



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**RENATA ROSEGHINI**

**EFEITOS DO ALCALÓIDE ARBORININA E DO  
FLAVONÓIDE RUTINA, EXTRAÍDOS DE PLANTAS  
NATIVAS DA BAHIA, SOBRE FUNCIONALIDADE E  
VIABILIDADE DE CÉLULAS DE BAÇO E TIMO MURINO  
*IN VITRO***

**Salvador  
2005**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**RENATA ROSEGHINI**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EFEITOS DO ALCALÓIDE ARBORININA E DO  
FLAVONÓIDE RUTINA, EXTRAÍDOS DE PLANTAS  
NATIVAS DA BAHIA, SOBRE FUNCIONALIDADE E  
VIABILIDADE DE CÉLULAS DE BAÇO E TIMO MURINO  
*IN VITRO.***

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), da Universidade Federal da Bahia (UFBA), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Imunologia.

**Orientador(a): Dra. Songelí Menezes Freire**  
**Co-orientador: Dr. Roberto Meyer**

**Salvador**  
**2005**

## Biblioteca Prof. Penildon Silva – ICS - UFBA

R799 Roseghini, Renata.

Efeitos do alcalóide arborinina e do flavonóide rutina, extraídos de plantas nativas da Bahia, sobre funcionalidade e viabilidade de células de baço e timo murino *in vitro*. / Renata Roseghini.-Salvador: 2005.

95f.: il. + anexo.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Songelí Menezes Freire

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Meyer

Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Imunologia, 2005.

1.Plantas Mediciniais-Bahia 2.Alcalóide 3.Flavonóide 4.Sistema Imune

CDU 615.322 (813.8): 577.27



**RENATA ROSEGHINI**

**EFEITOS DO ALCALÓIDE ARBORININA E DO FLAVONÓIDE  
RUTINA, EXTRAÍDOS DE PLANTAS NATIVAS DA BAHIA, SOBRE  
FUNCIONALIDADE E VIABILIDADE DE CÉLULAS DE BAÇO E  
TIMO MURINO *IN VITRO***

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Imunologia, pela Universidade Federal da Bahia, julgada e aprovada pela seguinte banca examinadora:

Songelí Menezes Freire (Orientadora)  
Doutorado em Imunologia – Universidade de Buenos Aires/ Argentina  
UFBA/ FDC/ UNIME

Maria de Lourdes Farre Vallve  
Doutorado em  
UFBA/FIOCRUZ

Susie Vieira de Oliveira  
Doutorado em  
UEFS/ UNIME

Salvador, 04 de abril de 2005

*Grandes realizações só são possíveis quando  
se dá atenção aos pequenos começos*

Lao Tse

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo exemplo de dedicação, carinho, respeito e determinação que sempre foram para mim e às minhas irmãs e amigas Cláudia e Marina.

Ao meu marido Fabiano pelo apoio, pelo amor incondicional e pelos momentos de alegria que tem me proporcionado todos estes anos.

À minha querida orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Songelí Menezes Freire pela confiança em meu trabalho, pela receptividade e disponibilidade sempre que precisei e pela amizade cultivada nestes anos.

Ao Prof. Dr. Roberto Meyer, meu co-orientador, pela disponibilização do Labimuno, pela atenção e gentileza que sempre me dispensou e pelo exemplo de sabedoria e humildade.

Aos amigos do laboratório Débora Rocha, Paula Moreira, Lívia Pugliese, Soraya Trindade, Alexandre Pinheiro, Vera Vale, Marcos Ribeiro, Paulo Juiz, Milene Salomão, Bruno Paule, Renato Carminati, Robson Bahia, Mônica Franca, Adriano, Zoraida e aos estagiários Ana Paula, Érica, Marcos, Andréia, Miguel e Gerson pelo companheirismo e pela ajuda sempre.

Aos professores do Labimuno Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Ivana Nascimento, Prof. Dr. Robert Schaer e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Denise Lemaire pelo apoio e pela disponibilidade no esclarecimento das dúvidas.

À Dilcéa, secretária do PPGIm pela prestatividade e atenção.

Aos indispensáveis e atenciosos funcionários do Laboratório de Imunologia – ICS: Dra. Jussara, Mariluce, Marinalva, George, Clarice e Chica.

Aos professores pesquisadores do Projeto Drogas: Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo da Faculdade de Farmácia da UFBA, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria de Fátima Dias Costa, Prof. Dr. Ramón El-Bachá e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvia Lima Costa do Laboratório de Neuroquímica e à Dr<sup>ª</sup>. Marcienne Tardy pelo auxílio e informações sobre as drogas.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos por disponibilizar seu laboratório na FIOCRUZ e ao amigo Fernando pela coleta e leitura de linfoproliferação.

Ao Prof. Dr. Manuel Barral e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Aldina Barral pela disponibilização do Citômetro de Fluxo da FIOCRUZ e a Jorge Clarêncio pela boa vontade na análise de citometria.

Ao Prof. Dr. Gubio S. Campos e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvia Sardi por disponibilizarem o Laboratório de Virologia do ICS sempre que preciso.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Theresa Bittencourt pelo valioso auxílio na análise estatística.

Aos meus pacientes pela compreensão, carinho e paciência nos momentos de ausência.

A todos que ao longo da vida me incentivaram a seguir meu caminho e lutar pelo que acredito.

## **APOIO FINANCEIRO**

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB- Ex-CADCT 011801)
  
- Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde (LABIMUNO-ICS-UFBA)
  
- Programa de Pós Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia (PPGIm-UFBA).



## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Ao longo do período foram realizadas duas participações em eventos internacionais envolvendo o presente trabalho:

- **“Effect of arborinine alkaloid obtained from Brazilian *Erthela baihensis* on spleen and thymus cells stimulated in vitro with different mitogens”**

**Roseghini, R.**; Rocha, D.; Clarêncio, J.; Pinheiro, A.M.; Nascimento, I.; Schaer, R.; Velozo, E.; Vale, V.; El-Bachá, R.; Costa, S.; Costa, M.F.D.; Tardy, M.; Meyer, R.; Freire, S.

*Nitric Oxide, Cytokines and Inflammation – 2004 - An International Symposium*

06 a 09 de junho de 2004 - Rio de Janeiro-Brasil

- **“Effect of Flavonoid Rutin Obtained of *Dimorphandra mollis* from Bahia-Brazil on the Viability and Function of Murine Immune Cells Stimulated with Different Mitogens”**

**Roseghini, R.**; Rocha, D.; Clarêncio, J.; Nascimento, I.; Schaer, R.; Velozo, E.; Vale, V.; El-Bachá, R.; Costa, S.; Costa, M.F.D.; Tardy, M.; Meyer, R.; Freire, S.

*12th International Congress of Immunology and the 4th Annual Meeting of FOCIS*

18 a 23 de julho de 2004 - Montréal- Canada

Os resultados finais geraram três trabalhos científicos:

- **“Different effect of arborinine alkaloid obtained from Brazilian *Erthela baihensis* on spleen and thymus cells stimulated in vitro with different mitogens”**

**Roseghini, R.**; Moreira, P.; Vale, V.; Costa, J.F.O.; Pinheiro, A.M.; Nascimento, I.; Schaer, R.; Velozo, E.; Bittencourt, T.; El-Bachá, R.; Meyer, R.; Freire, S.

Submetido ao periódico: *Life Sciences*

- **“Effect of flavonoid rutin obtained of *Dimorphandra mollis* from Bahia-Brazil on the viability and function of murine immune cells stimulated with different mitogens”**

**Roseghini, R.**; Rocha, D.; Clarêncio, J.; Nascimento, I.; Schaer, R.; Velozo, E.; Costa, S.; Costa, M.F.D.; Tardy, M.; Meyer, R.; Freire, S.

Submetido ao periódico: *International Immunopharmacology*

- **“Resposta de esplenócitos e timócitos frente a diferentes estímulos mitogênicos”**

*Short communication* em fase de preparação.

## RESUMO

A arborinina é um alcalóide acridônico obtido da *Erthela bahiensis*, planta popularmente conhecida como “maricutinha” e utilizada como diurética, antidiabética e antitérmica. A rutina é um flavonóide do tipo citroflavonol extraído da *Dimorphandra mollis*, e tem sido descrita como anti-oxidativa, anti-hemorrágica e protetora dos vasos sanguíneos. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito das drogas, *in vitro*, sobre a viabilidade e funcionalidade de células do sistema imune em modelo murino. Células de baço e timo de ratos Wistar foram incubadas com 10nM, 1µM e 10µM de cada droga na ausência ou presença de estímulo mitogênico: ConA, PWM ou LPS. A linfoproliferação foi medida pela incorporação de H<sup>3</sup>-timidina após 48 e 72 horas e a viabilidade por citometria de fluxo utilizando anexina-V e iodeto de propídio, após 24 e 48 horas de incubação. As citocinas IFN-γ e IL-10 foram medidas pelo método de ELISA após 48 e 72 horas. Os resultados após o tratamento das células com arborinina e estímulo com ConA mostraram inibição na proliferação de esplenócitos em 48h (21%) e 72h (28 a 32%) e aumento na proliferação de tímócitos (49%) em 48 horas; diminuição nos níveis de IFN-γ por células esplênicas (2%) nas 48 e 72 horas e por tímócitos em 72h (10-20%); diminuição na produção de IL-10 por esplenócitos (27%) nas 48h e por tímócitos em 48h (20- 38%) e 72h (25%). Nos resultados das células com arborinina e estímulo com PWM foram observados aumento na apoptose de células esplênicas (54%) e tímicas (19%) em 24h e diminuição na apoptose de células tímicas (20%) em 48h; inibição na proliferação de células esplênicas (9%) e aumento na proliferação de células tímicas (14%) em 48 horas; diminuição na produção de IL-10 por células esplênicas (30%) nas 48h e por células tímicas em 72h (23-54%); aumento na produção de IFN-γ (25%) em 48h e diminuição desta em 72h (27%) por células tímicas. Os dados referentes ao tratamento dos esplenócitos com arborinina e estímulo com LPS mostraram diminuição na porcentagem de apoptose (10%) e aumento na proliferação (6%) em 48h e diminuição nos níveis de IFN-γ (25-30%) em 48 e 72 horas. As células tratadas com rutina e estimuladas com ConA mostraram diminuição da linfoproliferação esplênica (11%) em 48h e tímica (15%) em 72h, e pequena diminuição na produção de IFN-γ por células esplênicas e tímicas em 48h. Nos resultados obtidos com a rutina e estímulo com PWM verificou-se aumento na porcentagem de células apoptóticas de timo em 24h (17%) e de baço em 48h (33%) e pequena diminuição na produção de IFN-γ por esplenócitos em 48h e por tímócitos em 48 e 72h. Não foram observadas alterações nos níveis de IL-10 das células tratadas com rutina e estimuladas por estas lectinas mitogênicas. Os esplenócitos tratados com rutina e estimulados com LPS apresentaram queda de 20% na apoptose em 24h e aumento de 11% nos níveis de IL-10 em 48h. Não foram observadas alterações estatisticamente significativas nos níveis de necrose pela presença de arborinina ou rutina ou nos valores dos diversos parâmetros estudados na ausência de estímulo mitogênico. Estes dados sugerem que tanto a arborinina quanto a rutina alteram vários parâmetros estudados em células esplênicas e tímicas estimuladas com mitógenos, sem provocar necrose.

Palavras chaves: alcalóides, flavonóides, arborinina, rutina, mitógenos, linfoproliferação, apoptose, IFN-γ, IL-10

## ABSTRACT

Arborinine is an acridone alkaloid obtained from *Erthela bahiensis*, plant popularly used as diuretic, antidiabetic, antithermic and expectorant. Rutin is a citroflavonol obtained from *Dimorphandra mollis* a native medicinal plant from “cerrado” region in Bahia–Brazil and has been described as anti-oxidative, anti-hemorrhagic and as a blood vessel protector. The present study has examined their effects on the viability and function *in vitro* of immune system cells in a murine model. Rat spleen and thymus cells were incubated with 10nM, 1µM e 10µM of each drug in the presence or absence of PWM, LPS or ConA mitogens. Cellular proliferation was analyzed by H<sup>3</sup>-thymidin uptake after 48 and 72 hours and viability was measured by flow cytometry using Annexin V and propidium iodide after 24 and 48 hours. IFN-γ and IL-10 were measured by ELISA in the supernatant culture after 48 and 72h. Our results with cells treated with arborinine and stimulated by ConA showed an inhibition of splenocytes proliferation in 48h (21%) and 72h (28-32%) and an increase on thymocytes proliferation (49%) in 48h; a decrease on IL-10 production by splenocytes (27%) in 48h and by thymocytes in 48h (20-38%) and 72h (25%); a decrease on IFN-γ production by splenocytes (2%) in 48h and 72h and by thymocytes (10-20%) in 72h. The results with cells treated with arborinine and stimulated by PWM showed inhibitory effect under splenocytes proliferation in 48h (9%) and enhancement of thymocytes proliferation (14%) after 48 hours. Apoptosis increased on splenocytes (54%) and thymocytes (19%) in 24h and decreased on thymocytes (20%) in 48h. It was also observed a decrease on IL-10 production by splenocytes (30%) after 48h and by thymocytes after 72h (23-54%), an increase on IFN-γ production by thymocytes in 48h (25%) and a decrease in 72h (27%). Data referred to splenocytes treated with arborinine and stimulated with LPS demonstrated an apoptosis decrease (10%) and a proliferation enhancement (6%) in 48h and an IFN-γ decrease (25-30%) in 48 and 72h. The results of cells treated with rutin and stimulated with ConA showed an inhibition on the proliferation of splenocytes (11%) in 48h and of thymocytes (15%) in 72h and a decrease on IFN-γ production by spleenocytes and thymocytes in 48h. When cells were treated with rutin and stimulated with PWM, it was observed an increase on apoptosis of thymocytes in 24h (17%) and of spleenocytes in 48h (33%) It was also verified a small decrease on IFN-γ production by spleenocytes in 48h and by thymocytes in 72h. No changes occurred regarding the IL-10 levels of cells stimulated by these lectins. The results of spleenocytes treated with rutin and stimulated by LPS showed a decrease on apoptosis in 24h (20%) and an increase on IL-10 levels in 48h (11%). It was not found any statistically significant variation on necrosis rate of cells treated with arborinine or rutin neither changes on viability and function values in the absence of mitogenic stimulus. Our data suggests that as arborinine alkaloid as rutin flavonoid exerts diverse effects in some immunological parameters of spleen and thymus cells stimulated by mitogens without inducing necrosis.

