1920
	1596	2432	1881,5	3939	2040
	1736	3673,5	2546	2541	2214
	2331	2737	3041,5	2926	2156
	1856,5	3564	3320	-	1720
Mediana	2774	2825,25	2433	2440	2086
Monócitos (n°/ µL sangue)	-	71	-	28,5	27
	49,5	73	57	61	26
	53	29,5	29	33	88
(n=8-10)	117	37,5	-	28	76,5
	73	29	35	22	85,5
	43,5	45	29	26,5	96
	21	32	53	61	25,5
	28	46,5	67	66	27
	0	36	79	38,5	112
	23,5	44	83	-	21,5
Mediana	43,5	40,75	55	33	51,75

APÊNDICE 2 – Contagem de células mononucleares e polimorfonucleares presentes no sangue periférico de camundongos tratados com dose única de grandisina após 7 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	25µg/g	50µg/g	100µg/g
Céls. Mononucleares (n°/ µL sangue)	-	2911	-	2337	2160
	3861	2883,5	2365,5	2501	2158
	3922	2330,5	2349	2640	1870
(n=8-10)	4680	3000	-	2268	2040
	2847	2204	2695	1672	2422
	3349,5	3465	2088	1987,5	2016
	1617	2464	1934,5	4000	2065,5
	1764	3720	2613	2607	2241
	2331	2773	3120,5	2964,5	2268
	1880	3608	3403	-	1741,5
Mediana	2847	2897,25	2489,25	2501	2111,75
Céls. Polimorfonucleares (n°/ µL sangue)	-	639	-	513	540
	1089	766,5	484,5	549	442
	1378	619,5	551	660	330
(n=8-10)	1170	750	-	532	510
	803	696	805	528	427,5
	1000,5	1035	812	662,5	384
	483	736	715,5	1050	484,5
	1036	930	737	693	459
	819	877	829,5	885,5	532
	470	792	747	-	408,5
Mediana	1000,5	758,25	742	660	450,5

APÊNDICE 3 – Contagem de eritrócitos, eosinófilos e plaquetas de camundongos tratados com dose única de grandisina após 7 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	25µg/g	50µg/g	100µg/g	
Eritrócitos (n° x 10 ⁶ / µL sangue) (n=8-10)	-	7,1	-	6,8	8,1	
	6	6,5	7	6,5	6,4	
	6,3	5,4	8,1	8,1	6,8	
	6,7	10	-	10,9	6,4	
	12,9	8,6	6,4	5,5	7,4	
	8	6,4	5,9	5,7	6,9	
	6,7	7,6	9,1	10	7,4	
	6,2	6	11,1	8,6	6,9	
	5,6	6,4	16	8,1	8,1	
	8,5	9	8	-	7,4	
	Mediana	6,7	6,8	8,05	8,1	7,15
	Eosinófilos (n°/ µL sangue) (n=8-10)	-	71	-	28,5	27
		49,5	73	28,5	30,5	52
53		29,5	58	33	22	
58,5		112,5	-	56	51	
36,5		87	70	22	57	
87		90	0	26,5	24	
21		32	26,5	50	76,5	
28		0	33,5	33	27	
31,5		36	39,5	0	28	
23,5		44	41,5	-	21,5	
Mediana		36,5	57,5	36,5	30,5	27,5
Plaquetas (n° x 10 ³ / µL sangue) (n=8-10)		-	1000	-	1200	1010
		1030	910	1110	1170	990
	1180	790	880	820	890	
	510	920	-	870	740	
	690	880	790	860	770	
	930	920	1000	840	1000	
	800	850	930	780	750	
	850	680	910	910	790	
	690	850	810	840	780	
	1020	1030	930	-	830	
	Mediana	850	895	920	860	810

APÊNDICE 4 – Contagem de células nucleadas presentes nos sedimentos medulares e no baço de camundongos tratados com dose única de grandisina após 7 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	25µg/g	50µg/g	100µg/g	
Cel. medular (n° x 10 ³ / µL lavado medular) (n=8-10)	-	8,2	-	3,7	8,3	
	5,3	4	4,2	6,6	9,7	
	5,8	3,8	8,7	8,4	8,8	
	8,5	7,6	-	8	9,2	
	7,5	7,5	6	8,2	7,1	
	7,8	5,5	8,2	9,7	9,2	
	7,9	7,8	7,8	8,9	7	
	9,1	7,5	7,1	9,5	8,4	
	7,9	7,5	10,6	6,9	8	
	7,3	8,2	10,8	-	9,6	
	Mediana	7,8	7,5	8	8,2	8,6
	Cel. esplênica (n° x 10 ³ / µL suspensão de baço) (n=8-10)	-	8,8	-	10	10,2
		13,9	8,1	10	10,3	10,9
10,2		9,8	12	13	12,2	
13,4		12,2	-	10,2	11,1	
11,3		11,3	7,3	9,2	13,1	
11,7		9,2	8,4	9	11,1	
14,2		8,7	10	13	13,2	
8,3		13,8	13	13	10,7	
13,2		8	14	12	15,9	
11		14,7	10	-	11,5	
Mediana		11,7	9,5	10	10,3	11,3

APÊNDICE 5 – Contagem de células mononucleares e polimorfonucleares em evolução presentes nos sedimentos medulares de camundongos tratados com dose única de grandisina após 7 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	25µg/g	50µg/g	100µg/g	
Céls. Mononucleares em evolução (n°/ µL lavado medular) (n=8-10)	-	2952	-	1517	4233	
	1537	1080	1554	2640	5723	
	2030	1216	1566	2772	3872	
	2380	2888	-	3520	5152	
	3150	2775	1620	3444	3053	
	2730	1980	2378	3007	4692	
	2133	2964	4212	3204	3290	
	3003	2850	3479	3895	3276	
	2844	2925	5088	3450	3600	
	3285	3772	4536	-	6048	
	Mediana	2730	2869	2928,5	3204	4052,5
	Céls. Polimorfonucleares em evolução (n°/ µL lavado medular) (n=8-10)	-	5248	-	2183	4067
		3763	2920	2646	3960	3977
3770		2584	7134	5628	4928	
6120		4712	-	4480	4048	
4350		4725	4380	4756	4047	
5070		3410	5822	6693	4508	
5767		4836	3588	5696	3710	
6097		4650	3621	5605	5124	
5056		4575	5512	3450	4400	
4015		4428	6264	-	3552	
Mediana		5056	4612,5	4946	4756	4057,5

APÊNDICE 6 – Contagem de células em evolução linfocítica, monocítica, neutrofílica, eosinofílica e eritrocítica presentes nos sedimentos medulares de camundongos tratados com dose única de grandisina após 7 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	25µg/g	50µg/g	100µg/g
Cels. Evol.	-	2460	-	1295	3735
Linfocítica	1378	880	1302	2310	4850
(n°/ µL lavado medular)	1740	950	1131	2436	3344
	2125	2584	-	3040	4232
(n=8-10)	2850	2550	1380	3034	2627
	2340	1760	2132	2619	4048
	1817	2652	3744	2848	2870
	2548	2250	3053	3610	2856
	2686	2550	4452	3105	3200
	2920	3362	4320	-	5088
Mediana	2340	2505	2592,5	2848	3539,5
Cels. Evol.	-	492	-	222	498
Monocítica (n°/ µL lavado medular)	159	200	252	330	873
	290	266	435	336	528
	255	304	-	480	920
(n=8-10)	300	225	240	410	426
	390	220	246	388	644
	316	312	468	356	420
	455	600	426	285	420
	158	375	636	345	400
	365	410	216	-	960
Mediana	300	308	339	345	513
Cels. Evol.	-	3854	-	1517	2573
Neutrofílica (n°/ µL lavado medular)	2491	1960	2310	3102	2813
	2726	1634	4785	4200	3784
	4845	3420	-	3280	3312
(n=8-10)	3225	3300	3060	3444	3479
	3822	2475	4592	4850	3680
	3318	3822	2418	4005	2450
	4368	3825	3053	4275	3612
	3081	3900	4664	2070	2400
	2993	3198	3996	-	2496
Mediana	3225	3360	3528	3444	3062,5
Cels. Evol.	-	410	-	111	415
Eosinofílica (n°/ µL lavado medular)	371	120	126	198	388
	174	38	609	504	88
	510	380	-	320	0
(n=8-10)	300	450	420	328	355
	390	275	574	679	276
	632	468	312	445	210
	546	450	284	380	168
	553	300	106	345	400
	292	246	540	-	288
Mediana	390	340	366	345	282
Cels. Evol.	-	902	-	555	996
Eritrocítica (n°/ µL lavado medular)	901	840	210	660	776
	870	874	1740	924	1056
	765	912	-	800	736
(n=8-10)	825	975	900	902	213
	858	605	656	1164	552
	1817	546	780	1157	1050
	1183	375	284	950	1344
	1343	375	636	1035	1520
	730	984	1620	-	768
Mediana	870	857	718	924	886