Key words: alkaloids, flavonoids, arborinine, rutin, mitogens, lymphoproliferation, apoptosis, IFN-γ, IL-10

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura química do ácido antranílico e de uma acridona	4
<b>Figura 2</b>	Estrutura química do alcalóide arborinina	4
<b>Figura 3</b>	Imagem da planta <i>Erthela bahiensis</i>	5
<b>Figura 4</b>	Estrutura básica e tipos de flavonóides	8
<b>Figura 5</b>	Estrutura química do flavonóide rutina	8
<b>Figura 6</b>	Imagem da planta <i>Dimmorphandra mollis</i>	9
<b>Figura 7</b>	Esquema de ligação da anexina-V à fosfatidilserina da membrana citoplasmática	15

## LISTA DE FIGURAS DOS ARTIGOS

### ARTIGO 1

<b>Fig.1</b>	Arborinine.	29
<b>Fig.2</b>	Effect of arborinine on IL-10 production by spleen and thymus cells treated with 10nM, 1 $\mu$ M or 10 $\mu$ M of arborinine and stimulated with ConA, LPS or PWM for 48 or 72 hours.	30
<b>Fig.3</b>	Effect of arborinine on IFN- $\gamma$ production by spleen and thymus cells treated with 10nM, 1 $\mu$ M or 10 $\mu$ M of arborinine and stimulated with ConA, LPS or PWM for 48 or 72 hours.	31
<b>Fig.4</b>	Effect of arborinine on the mitogenic response of murine splenocytes and thymocytes.	32
<b>Fig.5</b>	Effect of arborinine on apoptosis and necrosis of murine splenocytes and thymocytes.	33
<b>Fig.6</b>	Effect of arborinine on IL-10 and IFN- $\gamma$ production and lymphoproliferation of spleen and thymus cells stimulated by ConA for 48 or 72 hours.	34
<b>Fig.7</b>	Effect of arborinine on IL-10 and IFN- $\gamma$ production and lymphoproliferation of spleen cells stimulated by LPS for 48 or 72 hours.	35
<b>Fig.8</b>	Effect of arborinine on IL-10 and IFN- $\gamma$ production and lymphoproliferation of spleen and thymus cells stimulated by PWM for 48 or 72 hours.	36

**ARTIGO 2**

<b>Fig.1</b>	Rutin (quercetin 3- <i>O</i> -rutinoside).	48
<b>Fig.2</b>	Effect of rutin on IL-10 production by spleen and thymus cells treated with 10nM, 1μM or 10μM of rutin and stimulated with ConA, LPS or PWM for 48 or 72 hours.	49
<b>Fig.3</b>	Effect of rutin on IFN-γ production by spleen and thymus cells treated with 10nM, 1μM or 10μM of rutin and stimulated with ConA, LPS or PWM for 48 or 72 hours.	50
<b>Fig.4</b>	Effect of rutin on the mitogenic response of murine splenocytes and thymocytes.	51
<b>Fig.5</b>	Effect of rutin on apoptosis and necrosis of murine splenocytes and thymocytes.	52
<b>Fig.6</b>	Effect of rutin on IL-10 and IFN-γ production and lymphoproliferation of spleen and thymus cells stimulated by ConA for 48 or 72 hours.	53
<b>Fig.7</b>	Effect of rutin on IL-10 and IFN-γ production and lymphoproliferation of spleen cells stimulated by LPS for 48 or 72 hours.	54
<b>Fig.8</b>	Effect of rutin on IL-10 and IFN-γ production and lymphoproliferation of spleen and thymus cells stimulated by PWM for 48 or 72 hours.	54

## LISTA DE TABELAS DOS ARTIGOS

### ARTIGO 1

- Table 1** Effect of arborinine on the proliferation of murine splenocytes induced by different mitogens. 37
- Table 2** Effect of arborinine on the proliferation of murine thymocytes induced by different mitogens. 37
- Table 3** Effect of arborinine on the apoptosis and necrosis of murine splenocytes stimulated with different mitogens. 38
- Table 4** Effect of arborinine on the apoptosis and necrosis of murine thymocytes stimulated with different mitogens. 38

### ARTIGO 2

- Table 1** Effect of rutin on the proliferation of murine splenocytes induced by different mitogens. 55
- Table 2** Effect of rutin on the proliferation of murine thymocytes induced by different mitogens. 55
- Table 3** Effect of rutin on the apoptosis and necrosis of murine splenocytes stimulated with different mitogens. 56
- Table 4** Effect of rutin on the apoptosis and necrosis of murine thymocytes stimulated with different mitogens. 56

## LISTA DE ABREVIATURAS

arb:	Arborinina
ru:	Rutina
bcl-2	Proteína anti apóptótica, produto do proto-oncogene BCL-2 (B cell leukemia)
CCL <sub>4</sub> :	Clorofórmio
CD:	<i>Cluster of differentiation</i> (diferenciação de grupo)
Célula NK:	Célula <i>Natural Killer</i> (linfócito não-T e não-B)
Células Th:	Células T <i>helper</i> (células T auxiliaadoras)
ConA:	<i>Concanavalin A</i> (concanavalina A)
DMSO:	<i>Dimethylsulfoxide</i> (dimetilsulfóxido)
DNA:	<i>Desoxirribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
ELISA:	<i>Enzyme Linked Immunossorbent Assay</i> (ensaio imunoenzimático)
FIOCRUZ:	Fundação Oswaldo Cruz
FITC:	<i>Fluorescein isotiocianate</i> (isotiocianato de Fluorceína)
FLICE:	<i>FADD-like IL-1-converting enzyme</i> (enzima conversora de IL-1 tipo FAAD)
FLIP:	<i>FLICE/ caspase-8 inhibitory protein</i> (proteína inibidora de FLICE)
G-CSF :	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> (fator estimulador de colônia de granulócitos)
GDA:	<i>Glycerol diacyl</i> (Diacilglicerol - DAG)
GM-CSF :	<i>Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor</i> (fator estimulador de colônia de macrófagos/granulócitos)
H <sup>3</sup> -timidina:	Timidina marcada com trício
IFN:	Interferon
IL:	Interleukine (interleucina)
ICS:	Instituto de Ciências da Saúde
LAPEMM:	Laboratório de Pesquisas em Matéria Médica
LIF :	<i>Leucocyte migration-inhibitory factor</i> (fator inibidor de migração de leucócitos)
LPS:	<i>Lipopolyssacharide</i> (lipopolissacarídeo)
M-CSF :	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i> (fator estimulador de colônia de macrófagos)



MHC:	<i>Major Hystocompatibility Complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
NF $\kappa$ B :	<i>Nuclear factor <math>\kappa</math>B</i> (fator nuclear $\kappa$ B)
OMS:	Organização Mundial da Saúde
OVA:	Ovalbumina
PAMPs:	<i>Patogen associated molecular patterns</i> (Padrões moleculares associados a patógenos)
PI :	Propidium Iodide (iodeto de propídio)
PIP2 :	<i>Phosphatidyl inositol-3,4-diphosphate</i> (fosfatidil inositol-4,5-difosfato)
PIP3 :	<i>Phosphatidyl inositol-3,4,5-triphosphate</i> (fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato)
PKC:	<i>Protein Kinase C</i> (proteína cinase C)
PWM:	<i>Pokeweed mitogen</i> (mitógeno pokeweed)
RPMI:	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura)
SAC:	<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan-cepa I
SPSS :	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TLR:	<i>Toll Like Receptor</i> (receptor tipo Toll)
TNF:	Tumoral necrosis factor (fator de necrose tumoral)

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
2.	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	2
2.1.	GENERALIDADES SOBRE OS DIVERSOS PRINCÍPIOS ATIVOS DE PLANTAS MEDICINAIS.....	2
2.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS PLANTAS E DROGAS UTILIZADAS .....	3
2.2.1.	Alcalóides .....	3
2.2.2.	Arborinina.....	4
2.2.3.	<i>Erthela bahiensis</i> ( <i>E. trifolia</i> ou <i>Monnieria bahiensis</i> ).....	5
2.2.4.	Flavonóides.....	6
2.2.5.	Rutina .....	7
2.2.6.	<i>Dimmorphandra mollis</i> .....	9
2.3.	GENERALIDADES SOBRE OS ÓRGÃOS LINFÓIDES UTILIZADOS.....	10
2.3.1.	Baço .....	10
2.3.2.	Timo .....	10
2.4.	CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO DE DROGAS .....	11
2.4.1.	Estudos de efeitos sobre a proliferação celular .....	11
2.4.2.	Estudos de efeitos sobre a morte celular .....	13
2.4.3.	Estudos de efeitos sobre a produção de citocinas.....	15
3.	<b>HIPÓTESES</b> .....	18
4.	<b>OBJETIVOS</b> .....	18
5.	<b>RESULTADOS (ARTIGOS)</b> .....	19
5.1.	ARTIGO 1: ARBORININA.....	19

5.2.	ARTIGO 2: RUTINA.....	39
6.	<b>DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES</b> .....	57
7.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	59
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	60
	<b>ANEXO I</b> – Variáveis.....	65
	<b>ANEXO II</b> – Resumo esquemático dos resultados estatisticamente significativos.....	66
	<b>ANEXO III</b> –Distribuição dos dados referentes à ação das drogas na variação da produção das citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$ .....	66
	<b>ANEXO IV</b> - Dot Plots e histogramas utilizados na análise de citometria de fluxo .....	71
	<b>ANEXO V</b> - Resumo e certificado de participação em congresso I.....	73
	<b>ANEXO VI</b> – Resumo e certificado de participação em congresso II .....	74
	<b>ANEXO VII</b> - Valores comparativos das células não estimuladas em relação às células estimuladas .....	77

# 1. INTRODUÇÃO

O interesse pelos fitoterápicos e drogas farmacologicamente ativas extraídas de plantas medicinais vem crescendo a cada ano. Estima-se um incremento de 10 a 20% ao ano no mercado mundial de fitoterápicos. Isso se deve provavelmente à valorização do consumo de produtos naturais na busca de hábitos de vida mais saudáveis, aliada à descoberta de novos princípios ativos das plantas, sua comprovação científica e preço mais acessível que medicamentos obtidos sinteticamente (FUNBIO, 2004).

Não obstante, o desenvolvimento de um medicamento sintético que custa em torno de US\$500 milhões pode cair para US\$50 milhões quando se trata de um fitoterápico, sendo que este pode chegar ao mercado num tempo muito menor (FUNBIO,2004).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que cerca de 25% dos medicamentos prescritos no mundo são originados de plantas e que, nos países em desenvolvimento, 60 a 80% da população confia no poder terapêutico das plantas medicinais e se utiliza deles.

O Brasil concentra uma grande diversidade genética vegetal contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350-550.000 (SIMÕES et al., 2001). No entanto, acredita-se que apenas 15 a 17% das espécies vegetais do planeta tenham sido estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SIMÕES et al., 2001). Mesmo assim, o mercado mundial de fitoterápicos já movimentava US\$ 20 bilhões, dos quais US\$ 1,5 bilhões concentram-se no Brasil (FUNBIO, 2004). Desta forma, considerando-se o valor das plantas, estudos nesta área vêm tendo cada vez mais importância tanto por esses aspectos econômicos quanto pelos terapêuticos e sociais.

Este trabalho foi delineado com o propósito de avaliar os efeitos *in vitro* da arborinina e da rutina, drogas extraídas de plantas medicinais da flora brasileira, sobre células do sistema imune em modelo murino. É parte integrante do projeto “**Mecanismos de ação de drogas extraídas de plantas medicinais nativas da Bahia-Brasil - Estudo de efeitos in vitro sobre células normais e tumorais do sistema nervoso central e do sistema imunológico**” que envolve o Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde (Labimuno-ICS-UFBA), o Laboratório de Neuroquímica do ICS-UFBA, o Laboratório de Pesquisas em Matéria Médica da Faculdade de Farmácia da UFBA (LAPEMM-FFar-UFBA) e o grupo de pesquisas sobre plasticidade glial (U-421/INSERM) da Universidade de Paris XII-França.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. GENERALIDADES SOBRE OS DIVERSOS PRINCÍPIOS ATIVOS DE PLANTAS MEDICINAIS**

As plantas têm sido utilizadas como fontes de matéria prima tanto para a obtenção de adjuvantes (por exemplo, excipientes utilizados na formulação de medicamentos) quanto para a obtenção do fármaco (substâncias ativas isoladas) ou dos medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais, os fitoterápicos (REIS; MARIOT, 1999; SIMÕES et al., 2001).

Os princípios ativos dos vegetais estão relacionados ao seu metabolismo secundário, que compreende funções de adaptação ao meio, como variações climáticas e composição do solo, funções de competição com outros vegetais e de defesa contra parasitas. Além disso, cada parte da planta pode possuir princípios ativos diferentes sendo que algumas plantas chegam a possuir de 30 a 100 substâncias farmacologicamente ativas no seu interior. No entanto, para que produza todos os seus princípios ativos, a planta deve estar no seu ambiente de origem, sujeita às adversidades do meio e à competição com outras plantas (BOTSARIS, 2002).

Os principais grupos de princípios ativos, classificados de acordo com semelhanças químicas e estruturais, segundo Botsaris (2002), são os taninos, os óleos essenciais ou aromáticos, os alcalóides, os glicosídeos (dentre eles os glicosídeos flavonóides e os saponínicos), as mucilagens, gomas e substâncias pécicas, as substâncias resinosas, os pigmentos, os princípios amargos (quimicamente mal definidos) e as vitaminas.

Nos últimos anos, o interesse pelas substâncias farmacologicamente ativas provenientes de vegetais vem crescendo devido à sua utilização no tratamento de processos tumorais, infecciosos parasitários e virais. As várias famílias de drogas terapêuticas diferem no potencial toxicológico e terapêutico, anticancerígeno ou anti-infeccioso, através de diversos mecanismos que interferem nos processos biológicos, como a síntese protéica e mitose, no funcionamento e composição de enzimas e diferenciação celular (JUNG et al., 1999) e na indução de apoptose (THATTE et al., 2000), e têm sido avaliadas com relação aos seus efeitos genotóxicos, mutagênicos e recombinogênicos (FONSECA et al., 2004).

## 2.2. CARACTERIZAÇÃO DAS PLANTAS E DROGAS UTILIZADAS

### 2.2.1. Alcalóides

Os alcalóides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas predominantemente em angiospermas (BOTSARIS, 2002). Sua definição mais precisa foi feita por Pelletier, em 1985, como sendo uma substância orgânica cíclica que contém um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. São encontrados em tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos. Vários deles possuem efeito tóxico e é possível que exerçam uma função protetora na planta contra predadores, microrganismos e vírus, além de regulação do crescimento (HENRIQUES, 1999).

Alguns alcalóides têm sido introduzidos em estudos clínicos pela sua atividade antitumoral, baixa neurotoxicidade e potente atividade antioxidante (NG et al., 2000). O sulfato de vimblastina, sal de um alcalóide extraído da planta *Catharanthus roseus* G. Don., conhecida como vinca ou pervinca, tem sido utilizado no tratamento de alguns linfomas e carcinomas de mama e testículos com o nome comercial de Velbam (Lilly). Outros alcalóides têm mostrado atividade antialérgica e utilidade no tratamento da asma brônquica por estabilização da degranulação de mastócitos (GEETHA et al., 1981).

Alcalóides acridônicos, também denominados acridonas, tem sido relatados por sua atividade antitumoral. Os derivados altamente oxigenados também têm mostrado várias atividades fisiológicas como antimalárica, antiviral e antibiótica e muitos deles tem surgido do isolamento a partir de plantas. Acredita-se que a gama de efeitos fisiológicos das acridonas seja afetada, provavelmente, pela natureza e posição dos radicais hidroxil e metoxil (CHEN et al., 1997). Sabe-se, por exemplo, que grupos 1-hidroxil, 6-hidroxil e N-metil são necessários para a atividade anticâncer em derivados do alcalóide acridônico glifolina (SU et al., 1992 apud CHEN et al., 1997).

Algumas acridonas obtidas de raízes de plantas da família Rutaceae têm demonstrado efeito indutor de diferenciação de células HL-60, linhagem derivada de leucemia promielocítica humana, característica de leucemia mielóide aguda. Comparando-se o efeito de diferentes acridonas na diferenciação destas células, observou-se melhor eficiência daquelas que possuíam um grupo hidroxil no C-1, um grupo prenil em C-2 e ausência de metilação na amina secundária (KAWAII et al., 1999). O autor ainda cita a possibilidade de interação das acridonas com o DNA, por

intercalação, como sendo um dos seus possíveis mecanismos de ação nos seus diversos efeitos fisiológicos.

### 2.2.2. Arborinina

A arborinina (Fig.2) é um alcalóide acridônico derivado do ácido antranílico (Fig.1), um intermediário na biossíntese do L-triptofano, conhecida e identificada desde o início da década de 60 (JANUÁRIO, 1995). Apresenta-se sob a forma de cristais amarelos com características espectroscópicas de alcalóide acridônico. Foi isolada de *Erthela bahiensis*, espécie utilizada no presente trabalho, no Laboratório de Pesquisas em Matéria Médica (LAPEMM) - da Universidade Federal da Bahia, e descrita em outras espécies da família Rutaceae como a *Almeidea rubra* por JANUÁRIO (1995).

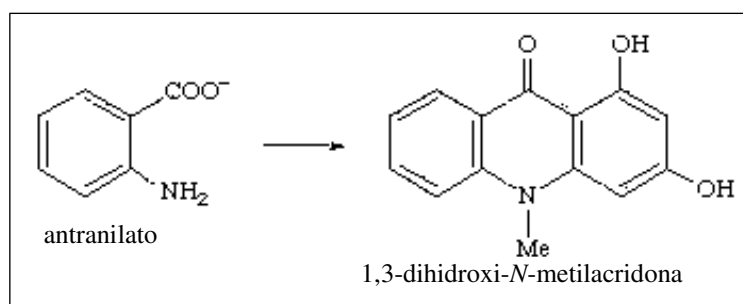


Fig.1 Estrutura química do ácido antranílico e de uma acridona. Estrutura adquirida em <http://www.chem.qmul.ac.uk> (Depto. de Química da Universidade de Londres)

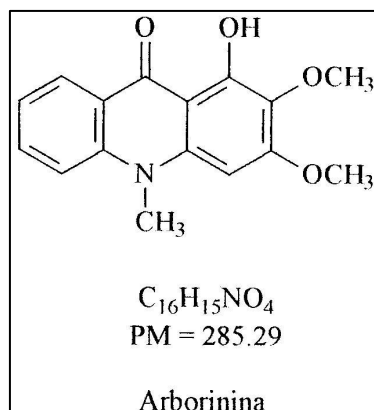


Fig.2 Estrutura química do alcalóide arborinina, fornecido pelo LAPEMM-UFBA

### 2.2.3. *Erthela bahiensis* (*E. trifolia* ou *Monnieria bahiensis*)

Denominada popularmente como maricutinha ou alfavaca-de-cobra, esta herbácea pertencente à Família Rutaceae, ocorre em matas úmidas e pode ser encontrada em diversas áreas do Estado da Bahia (Fig.3). Esta e várias outras espécies desta mesma família, foram pouco estudadas quanto à sua composição e ação biológica. É utilizada popularmente por suas indicações tradicionais como: diurética, antidiabética, emenagoga, expectorante e febrífuga (LAPEMM- UFBA).



Fig.3 Imagem da planta *Erthela bahiensis*. Fotografia registrada pela autora no herbário do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia-UFBA.



#### 2.2.4. Flavonóides

Os flavonóides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários vegetais. São conhecidos mais de 4200 flavonóides diferentes, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos vinte anos. Os flavonóides de origem natural apresentam-se freqüentemente oxigenados e um grande número conjugado com açúcares. Quando se encontra sem o açúcar é chamado de genina ou aglicona. Nas plantas, representam o pigmento amarelo de flores, folhas, sementes e frutos, funcionando como atraentes para polinização. Além de atuar na proteção contra a incidência de raios ultravioleta e visível, e contra insetos, fungos, vírus e bactérias, auxiliam no controle da ação de hormônios vegetais agindo, portanto, na vitalidade dos capilares, na diferenciação celular e no desenvolvimento de cotilédones e folhas (ZUANAZZI, 1999; BOTSARIS, 2002).

De acordo com as suas características estruturais, os flavonóides se classificam em flavonóis (como os citroflavonóis das frutas cítricas), flavonas (como os isoflavonóides da soja), flavanos (como as catequinas) e antocianidinas (como as proantocianidinas da uva e do vinho). Os flavonóides contêm em sua estrutura química um número variável de grupos hidroxil-fenólicos e excelentes propriedades de quelação do ferro e outros metais de transição, o que lhes confere uma grande capacidade antioxidante. A atividade antioxidante depende das propriedades “redox” de seus grupos hidróxi-fenólicos e da relação estrutural entre as diferentes partes da sua estrutura química (MARTINEZ-FLORES et al., 2002).

Além de seus efeitos antioxidantes, os flavonóides também apresentam uma gama de ação sobre o sistema imunológico. Alguns flavonóides foram descritos por sua ação anti-inflamatória ao prevenirem a supra-regulação de mediadores inflamatórios como IL-8, MCP-1 e ICAM-1 através do TNF- $\alpha$ , (YOUUDIM et al., 2002; WANG, 2002), ação inibitória sobre a expressão de óxido nítrico sintetase e sobre a formação de óxido nítrico em macrófagos estimulados por LPS (AUTORE et al. 2001) e ação inibitória *in vitro* da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pelos macrófagos e redução das LDL oxidadas (HIRANO et al., 2001).

Segundo diferentes autores, possuem também ação antiviral e antialérgica (MARTINEZ-FLORES et al., 2002), aumentam a efetividade de células NK (BAGCHI et al., 2002) e têm mostrado ação inibidora sobre o NF $\kappa$ B (BREMNER; HEINRICH, 2002; MURAOKA et al., 2002).

### 2.2.5. Rutina

A rutina pertence à classe dos Flavonóis (mais precisamente dos citroflavonóis) por possuir um grupo carbonila na posição 4 e um grupo hidroxila na posição 3 do anel C, e sua glicosilação (rutinosídeo) ocorre neste grupo, o que a caracteriza como um O-glicosídeo (Fig.4). É, portanto, também denominada de quercetina 3-O-rutinosídeo (Fig.5). A quercetina (porção sem glicosilação) possui as três características principais de um flavonóide: a presença de O-dihidroxi no anel B da estrutura catecol (Fig. 4), a presença de uma dupla ligação na posição 2,3 e a presença de grupos hidroxila na posição 3,5, sendo, portanto, um dos que melhor reúne os requisitos para exercer uma ação antioxidante efetiva (MARTÍNEZ-FLORÉZ et al., 2002). Os glicosídeos, no entanto, são mais solúveis em água e menos reativos frente a radicais livres que seu flavonóide respectivo.

A rutina pode ser isolada de várias espécies de plantas. Yuan et al. (2002) isolaram-na de *Glehnia littoralis* (G.)- Umb., Matura et al. (2002) encontraram rutina entre outras glicosídeo-quercetinas de *Petasites japonicus* subsp. *gigantea* (Kitam.), Gallati et al. (2003) atribuíram à rutina e outros flavonóides a ação antioxidante e antiulcerogênica de *Opuntia ficus indica* (L.)- Mill. e Baumgertel et al. (2003) destacaram a rutina como o flavonol glicosídeo dominante das folhas e flores de *Fagopyrum esculentum*.

No Brasil, a rutina tem sido extraída das favas de *Dimorphandra mollis* e comercializada sob a forma de um pó sem sabor e de cor amarelo-esverdeado, pela empresa PVP de Paraíba (PI); (<http://www.pvp.com.br>), pela empresa Merck de São Luís (MA) (<http://www.mercksa.com.br>) na sua forma pura ou em solução aquosa, e pela Sanrisil, de Itaquaquecetuba (SP). Estas três empresas faturaram juntas US\$ 11,2 milhões em 1996 só com a extração da rutina (HENRIQUES, 1996). A rutina tem sido utilizada como medicamento fitoterápico com a finalidade de diminuição da fragilidade capilar, melhor absorção da vitamina C e como coadjuvante no tratamento da hipertensão arterial (<http://www.diet-and-health.net>).