APÊNDICE 7 – Número global de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos de camundongos tratados com dose única de grandisina após 14 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	25µg/g	50µg/g	100µg/g
Leucócitos (n°/ µL sangue)	4400	5600	2150	3900	2850
	5600	-	5450	3350	2600
(n=9-10)	6450	4700	2850	3200	2500
	6950	3350	3500	4200	3650
	2400	6250	2350	2850	2850
	8000	8650	4400	2250	2450
	4150	4500	2950	3000	-
	5300	3150	3450	4350	2450
	7050	3400	3700	5550	2100
	-	2900	2200	-	2300
Mediana	5600	4500	3200	3350	2600
Neutrófilos (n°/ µL sangue)	880	1120	344	624	684
	1008	-	981	569,5	572
(n=9-10)	1096,5	893	741	416	700
	1459,5	737	770	882	657
	456	1375	493,5	570	627
	1280	1903	924	562,5	563,5
	830	1260	590	540	-
	1113	756	759	739,5	465,5
	1903,5	646	703	999	420
	-	551	352	-	483
Mediana	1096,5	893	722	570	572
Linfócitos (n°/ µL sangue)	3432	4424	1763	3198	2109
	4480	-	4305,5	2713,5	1924
(n=9-10)	5031	3666	2052	2624	1750
	5351,5	2512,5	2625	3192	2883,5
	1896	4750	1762,5	2109	2137,5
	6560	6487,5	3124	1620	1837,5
	3237	3195	2271,5	2400	-
	4028	2331	2587,5	3436,5	1862
	4935	2652	2886	4384,5	1638
	-	2262	1804	-	1771
Mediana	4480	3195	2429,5	2713,5	1862
Monócitos (n°/ µL sangue)	44	56	21,5	39	28,5
	56	-	54,5	33,5	26
(n=9-10)	193,5	94	28,5	64	25
	69,5	33,5	35	84	36,5
	24	62,5	47	57	28,5
	80	173	132	0	0
	41,5	45	29,5	30	-
	106	31,5	69	130,5	49
	141	34	74	111	21
	-	58	22	-	23
Mediana	69,5	56	41	57	26

APÊNDICE 8 – Contagem de células mononucleares e polimorfonucleares presentes no sangue periférico de camundongos tratados com dose única de grandisina após 14 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	25µg/g	50µg/g	100µg/g
Céls. Mononucleares (n°/ µL sangue)	3476	4480	1784,5	3237	2137,5
	4536	-	4360	2747	1950
	5224,5	3760	2080,5	2688	1775
(n=9-10)	5421	2546	2660	3276	2920
	1920	4812,5	1809,5	2166	2166
	6640	6660,5	3256	1620	1837,5
	3278,5	3240	2301	2430	-
	4134	2362,5	2656,5	3567	1911
	5076	2686	2960	4495,5	1659
	-	2320	1826	-	1794
Mediana	4536	3240	2478,75	2747	1911
Céls. Polimorfonucleares (n°/ µL sangue)	924	1120	365,5	663	712,5
	1064	-	1090	603	650
	1225,5	940	769,5	512	725
(n=9-10)	1529	804	840	924	730
	480	1437,5	540,5	684	684
	1360	1989,5	1144	630	612
	871,5	1260	649	570	-
	1166	787,5	793,5	783	539
	1974	714	740	1054,5	441
	-	580	374	-	506
Mediana	1166	940	754,75	663	650

APÊNDICE 9 – Contagem de eritrócitos, eosinófilos e plaquetas dos animais tratados com dose única de grandisina após 14 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	25µg/g	50µg/g	100µg/g
Eritrócitos (n° x 10 ⁶ / µL sangue) (n=9-10)	7,2	7	7	7,3	7,7
	7,7	-	7,7	7,3	7
	7,1	7,6	7	7,3	7,3
	5	6,2	6,7	6,4	6,7
	6,1	7,6	8,4	8,2	7
	6,3	5,8	7,5	8,9	6,6
	7,9	8,1	6,4	8,5	-
	9,1	9,7	8	8,2	7,5
	9,1	9,5	7,3	6,8	7,1
	-	6,4	7,2	-	7
Mediana	7,2	7,6	7,25	7,3	7
Eosinófilos (n°/ µL sangue) (n=9-10)	44	0	21,5	39	28,5
	56	-	109	33,5	78
	129	47	28,5	96	25
	69,5	67	70	42	73
	24	62,5	47	114	57
	80	86,5	220	67,5	49
	41,5	0	59	30	-
	53	31,5	34,5	43,5	73,5
	70,5	68	37	55,5	21
	-	29	22	-	23
Mediana	56	47	42	43,5	49
Plaquetas (n° x 10 ³ / µL sangue) (n=9-10)	890	900	780	840	1160
	970	-	920	900	1190
	1030	1010	790	990	1200
	830	960	860	1020	1020
	760	1050	770	830	1030
	910	860	1130	910	1030
	1090	960	1030	1170	-
	1030	1100	900	1100	1080
	1140	1200	1100	960	1160
	-	1020	860	-	1170
Mediana	970	1010	880	960	1160

APÊNDICE 10 – Contagem de células nucleadas presentes nos sedimentos medulares e no baço de camundongos tratados com dose única de grandisina após 14 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	25µg/g	50µg/g	100µg/g	
Cel. medular (n° x 10 ³ / µL lavado medular) (n=9-10)	5	8	8	7,7	8	
	6,3	-	9	10	9,5	
	7,4	7,5	8,9	10,2	8,7	
	6	6,8	8,9	6	10,1	
	6,4	7,3	7	6,3	7,2	
	7,2	6,6	5	6,5	9,5	
	5,3	6,6	7,1	9,7	-	
	4,9	4	8,2	8,6	8,5	
	6	7	8,9	10,3	7,2	
	-	5,3	6,2	-	9,5	
	Mediana	6	6,8	8,1	8,6	8,7
	Cel. esplênica (n° x 10 ³ / µL suspensão de baço) (n=9-10)	7,6	16,8	17,3	13,3	7,9
		10,8	-	13	13,7	12,2
8,6		14,6	13,9	14,5	6,7	
14,8		8,9	5,1	7,1	9,9	
13,4		15,6	8,1	7,6	9,9	
9,2		6,4	10,7	10,3	10	
14,9		14,4	10	9,5	-	
8,1		9,8	10,4	10,7	9,1	
7,6		14	12,8	13,4	4,6	
-		10,4	13,6	-	8,5	
Mediana		9,2	14	11,75	10,7	9,1

APÊNDICE 11 – Contagem de células mononucleares e polimorfonucleares presentes no sangue periférico de camundongos tratados com dose única de grandisina após 14 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	25µg/g	50µg/g	100µg/g	
Céls. Mononucleares em evolução (n°/ µL lavado medular) (n=9-10)	1750	2400	2960	3311	3520	
	2205	-	3240	3800	3610	
	2664	2325	2759	3978	3219	
	1620	1836	3293	2280	4444	
	2368	2920	2450	2583	3384	
	1944	1716	1100	2860	4560	
	1590	2112	2059	3880	-	
	1225	1520	2952	3870	4250	
	1800	3080	2848	5150	3024	
	-	1537	2728	-	4370	
	Mediana	1800	2112	2803,5	3800	3610
	Céls. Polimorfonucleares em evolução (n°/ µL lavado medular) (n=9-10)	3250	5600	5040	4851	4480
		4095	-	5760	6600	5890
4736		5175	6141	6630	5481	
4380		4964	5607	3960	5656	
4032		4380	4550	4032	3816	
5256		4884	3900	4095	4940	
3710		4488	5041	6305	-	
3675		2480	5248	5246	4250	
4200		3920	6052	5665	4176	
-		3763	3472	-	5130	
Mediana		4095	4488	5144,5	5246	4940

APÊNDICE 12 – Contagem de células em evolução linfocítica, monocítica, neutrofílica, eosinofílica e eritrocítica presentes nos sedimentos medulares de camundongos tratados com dose única de grandisina após 14 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	25µg/g	50µg/g	100µg/g
Cels. Evol. Linfocítica (n°/ µL lavado medular)	1500	2160	2560	2387	3040
	1953	-	2790	3000	3230
	2442	2025	2314	3162	2610
	1380	1564	2848	1800	3939
(n=9-10)	2240	2774	2100	1953	2808
	1584	1452	1000	1950	4180
	1378	1848	1775	2910	-
	1078	1360	2542	2838	3910
	1560	2800	2403	4120	2808
	-	1325	2418	-	3800
Mediana	1560	1848	2410,5	2838	3230
Cels. Evol. Monocítica (n°/ µL lavado medular)	250	240	400	462	480
	252	-	450	400	380
	222	300	445	612	609
	240	272	445	240	505
(n=9-10)	128	146	350	315	576
	360	264	100	455	380
	212	264	284	485	-
	147	160	410	516	340
	240	280	445	515	216
	-	212	310	-	570
Mediana	240	264	405	462	480
Cels. Evol. Neutrofílica (n°/ µL lavado medular)	2400	4000	3360	3388	3280
	2835	-	4140	4800	4655
	3330	3750	4361	4692	4263
	3300	3604	3827	2940	4343
(n=9-10)	2560	2993	3010	2898	2808
	3672	3432	2750	2990	3610
	2862	3234	3479	4268	-
	2597	1640	3772	3698	2805
	2940	2450	4361	4223	2952
	-	2756	2418	-	3610
Mediana	2862	3234	3625,5	3698	3610
Cels. Evol. Eosinofílica (n°/ µL lavado medular)	150	320	320	308	400
	378	-	450	500	285
	222	300	356	408	261
	300	272	445	120	303
(n=9-10)	256	365	420	252	144
	360	396	350	260	190
	212	462	426	388	-
	196	200	328	344	255
	360	280	356	412	288
	-	318	124	-	285
Mediana	256	318	356	344	285
Cels. Evol. Eritrocítica (n°/ µL lavado medular)	700	1280	1360	1155	800
	819	-	1170	1300	950
	1184	1050	1335	1428	957
	720	1020	1246	900	909
(n=9-10)	1216	949	1120	882	864
	1152	990	800	780	1140
	636	792	1065	1552	-
	784	640	1148	1204	1105
	900	1190	1335	1030	936
	-	689	930	-	1140
Mediana	819	990	1159	1155	950