Além de promover aumento da lipase pancreática com conseqüente redução dos níveis de triacilgliceróis em ratos (LIMA et al., 1999) e atividade hepatoprotetora contra o paracetamol e CCL<sub>4</sub> em roedores (JANBAZ et al, 2002), a rutina tem sido descrita em eventos associados ao sistema imunológico como inibidora de neoplasia induzida por azoximetanol (DESCHNER et al., 1991) e supressora do estresse oxidativo em leucócitos na artrite reumatóide (OSTRAKHOVITCH; AFANAS'EV, 2001). Foi também citada como auxiliar no aumento da

atividade antibacteriana de outros flavonóides (ARIMA et al., 2002) e promotora da diminuição da permeabilidade de OVA em células Caco-2, um modelo de células do trato intestinal para estudo de permeabilidade a alérgenos, em estudo de prevenção de alergias a alimentos (KOBAYASHI et al., 2003).

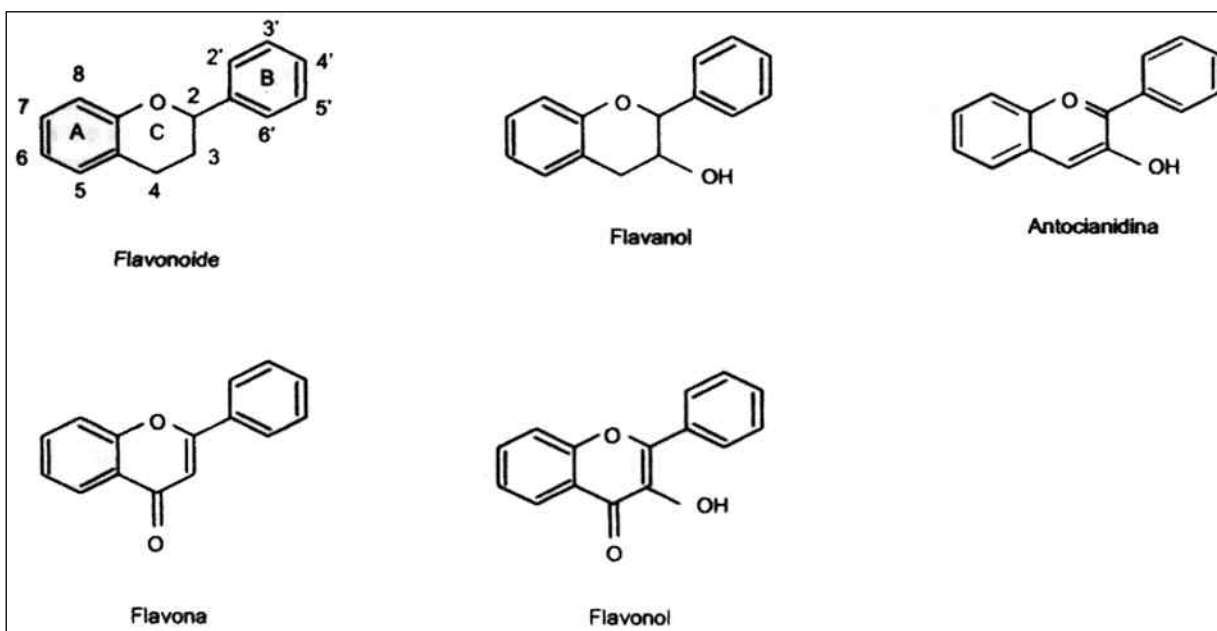


Fig. 4. Estrutura básica e tipos de flavonóides. Extraído de MARTINEZ-FLORES et al., 2002.

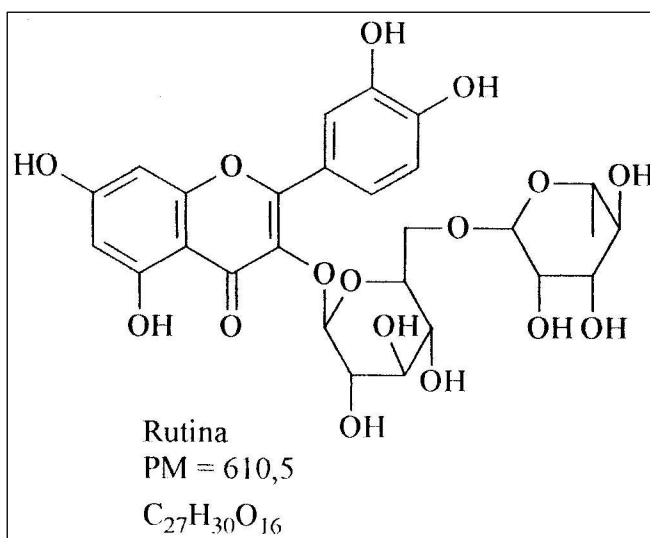


Fig. 5 Fórmula do flavonóide rutina (quercetina 3-O-rutinosídeo) fornecido pelo LAPEMM-UFBA

### 2.2.6. *Dimorphandra mollis* (Benth.)

Popularmente conhecida como faveira, barbatimão-falso ou fava d'anta, é uma árvore cuja altura varia de 8-14 m, de folhas compostas pinadas, com 6 -9 pares de folíolos de 10-12 mm de comprimento. Pertence à Família Leguminosae-Mimosoidae e encontra-se distribuída pela região do cerrado brasileiro desde São Paulo e Mato Grosso do Sul até o Pará (LORENZI, 1949) e na caatinga nordestina (HENRIQUES, 1996). Suas sementes de são ricas em polissacarídeos denominados galactomananos, quimicamente idênticos à goma-guar, matéria prima muito utilizada como espessante na indústria alimentícia e como invólucro de medicamentos, geralmente importada da Índia e Paquistão. O rendimento de goma das sementes de *Dimorphandra mollis* está entre os maiores já encontrados na natureza (<http://www.radiobras.gov.br>).

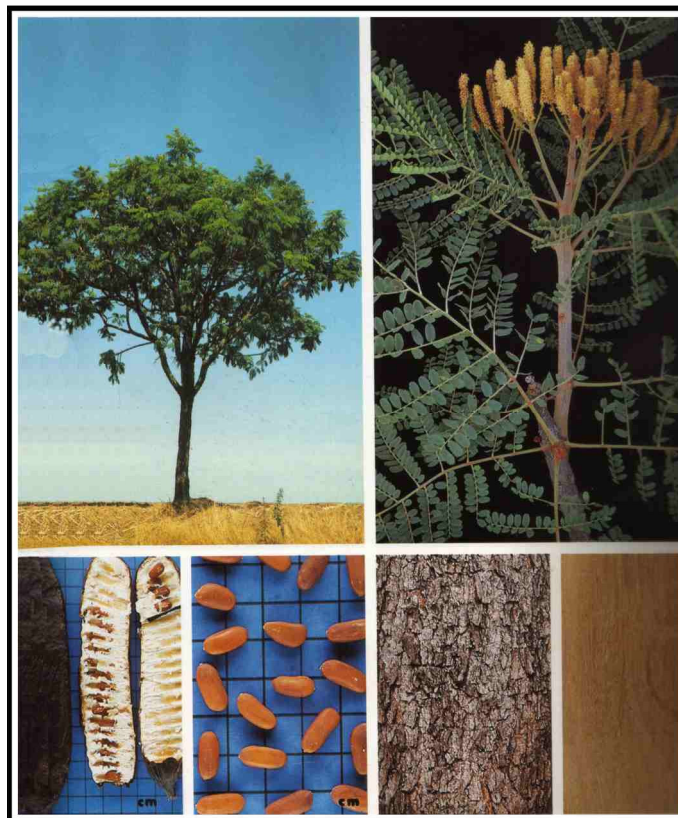


Fig. 6 Imagem da planta *Dimorphandra mollis* adaptada de LORENZI, 1999.

## **2.3. GENERALIDADES SOBRE OS ÓRGÃOS LINFÓIDES UTILIZADOS**

### **2.3.1. Baço**

O baço, órgão hematopoiético e hemocaterético, também considerado como órgão linfóide secundário, constituiu-se como um dos órgãos de iniciação e desenvolvimento das respostas dos linfócitos aos antígenos estranhos e é o sítio principal das respostas imunes aos antígenos provenientes do sangue. É irrigado por uma única artéria esplênica que penetra na cápsula do hilo e se divide em ramos progressivamente menores, cercados por trabéculas fibrosas de sustentação. As arteríolas são cercadas por bainhas linfóides periarteriolas (ricas em células T) que se aderem aos folículos linfóides (alguns contendo centros germinativos), ricos em células B, e ambos são cercados pela zona marginal (rica em células B e T CD4<sup>+</sup>). Estes tecidos linfóides densos constituem a polpa branca.

As arteríolas terminam em sinusóides vasculares entre os quais ficam espalhados eritrócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos esparsos e plasmócitos, constituindo a polpa vermelha. A ativação dos linfócitos B é iniciada nas zonas marginais adjacentes aos linfócitos T auxiliares das bainhas linfóides e, depois de ativados, migram para os centros germinativos ou para a polpa vermelha (HEINEN et al, 1988).

### **2.3.2. Timo**

O timo é um órgão linfóide primário com funções endócrinas que se situa no mediastino médio e é responsável pela maturação fenotípica e funcional dos linfócitos T, originados na medula óssea. Possui formato bilobado onde cada lobo é dividido em múltiplos lóbulos constituídos de uma região cortical e uma medular. O córtex contém uma coleção densa de linfócitos T, e a medula é mais escassamente povoada por linfócitos. Por todo o timo estão dispersas células epiteliais não linfóides, células dendríticas (DCs) e macrófagos. Na medula também são encontrados os corpúsculos de Hassal, estruturas espirais de células epiteliais, provavelmente remanescentes de células em degeneração.

Os linfócitos do timo, também chamados timócitos, são linfócitos T em vários estágios de maturação. O córtex tímico possui um maior número de células T imaturas que ainda, não expressam receptores para antígenos nem marcadores de superfície característicos de fenótipo maduro definido como CD4 ou CD8. Estas células, no seu trajeto intratímico, entram em contato com células epiteliais, DCs e macrófagos, sofrem seleção positiva e negativa e começam a

expressar receptores para antígenos e marcadores de superfície característicos células T maduras. Desta forma, a medula contém em sua maioria células definidas como T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, que saem maduras do timo para os órgãos linfóides periféricos, onde serão ativadas. Do grande número de células precursoras que entram no timo, a maioria morre por apoptose e apenas as células capazes de reconhecer o próprio e responder a antígenos estranhos são selecionadas para sobreviver (BREKELMANS, 1990).

## **2.4. CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO DE DROGAS**

A ação de componentes farmacológicos sobre as células pode resultar na ligação de um dado receptor de superfície desencadeando ou regulando uma determinada atividade bioquímica que resulte na ativação ou proliferação celulares ou então na ação direta sobre membranas e organelas citoplasmáticas ou sobre o material genético (genotoxicidade), com conseqüente alteração do ciclo celular, lesão e morte da célula. Desta forma, diferentes estudos têm sido realizados para avaliar a ação das drogas sobre células e tecidos.

### **2.3.1. Estudos de efeitos sobre a proliferação celular**

A ativação celular em decorrência de um estímulo pode gerar sinais positivos ou negativos às células, alterando sua proliferação ou funções. Utiliza-se em Imunologia, como modelo de estudo de linfoproliferação, a ativação com diferentes estímulos, específicos ou inespecíficos.

Ligações específicas entre o receptor de superfície de um linfócito e seu ligante desencadeiam sinais intracelulares que se iniciam por interações membrana-citoesqueleto seguido de ativação da fosfolipase C e hidrólise do fosfatidil inositol 4,5,difosfato (PIP<sub>2</sub>) em fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (GDA) gerando aumento da concentração de cálcio citoplasmático com conseqüente ativação da proteína cinase C e ativação gênica. Tal processo de sinalização pode promover uma série de modificações nos linfócitos como redistribuição e expressão de novos receptores de superfície, secreção de linfocinas e ou anticorpos, motilidade celular, interações célula-célula ou divisão celular (FLETCHER et al., 1997). Esta habilidade dos linfócitos de responderem a ligantes particulares também *in vitro* faz da linfoproliferação uma ferramenta muito útil para o estudo da atividade celular.

Várias moléculas têm sido utilizadas como simuladores ou substitutos antigênicos de células B e T. Os mitógenos derivados de plantas se ligam a grupos de carboidratos na membrana de

diferentes células como os linfócitos B e T. Entre elas encontram-se as lectinas phytohemaglutinina (PHA) e concanavalina A (ConA), extraídas de leguminosas e que estimulam preferencialmente células T, e o pokeweed (PWM), extraído de *Phytolacca americana*, um mitógeno estimulador tanto de células B quanto T. Outros mitógenos comumente utilizados são os produtos bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS) e o SAC (da cepa I de *Staphylococcus aureus* Cowan), ambos estimulantes de células B. Já o toxóide tetânico e antígenos de *Candida albicans* são antígenos utilizados em estudos para o estímulo de células T (FLETCHER et al., 1997).