APÊNDICE 13 – Número global de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos no sangue periférico de camundongos tratados com dose seriada de grandisina após 7 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g
Leucócitos (n°/ µL sangue)	4900	4800	4450
	4950	4900	3750
(n=9-10)	4550	4850	3800
	5700	5600	4900
	4700	4700	-
	4650	5600	4500
	5400	5400	3750
	5350	5800	4350
	5750	3650	4800
	4650	6250	3950
Mediana	4925	4875	4350
Neutrófilos (n°/ µL sangue)	1372	1152	890
	990	1225	937,5
	1001	1261	798
(n=9-10)	1197	1232	1127
	987	1081	-
	1069,5	1232	990
	1458	1080	787,5
	1337,5	1624	1131
	1265	912,5	1218
	1302	1500	948
Mediana	1231	1228,5	948
Linfócitos (n°/ µL sangue)	3479	3552	3471
	3811,5	3577	2775
	3503,5	3443,5	2926
(n=9-10)	4275	4200	3675
	3478	3384	-
	3487,5	4144	3375
	3780	4104	2850
	3905,5	4118	3088,5
	4312,5	2591,5	2898
	3301,5	4687,5	2962,5
Mediana	3641,75	3840,5	2962,5
Monócitos (n°/ µL sangue)	49	96	44,5
	99	98	37,5
	45,5	97	38
(n=9-10)	171	112	49
	141	141	-
	46,5	112	90
	108	108	112,5
	107	58	43,5
	115	109,5	42
	46,5	62,5	39,5
Mediana	103	103	43,5

APÊNDICE 14 – Contagem de células mononucleares e polimorfonucleares presentes no sangue periférico de camundongos tratados com dose seriada de grandisina após 7 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g
Céls. Mononucleares (n°/ µL sangue) (n=9-10)	3528	3648	3515,5
	3910,5	3675	2812,5
	3549	3540,5	2964
	4446	4312	3724
	3619	3525	-
	3534	4256	3465
	3888	4212	2962,5
	4012,5	4176	3132
	4427,5	2701	2940
	3348	4750	3002
Mediana	3753,5	3925,5	3002
Céls. Polimorfonucleares (n°/ µL sangue) (n=9-10)	1372	1152	934,5
	1039,5	1225	937,5
	1001	1309,5	836
	1254	1288	1176
	1081	1175	-
	1116	1344	1035
	1512	1188	787,5
	1337,5	1624	1218
	1322,5	949	1260
	1302	1500	948
Mediana	1278	1256,5	948

APÊNDICE 15 – Contagem de plaquetas e eritrócitos dos animais tratados com dose seriada de grandisina após 7 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g
Eritrócitos (n° x 10 ⁶ / µL sangue) (n=9-10)	7,4	7	6,7
	7,8	7,1	7,8
	7,9	7,1	6,6
	7,9	7,7	7,6
	7,4	7,6	-
	7,2	7,7	7,7
	7,5	7,6	7,1
	7,7	7,8	7,1
	7,2	7,1	7,4
	7,7	7,6	7,2
Mediana	7,6	7,6	7,2
Eosinófilos (n°/ µL sangue) (n=9-10)	0	0	44,5
	49,5	0	0
	0	48,5	38
	57	56	49
	94	94	-
	46,5	112	45
	54	108	0
	0	0	87
	57,5	36,5	42
	0	0	0
Mediana	48	42,5	42
Plaquetas (n° x 10 ³ / µL sangue) (n=9-10)	860	865	625
	945	895	770
	790	810	690
	880	760	905
	860	740	-
	780	735	785
	735	775	605
	755	770	730
	710	730	850
	695	645	775
Mediana	785	770	770

APÊNDICE 16 – Contagem de células nucleadas presentes nos sedimentos medulares e no baço de camundongos tratados com dose seriada de grandisina após 7 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g
Cel. medular (n° x 10 ³ / µL lavado medular) (n=9-10)	8	7	5,5
	7,9	6,5	5,5
	8	7	4,1
	8,9	9	5,9
	4	8,1	-
	8,4	8,2	5,7
	7,7	6,8	5,9
	6	7,2	5,6
	5,8	7	5,3
	7,1	8,2	4,1
	7,4	7,1	5,5
	Mediana		
	Cel. esplênica (n° x 10 ³ / µL suspensão de baço) (n=9-10)	11	12,8
14		12,2	12,3
14,2		12,5	11
12,5		13,8	12
10,3		11	-
10		14,4	11,4
12		11,9	11,6
10,1		12,9	12,1
12,5		12,5	12,1
12,4		12,5	11,6
12,2		12,5	11,7
Mediana			

APÊNDICE 17 – Contagem de células mononucleares e polimorfonucleares em evolução presentes nos sedimentos medulares de camundongos tratados com dose seriada de grandisina após 7 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g
Céls. Mononucleares em evolução (n°/ µL lavado medular) (n=9-10)	4240	4060	2750
	3950	3120	2915
	3680	3290	1722
	4717	5580	2478
	2480	4293	-
	4620	4264	3534
	4235	3876	3776
	3420	3528	3472
	2958	3710	1537
	3763	4100	1845
	3856,5	3968	2750
	Mediana		
	Céls. Polimorfonucleares em evolução (n°/ µL lavado medular) (n=9-10)	3760	2940
3950		3380	2585
4320		3710	2378
4183		3420	3422
1520		3807	-
3780		3936	2166
3465		2924	2124
2580		3672	2128
2842		3290	3763
3337		4100	2255
3612,5		3526	2378
Mediana			

APÊNDICE 18 – Contagem de células em evolução linfocítica, monocítica, neutrofílica, eosinofílica e eritrocítica presentes nos sedimentos medulares de camundongos tratados com dose seriada de grandisina após 7 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g
Cels. Evol. Linfocítica (n°/ µL lavado medular)	3200	2940	2145
	2844	2080	2475
(n=9-10)	2720	2380	1312
	3560	4230	1770
	1960	3240	-
	3528	3198	2565
	3234	2924	2832
	2400	2592	2800
	1972	2730	1272
	2698	2952	1148
Mediana	2782	2932	2145
Cels. Evol. Monocítica (n°/ µL lavado medular)	1040	1120	605
	1106	1040	440
	960	910	410
(n=9-10)	1157	1350	708
	520	1053	-
	1092	1066	969
	1001	952	944
	1020	936	672
	986	980	265
	1065	1148	697
Mediana	1030	1046,5	638,5
Cels. Evol. Neutrofílica (n°/ µL lavado medular)	2720	2310	1980
	2607	2405	1650
	2960	2730	2009
(n=9-10)	2581	2250	2537
	1040	2511	-
	2268	2378	1425
	2618	2108	1534
	1980	2808	1344
	1914	2520	2438
	2698	3198	1722
Mediana	2594	2458	1722
Cels. Evol. Eosinofílica (n°/ µL lavado medular)	320	210	220
	474	260	275
	400	350	123
(n=9-10)	445	450	354
	200	405	-
	504	410	228
	308	272	236
	300	432	336
	290	280	477
	284	410	287
Mediana	314	377,5	275
Cels. Evol. Eritrocítica (n°/ µL lavado medular)	720	420	550
	869	715	660
	960	630	246
(n=9-10)	1157	720	531
	280	891	-
	1008	1148	513
	539	476	354
	300	432	448
	638	490	848
	355	492	246
Mediana	679	561	513

APÊNDICE 19 – Número global de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos no sangue periférico de camundongos tratados com dose seriada de grandisina após 14 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g
Leucócitos (n°/ µL sangue)	5000	5000	3750
(n=10)	4900	3700	4000
	4500	5000	4100
	3850	4500	4300
	3600	4100	3600
	4000	4900	3800
	5000	5350	4000
	4750	5400	4000
	5600	5700	4500
	5550	3200	4000
Mediana	4825	4950	4000
Neutrófilos (n°/ µL sangue)	1050	1050	862
(n=10)	1078	888	960
	900	1050	861
	847	990	817
	720	943	793
	920	980	836
	1200	1177	800
	1330	1296	800
	1400	1425	855
	1277	704	840
Mediana	1064	1020	838
Linfócitos (n°/ µL sangue)	3750	3750	2775
(n=10)	3675	2701	2880
	3465	3650	3116
	2926	3375	3397
	2808	3034	2664
	3000	3773	2850
	3700	4066	3160
	3325	3996	3120
	4088	4161	3510
	4162	2464	3080
Mediana	3570	3700	3098
Monócitos (n°/ µL sangue)	150	150	75
(n=10)	98	74	120
	90	150	82
	39	90	86
	36	82	106
	80	98	114
	100	107	40
	95	54	40
	112	57	90
Mediana	92,5	86	84

APÊNDICE 20 – Contagem de células mononucleares e polimorfonucleares presentes no sangue periférico de camundongos tratados com dose seriada de grandisina após 14 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g
Céls. Mononucleares (n°/ µL sangue)	3900	3900	2850
	3773	2775	3000
(n=10)	3555	3800	3198
	2965	3465	3483
	2844	3116	2770
	3080	3871	2964
	3800	4173	3200
	3420	4050	3160
	4200	4218	3600
	4218	2496	3120
Mediana	3664	3835,5	3140
Céls. Polimorfonucleares (n°/ µL sangue)	1100	1100	900
	1127	925	1000
(n=10)	945	1200	902
	885	1035	817
	756	984	830
	920	1029	836
	1200	1177	800
	1330	1350	840
	1400	1482	900
	1332	704	880
Mediana	1113,5	1067,5	860