Os lipopolissacarídeos são moléculas anfipáticas presentes em alguns microrganismos, como bactérias gram-negativas. A ativação das células pelo LPS pode ocorrer através da associação dele tanto ao complexo receptor BCR das células B quanto a receptores tipo Toll (TLR) presentes em diferentes células do sistema imune, incluindo macrófagos e células dendríticas. Os TLR reconhecem uma ampla variedade de ligantes, chamados padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e esta interação pode ativar tanto células B quanto T (MEDZHITOV, 2001).

As diferenças de ação dos mitógenos estão provavelmente associadas a mudanças nos eventos iniciais da transdução de sinal após a ligação da lectina (ASHRAF; KHAN, 2003) e, no caso do LPS de *E. coli*, na cascata iniciada pela ligação do LPS ao TLR4 que pode envolver CD14 e proteínas ligantes de LPS (LBP), além de uma série de proteínas acessórias como MD2, MyD88, IRAK e TRAFs (MEDZHITOV, 2001).

Devido ao fato de que os linfócitos proliferam somente em resposta a determinados estímulos, a medida da proliferação tem sido amplamente aplicada em Imunologia Clínica para descrever anormalidades associadas a imunodeficiências congênitas, câncer, envelhecimento, doenças infecciosas, desnutrição, estresse, choque e doenças autoimunes (FLETCHER et al., 1997), bem como na pesquisa terapêutica de tais desordens.

A capacidade que alguns flavonóides possuem de interferir na linfoproliferação induzida por mitógenos e antígenos, tem sido documentada por alguns autores (MIDDLETON et al., 2001; CERQUEIRA et al., 2003). Alcalóides, inclusive acridonas, têm mostrado efeito antiproliferativo em várias linhagens de células tumorais como HL-60 (KAWAII et al., 1999) e a vimblastina tem sido descrita por seu efeito *in vitro* de retenção do ciclo celular na metáfase (Lilly-IFD 15 mar 92/MS 0161 0024).

#### **2.4.2. Estudo de efeitos sobre a morte celular**

Os principais tipos de morte celular descritos na literatura nos últimos anos são a apoptose e a necrose, dois distintos modelos funcionais caracterizados por diferentes alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares. A apoptose, também chamada de morte celular programada, compreende uma cascata de eventos bioquímicos representados por caspases que levam à auto-aniquilação da célula (ZBIGNIEW et al., 1997). Suas mudanças morfológicas mais características são a retração da célula, condensação da cromatina e a formação de “corpos apoptóticos”, estruturas nas quais se encontram empacotados os fragmentos nucleares e constituintes do citoplasma (FIERS et al., 1999).

Outras duas características importantes da apoptose são a degradação internucleossomal do DNA pela ativação de endonucleases e a inicial preservação da integridade e funcionalidade das organelas citoplasmáticas e da membrana plasmática. O que ocorre na membrana é apenas uma mudança na distribuição dos seus fosfolípidos. A fosfatidilserina, que se encontra na face interna da membrana citoplasmática, sofre translocação e passa a ser exposta na face externa da membrana da célula apoptótica. A célula apoptótica é, então, reconhecida e fagocitada por células vizinhas, normalmente macrófagos, sem que se desencadeie uma resposta inflamatória no tecido (ROBBINS, 2000).

Durante o desenvolvimento embrionário, a morte celular programada é responsável pelo modelamento dos tecidos e órgãos e, após o parto, desempenha um papel crucial no crescimento e involução tissular induzido por hormônios. No sistema imune, constitui um processo chave no desenvolvimento de imunidade celular e autotolerância por promover mecanismos de seleção clonal de células imunocompetentes e deleção de células auto-reativas. Desta forma, falhas nos mecanismos regulatórios de apoptose podem levar ao desenvolvimento de doenças auto-imunes e câncer (ZBIGNIEW et al., 1997).

Os eventos moleculares da apoptose se iniciam por vias sinalizadoras transmembrânicas (ligação de hormônios, fatores de crescimento, citocinas e receptores de morte específicos como o TNF e Fas-L) ou intracelulares (glicocorticóides e agentes físico-químicos). Em seguida, alguns estímulos (como as granzimas das células citotóxicas) ativam diretamente caspases executoras, enquanto outros atuam através de proteínas adaptadoras e caspases desencadeantes ou de eventos mitocondriais que envolvem o citocromo c. O controle e a regulação desta etapa são



influenciados por membros da família Bcl-2 de proteínas que podem inibir ou promover a morte da célula. Numa próxima etapa, caspases executoras comuns ativam endonucleases citoplasmáticas latentes e proteases que degradam proteínas do citoesqueleto e do núcleo gerando no final a formação dos corpúsculos apoptóticos (ROBBINS, 2000).

Proteínas anti-apoptóticas como o FLIP (proteína inibitória de FLICE/ caspase-8) foram identificadas recentemente e sua expressão parece ser fortemente regulada em células T, podendo estar envolvida no controle tanto da ativação como da morte destas células. Desta forma, a expressão anormal de FLIP pode ter um papel muito importante nas doenças auto-imunes bem como no desenvolvimento de tumores e desordens cardiovasculares (THOME; TSCHOPP, 2001). Sabe-se também que a mudança no grau de malignidade durante a progressão de muitos tumores está associada a alterações na expressão de genes reguladores da apoptose como o bcl-2 (ZBIGNIEW et al., 1997).

Diversas drogas extraídas de plantas medicinais tem sido alvo de crescentes pesquisas por sua possível ação nos mecanismos de apoptose. A homoharingtonina (HTT), um alcalóide de origem vegetal, tem sido utilizada no tratamento de leucemias agudas e crônicas e sua atividade antileucêmica parece estar relacionada à indução de apoptose (LOU et al., 2004). YI et al. (2004) sugerem que a apoptose induzida por alcalóides de vinca esteja relacionada à via de sinalização do NFκB. O flavonóide quercetina também demonstrou induzir apoptose em diversas linhagens de células tumorais (WEI et al., 1994).

Por outro lado, a necrose é caracterizada por expansão ou inchaço da célula e de suas organelas, seguida de ruptura precoce da membrana plasmática e liberação do conteúdo citoplasmático na matriz extracelular que leva a uma reação inflamatória no tecido (FIERS et al., 1999).

Atualmente, com estas diferenças morfofuncionais, se estabeleceram bases para a detecção dos dois modelos de morte celular. A ruptura da membrana plasmática que ocorre no início da necrose é detectada pela inclusão de fluorocromos carregados como o Iodeto de Propídeo (PI). Já a fosfatidilserina, presente na face externa da membrana citoplasmática das células apoptóticas, tem sido detectada pela anexina V (Fig.7) que, conjugada com Isotiocianato de Fluoreína (FITC), evidencia um evento inicial da morte celular por apoptose. As células se tornam reativas à anexina V após a condensação da cromatina e antes da perda de habilidade da membrana de excluir marcações catiônicas como o PI (ZBIGNIEW et al., 1997).

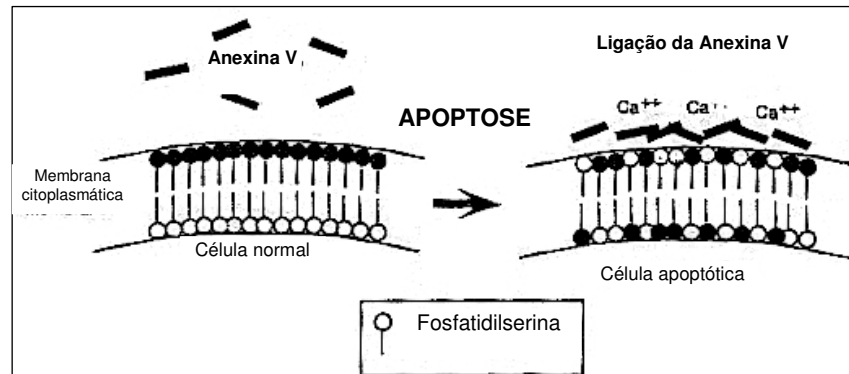


Fig. 7 Esquema de ligação da Anexina-V à fosfatidilserina da membrana citoplasmática  
 Fonte: Manual Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (R&D Systems)

#### 2.4.3. Efeitos sobre a produção de citocinas

Mudanças no delicado equilíbrio do sistema imunológico se refletem em mudanças nos níveis de citocinas plasmáticas ou séricas. Alterações na habilidade em produzir citocinas apropriadas ou de células alvo em responder apropriadamente via receptor de citocina de membrana tem implicado na patogênese de muitas doenças, não somente de deficiências imunes congênitas mas também de doenças autoimunes, câncer, alergias, e doenças reumáticas (ROSSIO, 1997).

As citocinas são glicoproteínas ou peptídeos de baixo peso molecular produzidas por diferentes tipos celulares e essenciais na modulação da atividade celular. Podem atuar de maneira autócrina, parácrina ou endócrina, apresentando diversos efeitos em diferentes tecidos e tipos celulares. Para tal, possuem receptores de membrana nas células alvo aos quais se ligam e desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular que pode levar à síntese de novos receptores, expressão de diferentes moléculas, produção de outras citocinas, ativação ou morte celular, entre outros eventos.

As citocinas têm sido classificadas de acordo com sua função biológica, como fatores de crescimento para células T (IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15), como fatores de crescimento para células B (IL-4, IL-6, IL-14), como citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), como citocinas de ação inibitória (IL-10, IL-13, IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) ou antiviral (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), como fatores de crescimento e diferenciação hematopoiética (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, LIF), como agentes quimiotáticos e como fatores citotóxicos-citostáticos (ROSSIO, 1997).

Aproveitando-se destas características, a dosagem das citocinas em alguns modelos experimentais tem sido amplamente utilizada para a determinação e caracterização da atividade biológica das células, sob estímulo positivo ou negativo.

Outra classificação usada atualmente leva em consideração o perfil da resposta imunológica induzida pelas células T. O mesmo precursor de uma célula Th ( $CD4^+$ ) pode se diferenciar em um perfil Th1 ou perfil Th2, dependendo do micro ambiente em que se encontra. A IL-12 e o IFN- $\gamma$  estão envolvidos no direcionamento para o perfil Th1, enquanto que a IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 promovem o direcionamento para o perfil Th2. Estas duas subpopulações de células se diferenciam não por marcadores de superfície, mas sim, pelo tipo de citocinas que produzem, resultando em respostas imunológicas diferentes (LIEW, 2002).

O perfil de citocinas Th1 está envolvido preferencialmente na eliminação de patógenos intracelulares e imunidade órgão específica, enquanto que o Th2 se caracteriza pela produção de citocinas essenciais na ativação de resposta humoral alérgica e anti-helmíntica. Além disso, as citocinas produzidas no perfil de resposta Th1 e Th2, podem atuar tanto como fatores de crescimento autócrino, quanto como fator inibitório para a subpopulação oposta (LIEW, 2002), caracterizando o efeito antogônico dos dois perfis. Desta forma, a caracterização do perfil de citocinas tem sido extremamente útil na identificação do tipo de resposta imunológica frente a diferentes estímulos (PESTKA et al., 2004).

Particularmente a IL-10 e o IFN- $\gamma$ , bem como a IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 e IL-26 fazem parte da mesma família de citocinas, as citocinas  $\alpha$  hélices de classe 2. A interação destas citocinas com seus receptores específicos inicia uma ampla e variada gama de sinais que induzem resposta antiviral, modulam a resposta inflamatória, inibem ou estimulam fatores de crescimento, promovem ou inibem apoptose e afetam muitos mecanismos imunológicos (PESTKA et al., 2004).

A IL-10 pode ser produzida por células T  $CD4^+$ , T  $CD8^+$ , macrófagos ativados, células NK, células dendríticas, micróglia, queratinócitos, células hepáticas estrelares e células B (VARNEY et al, 1999; DAFTARIAN et al, 1996). Quando se liga a seu complexo receptor, pode desencadear uma série de mecanismos inibitórios como: bloqueio na produção de algumas citocinas e quimiocinas, bloqueio na expressão de algumas moléculas co-estimulatórias como CD80, CD86 e MHC de classe II com conseqüente inibição da capacidade de apresentação de antígeno por macrófagos e células dendríticas, diminuição da magnitude de ativação e de

produção de citocinas concorrente por células T e inibição da produção de outras citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  e IL-4. Além disso, estudos recentes têm demonstrado que a IL-10 pode promover o desenvolvimento de células B1 e a sobrevivência de células B, T e NK e paradoxalmente, induzir a apoptose em leucemia crônica de células B. Recentemente foi descoberto que a deleção do gene para IL-10 em camundongos pode resultar na falha do controle da magnitude da resposta imune (provavelmente sua função mais importante), aumento da resposta Th1 e conseqüente aumento da eliminação de infecções bacterianas, fúngicas e por toxoplasma com resposta alérgica e asmática exageradas. Novos estudos também têm relacionado a presença de IL-10 na diferenciação de células T regulatórias tipo 1 (Treg) reforçando seu papel imunossupressivo (PESTKA et al., 2004).

Por outro lado, o Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) tem sido descrito como uma citocina pró-inflamatória central na resistência a infecções por patógenos intracelulares. Indivíduos que possuem mutações nos receptores dos genes de IFN- $\gamma$  são conseqüentemente mais susceptíveis a agentes infecciosos, inclusive espécies de salmonella e micobactéria. Apesar de ser produzido principalmente por células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e células NK seus receptores são encontrados em quase todas as células, onde são capazes de ativar diversas respostas antimicrobianas. Estima-se que esta citocina regule a expressão de mais de 1200 genes relacionados com a produção de proteínas envolvidas na criação de uma barreira efetiva contra patógenos. Portanto, diversos mediadores imunológicos, como a óxido nítrico sintase 2 (NOS2) e a fagócito oxidase (gp91-phox), podem ser regulados pelo IFN- $\gamma$ . Sua ação se dá também sobre a regulação da expressão de P47 GTPases, proteínas envolvidas na sinalização intracelular de combate a patógenos, provavelmente relacionadas com a maturação e função dos fagossomos (TAYLOR et al., 2004).

Modelos de ativação celular que mimetizam os eventos de infecções com liberação de citocinas *in vitro*, auxiliam os estudos de atividade e efeitos de drogas em estágios iniciais para determinação do seu perfil de ação celular e tecidual.

A partir destes dados bibliográficos, é possível estudar o efeito de drogas sobre células estimuladas em estado de proliferação celular ou em repouso, o que representa diferentes momentos de ativação de tipos celulares distintos em estudos de triagem inicial de ação de drogas.

### 3. HIPÓTESES

**H<sub>1</sub>**: O alcalóide arborinina extraído da *Ertela bahiensis* altera a funcionalidade e a viabilidade de células do Sistema Imune sob estímulo inespecífico.

**H<sub>2</sub>**: O flavonóide rutina extraído da *Dimorphandra mollis* altera a funcionalidade e a viabilidade de células do Sistema Imune sob estímulo inespecífico.

**H<sub>0</sub>**: O alcalóide arborinina extraído da *Ertela bahiensis* e o flavonóide rutina extraído da *Dimorphandra mollis* não alteram a funcionalidade, viabilidade ou integridade de células do Sistema Imune sob estímulo inespecífico.

### 4. OBJETIVOS

#### GERAL

Estudar o efeito *in vitro* da **arborinina**, alcalóide extraído da *Ertela bahiensis*, e da **rutina**, flavonóide extraído da *Dimorphandra mollis*, plantas medicinais nativas da Bahia-Brasil, sobre a funcionalidade e a viabilidade de células do sistema imunológico.

#### ESPECÍFICOS

1. Observar o efeito *in vitro* da **arborinina** e da **rutina** sobre a proliferação celular e produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 por células do sistema imunológico (timócitos e esplenócitos) no modelo murino, em presença e ausência de estímulo mitogênico.

2. Estudar o efeito *in vitro* da **arborinina** e da **rutina** sobre a indução ou inibição de apoptose e/ou necrose de células do sistema imunológico (timócitos e esplenócitos) no modelo murino, em presença e ausência de estímulo mitogênico.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ARTIGO 1

Submetido ao periódico *Life Sciences*

#### **Different effects of arborinine alkaloid obtained from Brazilian *Erthela bahiensis* on spleen and thymus cells stimulated in vitro with different mitogens**

**Roseghini, R.<sup>a</sup>**; Moreira, P.<sup>a</sup>; Vale, V.<sup>a</sup>; Pinheiro, A.M.<sup>a</sup>; Costa, J.F.O.<sup>c</sup>; Bittencourt, T.<sup>d</sup>; Nascimento, I.<sup>a</sup>; Schaer, R.<sup>a</sup>; Velozo, E.<sup>b</sup>; El-Bachá, R.<sup>a</sup>; Meyer, R.<sup>a</sup>; Freire, S.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia (PPGIm-UFBA)

<sup>b</sup>Faculdade de Farmácia- Universidade Federal da Bahia

<sup>c</sup>Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM- FIOCRUZ-BA)

<sup>d</sup>Faculdade de Veterinária- Universidade Federal da Bahia

#### **ABSTRACT**

The present study has examined the effects of arborinine, an alkaloid obtained from ***Erthela bahiensis*** a Brazilian plant popularly used as diuretic, antidiabetic, antithermic and expectorant, on the viability and function of immune system cells **in vitro** using a murine model. Rat spleen and thymus cells were cultured with 10nM, 1µM e 10µM of the drug in the presence or absence of PWM, LPS or ConA mitogens. Cellular proliferation was analyzed by H<sup>3</sup>-thymidin uptake after 48 and 72 hours. Viability was measured by flow cytometry using Annexin V and PI after 24 and 48 hours. IFN-γ and IL-10 were measured by ELISA in the supernatant culture after 48 and 72h.

Our results showed an inhibitory effect of arborinine on splenocytes proliferation under ConA or PWM stimulation and increased apoptosis on splenocytes and thymocytes stimulated with PWM in 24h. A decrease was observed on IFN-γ production by ConA or LPS stimulated splenocytes in 48h and 72h and ConA or PWM stimulated thymocytes in 72h. In contrast, an increase on lymphoproliferation was observed on LPS stimulated splenocytes and ConA or PWM stimulated thymocytes in 48h. On this period, apoptosis decreased on LPS or PWM stimulated splenocytes and IFN-γ production increased in PWM stimulated thymocytes. Arborinine also induced a decrease on IL-10 production by splenocytes and thymocytes stimulated with ConA or PWM. There was no significant variation on the necrosis rate of the cells treated with arborinine or any change on their viability or function values in the absence of mitogenic stimulus.

Keywords: arborinine; alkaloids; acridones; mitogens; apoptosis

## Introduction

An increasing number of patients are resorting to alternative medicine to complement conventional care. In Brazil, more than 30% of the population uses products from natural origins, especially from medicinal plants, for therapeutic purposes (Reis and Mariot, 1999). Some alkaloids extracted from plants have been introduced into clinical use because of their low toxicity and antioxidant activity allied to their antitumoral effects (Ng et al., 2000). An example is the alkaloid extracted from **Catharanthus roseus** G. Don., known as vinca, which has been used in the treatment of some lymphomas and breast carcinomas for its apoptosis induction (Yi et al., 2004). Other alkaloids have been shown to be useful in the treatment of asthma by its effect on mast cell stabilization (Geetha et al., 1981).

Also the use of acridones, alkaloids derived from anthranilate, has been reported due to their antitumoral activity and highly oxygenated acridones have shown antiviral, antibiotic and antimalarial activity. The range of their physiologic effects is intimately affected by the nature and position of the hydroxy and methoxy constituents (Chen et al, 1997). In addition, some acridone extracted from plants of the Rutaceae family have shown antiplasmodial activity in rodent models of malaria (Queener et al., 1991) and induction of differentiation of HL-60 cells, derived from promyelocytic human leukemia (Kawaii et al., 1999).

Arborinine (Fig.1) is an acridone alkaloid isolated from **Erthela bahiensis** (Rutaceae), a typical plant from the Brazilian Northeast region. This tropical herb has been popularly used as a diuretic, antidiabetic, antithermic and expectorant but there are just a few studies of its biological effects, especially on the immune system cells.

The present study has examined the **in vitro** effects of three different concentrations of arborinine on spleen and thymus cells stimulated or not with three distinct mitogenic stimuli. Cell viability was evaluated by apoptosis and necrosis induction and cell function was measured by proliferation and cytokines production. In order to understand alkaloid action on T- and B-cell populations, distinct mitogens were used: concanavallin A (ConA), a selective T-cell mitogen; pokeweed (PWM), a T- and B-cell mitogen (Ashraf and Khan, 2003) and lipopolysaccharide (LPS), known to activate preferentially B cell response (Medzhitov, 2001).

## Materials and Methods

### *Arborinine*

It was extracted with hexan from the stem and the leaves of **Erthela bahiensis** and purified (minimum 90% purity) by chromatography with dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and methanol (95:5), in LAPEMM-FFar-UFBA. Then, it was solved with dimethyl sulfoxide (DMSO) to 10mM and stored at -20°C. Subsequent dilutions were done in RPMI-1640 L-glutamine medium supplemented with 2-mercaptoethanol 5x10<sup>-5</sup> M and 2% of NaHCO<sub>3</sub>.

### *Reagents*

RPMI-1640, concanavalinA, pokeweed mitogen (PWM) from **Phytolacca americana**, LPS from **E. coli** and [<sup>3</sup>H]-thymidine were obtained from Sigma. Foetal Bovine Serum (FBS) and PSN Antibiotic mixture were purchased from Gibco Invitrogen Corporation. Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit and ELISA Duo Set Rat IL-10 were from R&D Systems. OptEia<sup>TM</sup>Rat IFN-γ Set was obtained from BD Biosciences and the dexamethasone used was Decadron<sup>TM</sup> from PRODOME.

### *Rat spleen and thymus cells and culture condition*

Male Wistar rats (200-260g) from the Biotery of Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)-Bahia were submitted to an ether chamber for previous anesthesia and surgery. Spleen and thymus were removed, in sterile conditions, and macerated in Petri dishes with RPMI-1640 L-glutamine medium supplemented with 2-mercaptoethanol 5x10<sup>-5</sup> M, 2% of NaHCO<sub>3</sub>, 10% of FBS and 1% of PSN Antibiotic mixture. Cells were adjusted to 2x10<sup>6</sup>cells/ml and cultured in supplemented RPMI as an adapted protocol from Bustamante et al. (1995) and Petit et al. (1995).

Spleen and thymus cells were cultured with pokeweed mitogen (PWM-5μg/ml), concanavalinA (ConA-10μg/ml) or lipopolysaccharyde (LPS-5μg/ml) plus three distinct concentrations of arborinine (10nM, 1uM or 10uM) and incubated for 24, 48 or 72 hours at 37°C. These periods were determined during our initial assays. The 24h and 48h periods were chosen to be suitable for apoptosis and necrosis evaluation. The 48 and 72h periods represent the peaks of proliferation



and cytokine production obtained by our group. Controls were non-stimulated cells (cells plus DMSO or arborinine) and non-treated cells (cells plus DMSO and mitogen).

*Proliferation assay by [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation*

The effect of arborinine on spleen and thymus cells proliferation induced by ConA, PWM or LPS was determined by [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation. After mitogens and arborinine addition, cells were incubated into 96-well plates in triplicate for 48 or 72 hours at 37°C. In the last 18 hours, 1uCi/200μl of [<sup>3</sup>H] thymidine was added to the culture. At the end of incubation cells were collected in a glass fiber filter (Packard) using a cell harvester (Filtermate 196, Packard, Meriden, CT, EUA) and allowed to dry for 24 hours.

Incorporation of radioactive thymidine was determined by gas scintillation in a Direct Beta Counter (Packard, Meriden, CT, EUA). Stimulation index (SI) was calculated dividing arborinine treated cells counts per minute (cpm) by non-treated cells cpm as in the following formula:

$$SI = \frac{\text{mean of treated cells cpm}}{\text{mean of non-treated cell cpm}} \quad (1)$$

*Enzyme Linked immunosorbent assays (ELISAs) for cytokines*

Interferon-γ and interleukin-10 were measured in the supernatant of splenocytes and thymocytes cultures by sandwich ELISA. Cells were cultured in 24 well plates in the presence or absence of arborinine and mitogens mentioned above for 48 and 72 hours at 37°C. Concentrations of cytokines were determined comparing values of standard curves obtained using recombinant cytokines in both systems, following kit recommendations.

Results are shown as percentage of increase or decrease comparing to the control calculated by the following formula:

$$\% \text{ of control} = \frac{\text{treated cells cytokine concentration (pg/ml)}}{\text{non-treated cell cytokine concentration (pg/ml)}} \times 100 \quad (2)$$

### *Flow cytometry analysis for apoptosis and necrosis*

The detection of phosphatidylserine on the cell surface was performed using Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit. Non-treated and treated cells were cultured for 24 or 48 hours in 24 well plates. Then, approximately  $1 \times 10^6$  cells were resuspended with 100 $\mu$ l of binding buffer containing Annexin V-FITC (0,125 $\mu$ g/ml), propidium iodide (5 $\mu$ g/ml), H<sub>2</sub>O and annexin buffer, following kit recommendations. After 15 min of incubation at room temperature in the dark, cells were analyzed by flow cytometry in a FACSort BD (US-BD Biosciences Clontech).

For the positive control of apoptosis, cells were incubated with dexamethasone (100nM) as described by Renner et al. (2002). At least 10,000 events were recorded and the results are shown as percentage of apoptosis or necrosis comparing to the control. The higher concentration of arborinine (10 $\mu$ M) was tested on this assay.

The present study was designed to investigate whether arborinine exerted antiproliferative or stimulating effects on murine immune system cells by inducing apoptosis or necrosis. Results are expressed as median percentage of apoptosis or necrosis variation comparing with non-treated control (considered as 100).