APÊNDICE 21 – Contagem de eritrócitos, eosinófilos e plaquetas de animais tratados com dose seriada de grandisina após 14 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g
Eritrócitos (n° x 10 ⁶ / µL sangue)	7,6	7,7	7,7
	7,7	8,1	7,4
(n=10)	7,9	7,6	8,1
	7,8	8,1	7,4
	8,1	8	8,1
	7,8	7,8	8
	7,5	7,8	7,3
	7,8	7,9	8,2
	7,8	8	8,2
	8,1	7,6	8,1
Mediana	7,8	7,85	8,05
Eosinófilos (n°/ µL sangue)	50	50	38
	49	37	40
	45	150	41
(n=10)	38	45	0
	36	41	37
	0	49	0
	0	0	0
	0	54	40
	0	57	45
	55	0	40
Mediana	37	47	39
Plaquetas (n° x 10 ³ / µL sangue)	725	745	565
	720	820	675
	725	830	565
(n=10)	715	820	615
	720	745	660
	795	680	630
	855	770	690
	865	795	745
	825	840	820
	850	730	750
Mediana	760	782,5	667,5

APÊNDICE 22 – Contagem de células nucleadas presentes nos sedimentos medulares e no baço de camundongos tratados com dose seriada de grandisina após 14 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g
Cel. medular (n° x 10 ³ / µL lavado medular) (n=10)	9	10,2	7,5
	9,1	8,3	7,2
	8,1	9,1	7,7
	8,6	8,4	5,5
	8,8	7,8	4,3
	8,6	7,3	6,4
	7,5	7,5	3,8
	6,5	8,2	6,6
	8,5	7,5	4,1
	9	6	3,6
Mediana	8,6	8	5,95
Cel. esplênica (n° x 10 ³ / µL suspensão de baço) (n=10)	14,2	12,5	13,2
	11,1	12,8	14,2
	14,1	11,9	13,5
	11	11,8	12,2
	12	12,6	12
	11	12,6	13,2
	14,8	12,8	10,2
	14,3	13,9	12,8
	13,8	12,1	14,9
	12,6	12,4	10,4
Mediana	13,2	12,45	13

APÊNDICE 23 – Contagem de células mononucleares e polimorfonucleares presentes no sangue periférico de camundongos tratados com dose seriada de grandisina após 14 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g
Céls. Mononucleares em evolução (n°/ µL lavado medular) (n=10)	4320	4998	3750
	4004	3901	3240
	3969	4277	3080
	3870	4032	2915
	5104	3978	2021
	4042	3285	2688
	3075	3675	1520
	2600	3526	3234
	4165	3450	2050
	3870	2940	1728
Mediana	3986,5	3788	2801,5
Céls. Polimorfonucleares em evolução (n°/ µL lavado medular) (n=10)	4680	5202	3750
	5096	4399	3960
	4131	4823	4620
	4730	4368	2585
	3996	3822	2279
	4558	4015	3712
	4425	3825	2280
	3900	4674	3366
	4335	4050	2050
	5130	3060	1872
Mediana	4491,5	4209	2975,5

APÊNDICE 24 – Contagem de células em evolução linfocítica, monocítica, neutrofílica, eosinofílica e eritrocítica presentes nos sedimentos medulares de camundongos tratados com dose seriada de grandisina após 14 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g
Cels. Evol. Linfocítica (n°/ µL lavado medular)	3150	3570	2775
(n=10)	3094	2988	2520
	2997	3094	2002
	2924	3192	2090
	3872	3198	1376
	2838	2263	1920
	2475	2550	1102
	2015	2706	2443
	2805	2175	1517
	2610	2040	1152
Mediana	2881	2847	1961
Cels. Evol. Monocítica (n°/ µL lavado medular)	1170	1428	975
(n=10)	910	913	720
	972	1183	1078
	946	840	825
	1232	780	645
	1204	1022	768
	600	1125	418
	585	820	792
	1360	1275	533
	1260	900	576
Mediana	1071	967,5	744
Cels. Evol. Neutrofílica (n°/ µL lavado medular)	3060	3876	2700
(n=10)	3731	2988	2808
	2673	3640	3234
	3526	2940	1540
	2376	2418	1720
	3096	3139	2432
	2625	2925	1596
	2730	2952	2508
	3315	2625	1517
	3780	2280	1476
Mediana	3078	2946	2076
Cels. Evol. Eosinofílica (n°/ µL lavado medular)	450	510	375
(n=10)	364	498	360
	486	364	385
	344	420	275
	440	312	215
	516	219	320
	525	375	190
	325	574	396
	425	450	205
	540	420	216
Mediana	437,5	420	297,5
Cels. Evol. Eritrocítica (n°/ µL lavado medular)	1170	816	675
(n=10)	1001	830	792
	972	819	1001
	860	1008	715
	880	1092	344
	946	657	960
	1275	525	494
	845	1148	462
	510	900	328
	810	360	180
Mediana	913	824,5	584,5