### *Statistics*

All data were expressed as median and the significance of differences between control and treated samples medians was evaluated by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests using statistical software SPSS 12.0 for Windows.  $P < 0.05$  data were considered statistically significant.

## **Results**

The final concentration of dimethyl sulfoxide (1 $\mu$ l/ml) was shown in control experiments to have no significant effect on analysed parameters compared to that cells that did not receive the diluent.

### *Effects of arborinine on spleen and thymus cells functions*

Three concentrations of arborinine and two different times of incubation were studied in order to conduct a dose-response study and to evaluate the effect of this alkaloid on the cytokine production. Data are expressed as median percentage of variation on cytokine production compared to control (stimulated and non-treated cells), considered as 100.

Arborinine did not affect IL-10 or IFN- $\gamma$  production by non-stimulated cells in any of the concentrations tested (not shown data).

#### ***Percentage variation on IL-10 production***

A decrease of IL-10 (fig. 2) was observed with two concentrations of the drug and at two different times (48 and 72h). In ConA stimulated cells, arborinine at 10 $\mu$ M, induced a decrease on IL-10 production by splenocytes (27%) in 48h. Under the same stimulus, arborinine induced a decrease on IL-10 production by thymocytes at 1 $\mu$ M (38%) and 10 $\mu$ M (20%), in 48h, and at 10 $\mu$ M (25%), in 72h.

In PWM stimulated cells, arborinine at 10 $\mu$ M induced a decrease on IL-10 production by splenocytes (30%), in 48h, and by thymocytes at 1 $\mu$ M (23%) and at 10 $\mu$ M (54%), in 72h.

#### ***Percentage variation on IFN- $\gamma$ production***

A decrease of IFN- $\gamma$  production (fig 3) was observed with three different arborinine concentrations in a time and stimulus dependent manner, except for the enhancement on this cytokine level by splenocytes stimulated with PWM for 48h.

After 48h of incubation, a small decrease on IFN- $\gamma$  production it was observed in splenocytes stimulated with ConA and treated with 1 $\mu$ M (2%) or 10 $\mu$ M (2%) of arborinine and after 72h, on these cells treated with 10 $\mu$ M of the drug (2%).

A bigger decrease was observed in these cells stimulated with LPS and treated with arborinine at 10 $\mu$ M in 48h (25%) and in 72h (30%).

As mentioned, in 48h, it was observed an increase of 25% on IFN- $\gamma$  production by thymocytes stimulated with PWM and treated with 10nM of arborinine. By other side, in 72h, it was observed

a decrease on IFN- $\gamma$  production by these cells treated with 10nM (4%) or 1 $\mu$ M (27%) of arborinine.

#### *Effect of arborinine on lymphoproliferation*

Arborinine was studied in order to evaluate how it affected spleen and thymus lymphocyte mitogen induced proliferation. The effects of arborinine on the proliferation of these cells are presented on figure 4 and tables 1 and 2 as stimulation index (SI) median, a comparative index between stimulated treated and non-treated cells (SI=1).

Results showed that arborinine, at 10 $\mu$ M, inhibited murine spleenocytes proliferation induced by ConA (21%), in 48h. On the other side, after the same time of this stimulation, arborinine at 1 $\mu$ M enhanced proliferation of thymocytes (49%). After 72h, arborinine at 1 $\mu$ M and at 10 $\mu$ M inhibits, in 28% and 32% respectively, the splenocyte proliferation induced by ConA.

Figure 4 showed that arborinine at 1 $\mu$ M enhanced the proliferation of splenocytes stimulated with LPS (6%) after 48h.

Results also showed that, in 48h, arborinine at 10nM inhibited murine spleenocytes proliferation (9%) induced by PWM and, at 10 $\mu$ M, enhanced thymocytes proliferation (14%) induced by this mitogen.

Arborinine did not change the SI of non-stimulated cells in any of the three tested concentrations (data not shown).

#### *Effect of arborinine on apoptosis and necrosis of murine splenocytes and thymocytes*

Arborinine at 10 $\mu$ M did not modify the percentage of apoptosis or necrosis in non-stimulated cells (data non-shown). In contrast, figure 5 and tables 3 and 4 show that arborinine, at 10 $\mu$ M, induced an increase of apoptosis on spleen (54%) and thymus (19%) cells stimulated with PWM for 24h, and inhibits apoptosis on spleen cells stimulated with LPS (10%) or PWM (20%) for 48h. It is important to emphasize that the percentage of apoptotic cell on spleen was rather less than on thymus (see control data on fig. 5).

Arborinine at 10 $\mu$ M did not modify the percentage of necrosis on ConA, PWM, or LPS stimulated cells comparing to control (fig. 5 and tables 3 and 4).

## Discussion

The present work investigated the effect of arborinine, an acridone alkaloid extracted from a Brazilian herb from the Rutaceae family, using some immunological parameters, in murine cells. Several studies have demonstrated the immunological activities of alkaloids extract from plants. Some of them have presented antiallergic and antitumoral activity (Ng et al, 2000) and others, as vinca alkaloids, are already used in the treatment of tumors for its apoptosis inducing activity (Yi et al, 2004). Acridone alkaloids have been isolated from plants of the family Rutaceae (Queener et al, 1991) and have shown a range of physiological activities including antimalarial, antiviral and antibiotic properties (Chen et al, 1997).

In this work, no significant variation on the viability or function of non stimulated immune cells under effect of arborinine was observed (data not shown). These data suggest that mechanisms of drug action are related to a proliferative stage of these cells.

We demonstrated that arborinine suppressed lymphoproliferation of ConA stimulated splenic cells in the early and late periods of stimulation. These cells presented also a small but significant decrease on production of IFN- $\gamma$ , which is a characteristic cytokine produced by activated T cells (Taylor et al, 2004) and a higher decrease on IL-10 levels, cytokine known to regulate immune response (Pestka et al, 2004). Nevertheless, it was not observed any change on apoptosis or necrosis on these cells. These results suggest a possible drug effect on the lymphocyte surface, modifying the cell response to this mitogenic lectin.

A small inhibitory effect was observed on the proliferation of spleen cells stimulated with PWM in 48 hours and it was complemented by an apoptosis enhancement of these cells in 24h and a decrease on IL-10 levels in 48h. The percentage of apoptotic thymocytes also increased in 24 hours under arborinine effect and the levels of cytokines, especially IL-10, produced by these cells decreased.

Thus, our results suggest that arborinine has induced apoptosis, probably, of different cell populations, in different periods of time and inhibited the proliferation and cytokine production of these cells. Distinct cells could be on different activation and proliferation periods which allow drug action at different times and by various mechanisms. Miller (1983) showed that mitogens have activity peaks in different periods. While ConA activity peak continues only for 72 hours, PWM peak activity can last from 4 to 5 days.

On the other side, the stimulatory effect of arborinine observed by apoptosis decrease and SI increase on ConA or PWM stimulated thymic cells in 48h followed by the increase on IFN- $\gamma$  and decrease on IL-10 production, probably as a result of this event, suggests that the drug could act in distinct cell proliferation and death cell pathways described by some authors (Ashraf and Khan, 2003; Thome and Tschopp, 2001) and not on necrosis induction. This stimulatory effect of arborinine was reverted to an inhibitory effect on the cells function after 72 hour of stimulation, reinforcing the suggestion of different action mechanisms of the drug under distinct cells.

Arborinine alkaloid also demonstrated to have effects on splenic cells stimulated by LPS, a polyclonal activator of B cells and one of the more potent macrophage activator by LPS-TLR association (Medzhitov, 2001). The increase of lymphoproliferation and decrease on apoptosis of splenic cells stimulated by LPS in 48 hours contrasting with the decrease on IFN- $\gamma$  production by these cells in 48 and 72h suggests that arborinine can have diverse effects on distinct cell populations in a different manner. Yi et al (2004) observed that vinca alkaloids induced apoptosis by a cell cycle independent pathway and Lou et al (2004) showed that homoharringtonine (HTT), another plant alkaloid, induces apoptosis by upregulation of proapoptotic protein bax and caspase-3 cleavage, non mitochondrial apoptosis pathway. Controversial effects on lymphoproliferation and macrophages activation were also reported with indolquinolines, chemically modified natural alkaloids (Solis-Maldonado et al, 2003).

In conclusion, arborinine interfered on proliferation and death of cells as well as on cytokine production by immune system cells under mitogenic stimulation and did not induced necrosis of these cells.

The use of outbred animals and macerated cells suspension tends to generate heterogeneous results due to the genetic variation and cellular diversity but provides a closer simulation of **in vivo** condition and human heterogeneity.

Subsequent studies of arborinine effects on tumor cells lines and inflammation models, the elucidation of its action mechanisms on cellular activation and death pathways as well as the identification of cell subpopulations under effect of arborinine will open new perspectives for the use of this drug.

## Aknowledgement

This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular – Instituto de Ciências da Saúde – UFBA and Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia (PPGIm-UFBA).

We thank E. Velloso for providing the arborinine, R. Ribeiro and J.F.O. Costa for thymidine measurement on LETI – CPqGM- FIOCRUZ-BA, M. Barral and J. Clarêncio for the cytometry analysis on CPqGM –FIOCRUZ-BA and T. Bittencourt for the statistical analysis.

## References

- Ashraf M. T., Khan R H., 2003. Mytogenic Lectins. *Medical Science Monitoring*, 9(11), 265-269.
- Bustamante, J.; Slater, A F.G.; Orrenius, S., 1995. Antioxidant inhibition of thymocytes apoptosis by dihydrolipoic acid. *Free Radical Biology & Medicine*, 19(3), 339-347.
- Chen J-J, Deady L. W., Mackay M.F., 1997. Synthesis of some acridone alkaloids and related compounds. *Tetrahedron*, 53(37),12717-12728.
- Geetha V. S., Viswanathan S., Kameswaran L., 1981. Comparison of total alkaloids of *Thylophora indica* and disodium cromoglycate on mast cell stabilization. *Ind. Journal of Pharmacology*, 13(1), 199-201.
- Kawaii S., et al, 1999. Acridones as inducers of HL-60 cell differentiation. *Leukemia Research*, 23, 263-269.
- Lou Y. et al, 2004. Homoharringtonine mediates myeloid cell apoptosis via upregulation of pro-apoptotic bax and inducing caspase-3mediated cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). *American Journal of Haematology*, 76(3), 199-204.
- Medzhitov. R., 2001. Toll-Like receptors and innate Immunity. *Nature Review Immunology*, 1, 135-145.
- Miller K., 1983. The stimulation of human B and T lymphocytes by various lectins. *Immunobiology*, 165(2), 132-46.
- Ng T.B., Liu F., Wang Z. T., 2000. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sciences*, 66(8),709.
- Petit P. X. , Lecouer H., Zorn E., Dauguet C., Mingotte B. ,1995. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone- induced thymocyte apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 130, 157-167.
- Petzka S., et al, 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annual Review Immunology*, 22, 929-979.
- Queener S. F., et al, 1991. In vitro activities of acridone alkaloids against *Pneumocystis carinii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(2), 377-379.
- Reis M. S., Mariot A. ,1999. Diversidade Natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais. In: Simões C.M.O., et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. First ed., Porto Alegre: Florianópolis, Universidade, 39-41
- Renner K., Kofler R., Gnaiger E., 2002. Mitochondrial function in glucocorticoid triggered T-ALL cells with transgenic Bcl-2 expression. *Molecular Biology Rep.*, 29, 97-101.
- Solis-Maldonado C., et al, 2003. Differential effects of synthetic indoloquinolisinines on in vitro rat lymphocyte and macrofage functions. *International Immunopharmacology*, 3, 1261-1271.
- Thome M.; Tschopp J., 2001. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nature Reviews*, 1, 50-58.
- Yi H., et al , 2004. Regulation of Vinca alkaloid-induced apoptosis by NF-kappaB/IkappaB pathway in human tumor cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(3), 271-277.