APÊNDICE 25 – Número de células CD3, CD7 e CD19 positivas no lavado medular de camundongos tratados com dose única^(a) e seriada^(b) de grandisina após 7 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g ^(a)	100µg/g ^(b)
células CD3 positivas (n°/ µL lavado medular) (n=8-10)	560	560	664	330
	553	390	679	330
	-	490	616	246
	-	720	644	295
	320	648	497	-
	672	574	736	513
	539	544	490	354
	540	576	672	392
	522	490	560	477
	639	-	672	287
	Mediana	546,5	560	654
células CD7 positivas (n°/ µL lavado medular) (n=8-10)	560	560	664	385
	632	455	679	385
	720	630	704	-
	801	630	644	472
	320	648	568	-
	588	574	736	513
	616	612	630	531
	540	720	588	560
	522	420	560	371
	639	656	672	410
	Mediana	602	621	654
células CD19 positivas (n°/ µL lavado medular) (n=9-10)	720	560	830	440
	632	-	873	440
	640	630	792	287
	623	810	828	531
	320	648	568	-
	756	656	828	456
	616	612	630	354
	600	576	840	448
	522	560	640	530
	639	574	864	287
	Mediana	627,5	612	828

APÊNDICE 26 – Número de células CD3, CD7 e CD19 positivas no baço de camundongos tratados com dose única^(a) e seriada^(b) de grandisina após 7 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g ^(a)	100µg/g ^(b)
células CD3 positivas (n°/ µL suspensão de baço) (n=7-10)	660	768	816	819
	840	976	872	738
	852	1000	854	660
	625	690	888	840
	824	660	917	-
	600	864	777	798
	720	714	-	696
	606	774	749	968
	875	625	-	726
	868	875	-	928
	Mediana	772	771	854
células CD7 positivas (n°/ µL suspensão de baço) (n=8-10)	770	896	714	702
	1260	1220	981	1107
	994	1125	854	880
	750	966	999	-
	824	880	917	-
	700	1152	777	570
	840	952	-	696
	909	903	856	968
	1000	1000	1113	968
	744	1000	-	928
	Mediana	832	983	886,5
células CD19 positivas (n°/ µL suspensão de baço) (n=8-10)	880	896	816	1053
	1540	1220	981	1107
	1136	1000	-	990
	750	966	888	960
	721	1100	917	-
	600	1008	777	798
	1080	952	1188	1044
	909	1032	963	1089
	1250	1125	1113	968
	992	1250	-	1044
	Mediana	950,5	1020	940

APÊNDICE 27 – Número de células CD3, CD7 e CD19 positivas no lavado medular de camundongos tratados com dose única^(a) e seriada^(b) de grandisina após 14 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g ^(a)	100µg/g ^(b)
células CD3 positivas (n°/ µL lavado medular) (n=7-10)	720	918	560	600
	910	747	570	576
	648	728	696	693
	860	924	707	385
	792	702	504	344
	860	803	760	448
	600	600	-	342
	455	738	-	594
	680	750	-	328
	900	540	570	-
Mediana	756	742,5	570	448
células CD7 positivas (n°/ µL lavado medular) (n=9-10)	1080	918	560	600
	910	913	760	648
	810	819	696	847
	774	840	808	605
	792	936	504	430
	774	657	760	512
	900	600	-	304
	585	820	680	528
	680	750	504	369
	900	600	855	252
Mediana	801	819,5	696	520
células CD19 positivas (n°/ µL lavado medular) (n=8-10)	990	816	560	525
	1001	664	760	648
	729	910	783	616
	774	756	707	550
	616	780	720	601
	602	584	760	384
	600	600	-	228
	650	984	765	792
	850	900	576	328
	1080	480	-	324
Mediana	751,5	768	740	537,5

APÊNDICE 28 – Número de células CD3, CD7 e CD19 positivas no baço de camundongos tratados com dose única^(a) e seriada^(b) de grandisina após 14 dias do tratamento.

	Salina	DMSO	100µg/g ^(a)	100µg/g ^(b)
células CD3 positivas (n°/ µL suspensão de baço)	852	875	632	792
	777	896	854	710
(n=9-10)	987	714	603	1080
	770	944	792	854
	600	882	792	960
	660	756	700	792
	1036	768	-	612
	1287	1390	728	640
	1104	726	414	894
	1008	744	680	832
Mediana	919,5	821,5	700	812
células CD7 positivas (n°/ µL suspensão de baço)	852	875	711	1056
	777	1024	854	1136
	1128	952	670	945
(n=9-10)	660	590	891	976
	960	630	891	840
	660	630	800	1056
	888	1152	-	612
	1001	1251	819	1024
	1104	968	460	1043
	756	992	765	936
Mediana	870	960	800	1000
células CD19 positivas (n°/ µL suspensão de baço)	994	1000	711	924
	777	1024	1220	994
	1128	952	603	945
(n=9-10)	880	944	891	854
	840	1008	891	960
	770	756	900	924
	1184	1024	-	816
	1001	973	910	1152
	966	968	414	1192
	1008	992	850	1040
Mediana	980	982,5	891	952,5