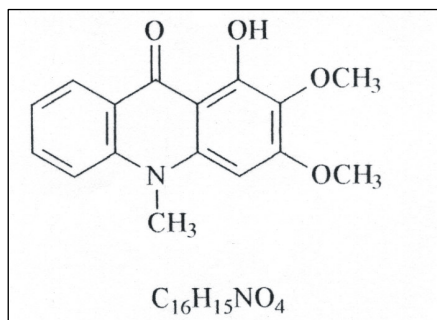
**Figures**

Fig. 1 Arborinine (LAPEMM-UFBA)



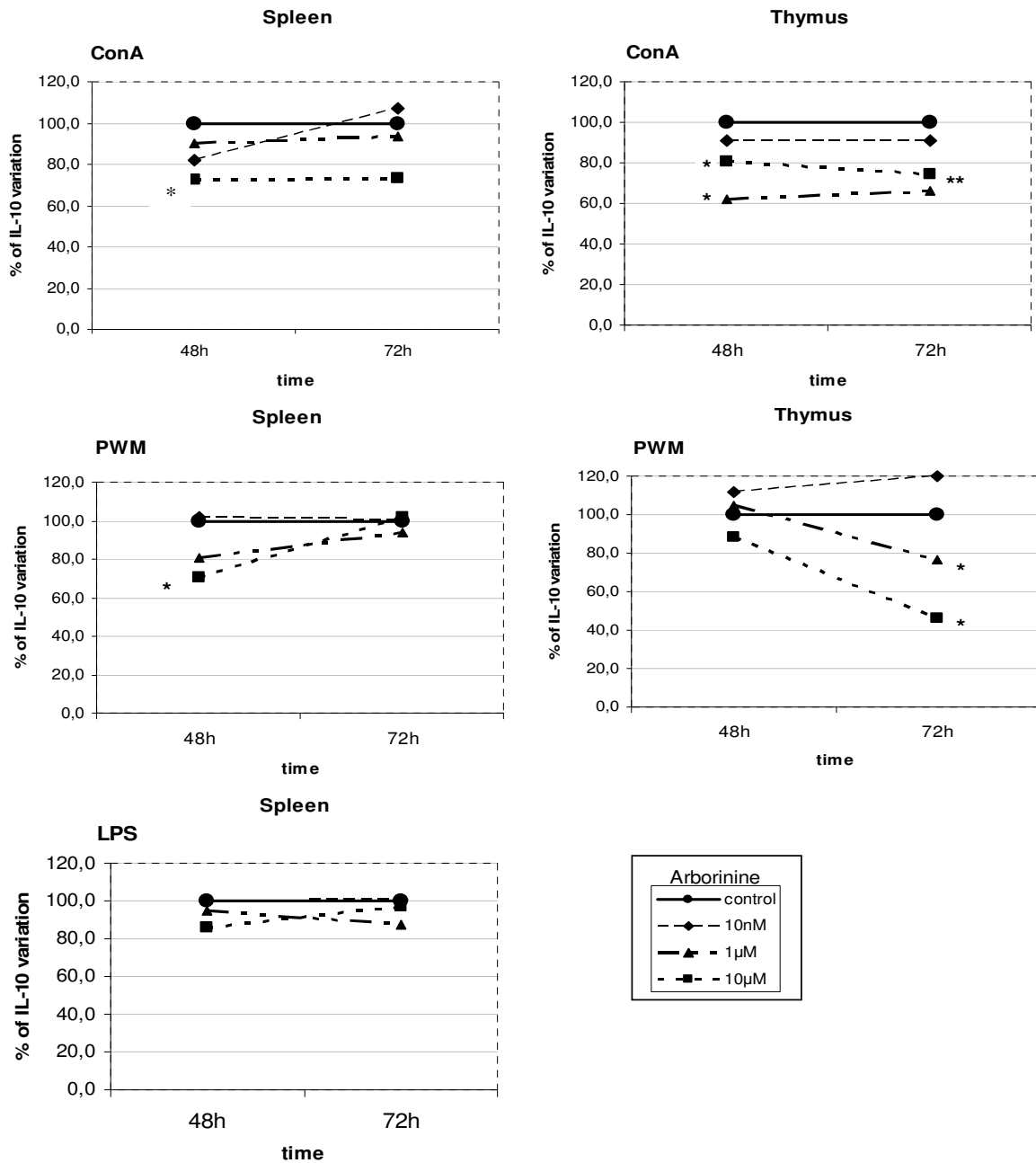


Fig.2 Effect of arborinine on IL-10 production by spleen and thymus cells treated with 10nM, 1µM or 10µM of drug and stimulated with ConA (10µg/ml), LPS (5µg/ml) or PWM (5µg/ml) for 48 and 72 hours. Data represent median % of control from 5 to 7 independent experiments. \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.05$ . The median IL-10 concentration (pg/ml) of untreated splenocytes after stimulation were with ConA: 1192.3 (48h) and 2116.1 (72h); LPS 1986.7 (48h) and 4048.2 (72h) or with PWM 2690.8 (48h) and 7768.7 (72h). The median IL-10 concentration (pg/ml) of untreated thymocytes after stimulation were with ConA: 217.2 (48h) and 608.7 (72h) or with PWM: 236.7 (48h) and 2142.4 (72h).

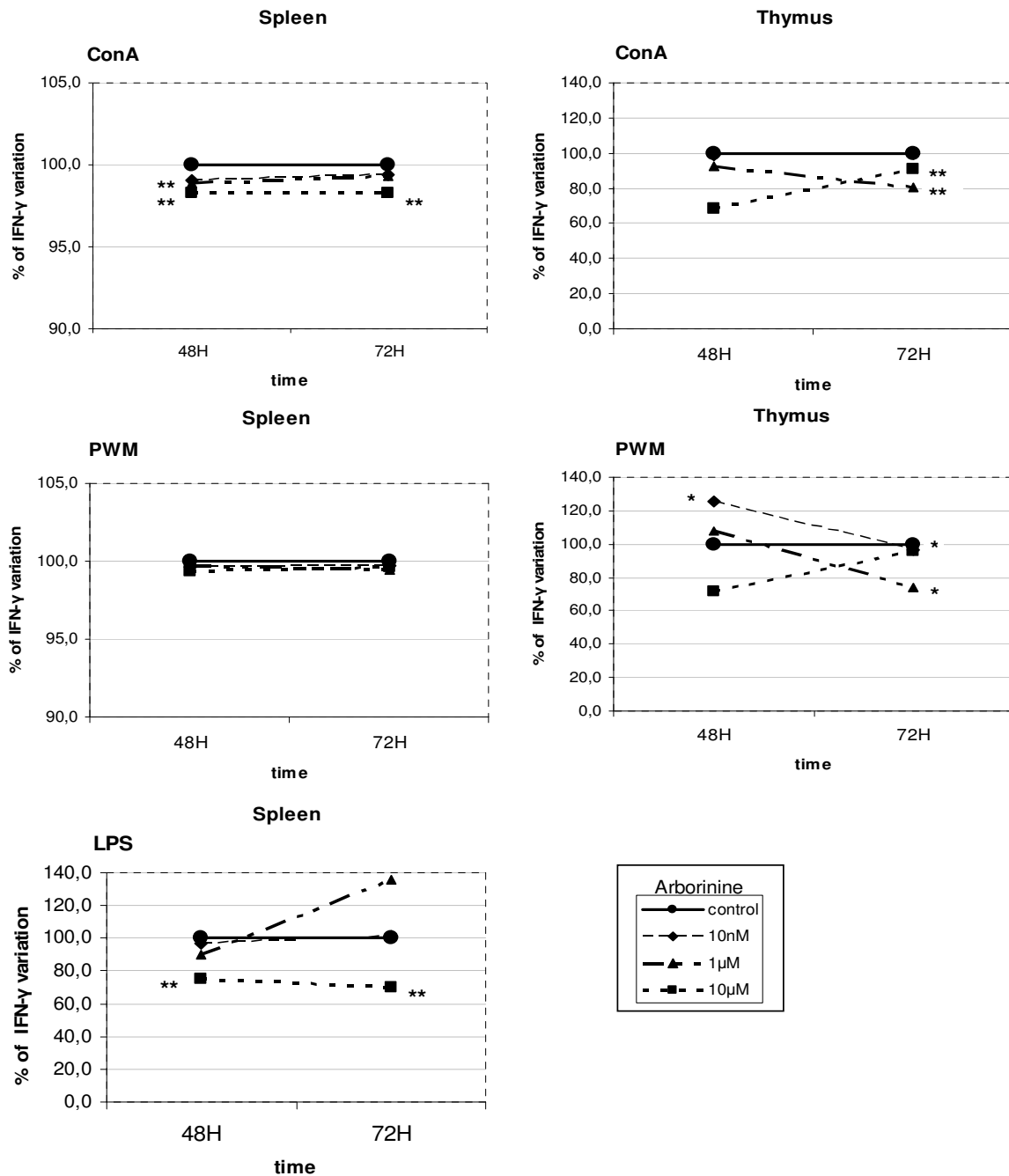


Fig.3 Effect of arborinine on IFN- $\gamma$  production by spleen and thymus cells treated with 10nM, 1 $\mu$ M or 10 $\mu$ M of drug and stimulated with ConA (10 $\mu$ g/ml), LPS (5 $\mu$ g/ml) or PWM (5 $\mu$ g/ml) for 48 and 72 hours. Data represent median % of control from 5 to 7 independent experiments. \* $P$ <0.01; \*\* $P$ <0.05. The median IFN- $\gamma$  concentration (pg/ml) of untreated splenocytes after stimulation were with ConA: 2276.5 (48h) and 2529.6 (72h); LPS 55.4 (48h) and 96.5 (72h) or with PWM 2545.9 (48h) and 2434.4 (72h). The median IFN- $\gamma$  concentration (pg/ml) of untreated thymocytes after stimulation were with ConA: 2069.9 (48h) and 2150.4 (72h) or with PWM: 712.3 (48h) and 2372.1 (72h).

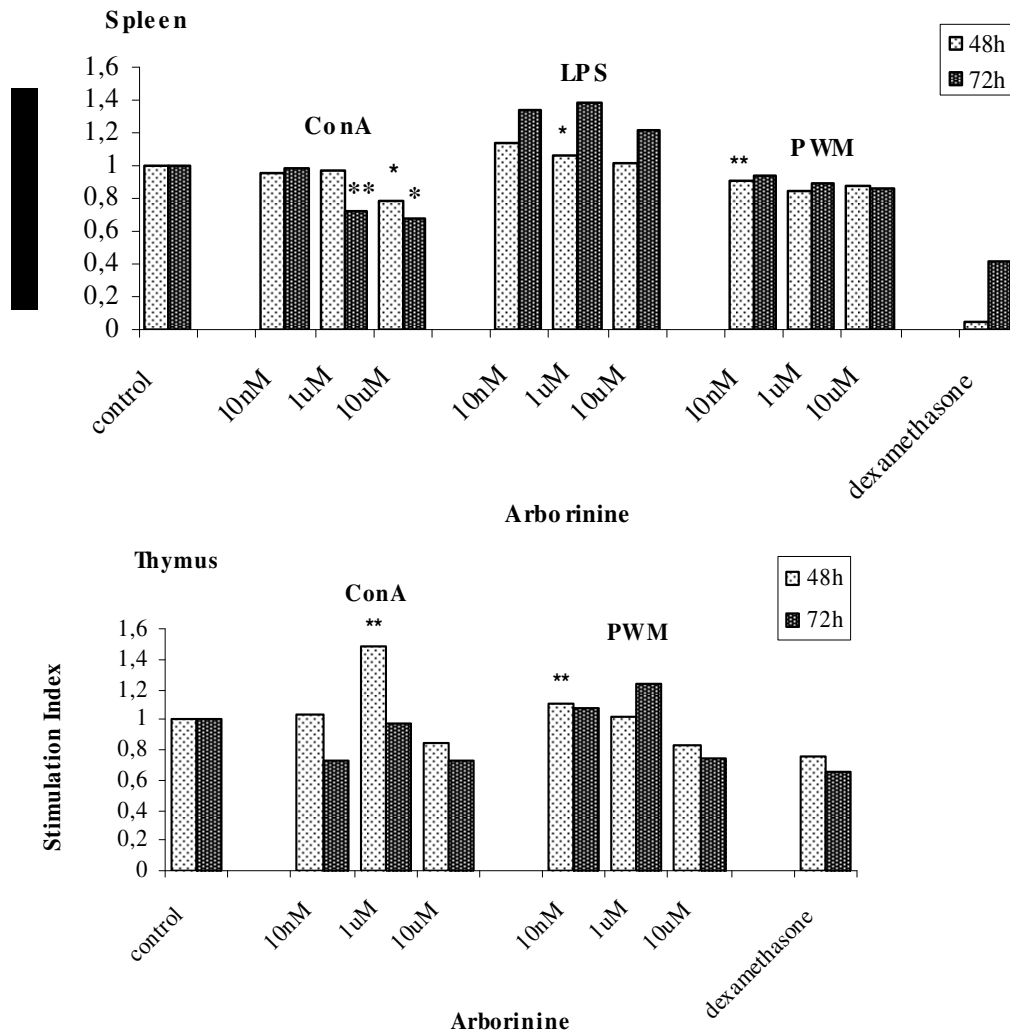


Fig.4 Effect of arborinine on the mitogenic response of murine splenocytes and thymocytes measured by [ $^3$ H] thymidine uptake. Cells were exposed to ConA (10 $\mu$ g/ml), LPS (5 $\mu$ g/ml) or PWM (5 $\mu$ g/ml) plus three different concentrations of arborinine for 48 or 72 hours. Data represents stimulation index (SI) median of triplicate determination from 4 to 6 independent experiments. \* $P$ <0.01; \*\* $P$ <0.05. The median cpm values of untreated splenocytes after stimulation were with ConA: 15168 (48h) and 38684 (72h); LPS 4166 (48h) and 5259 (72h); PWM 11163 (48h) and 30014 (72h). The median cpm values of untreated thymocytes after stimulation were with ConA: 8821 (48h) and 16532 (72h); PWM: 3044 (48h) and 9741 (72h).

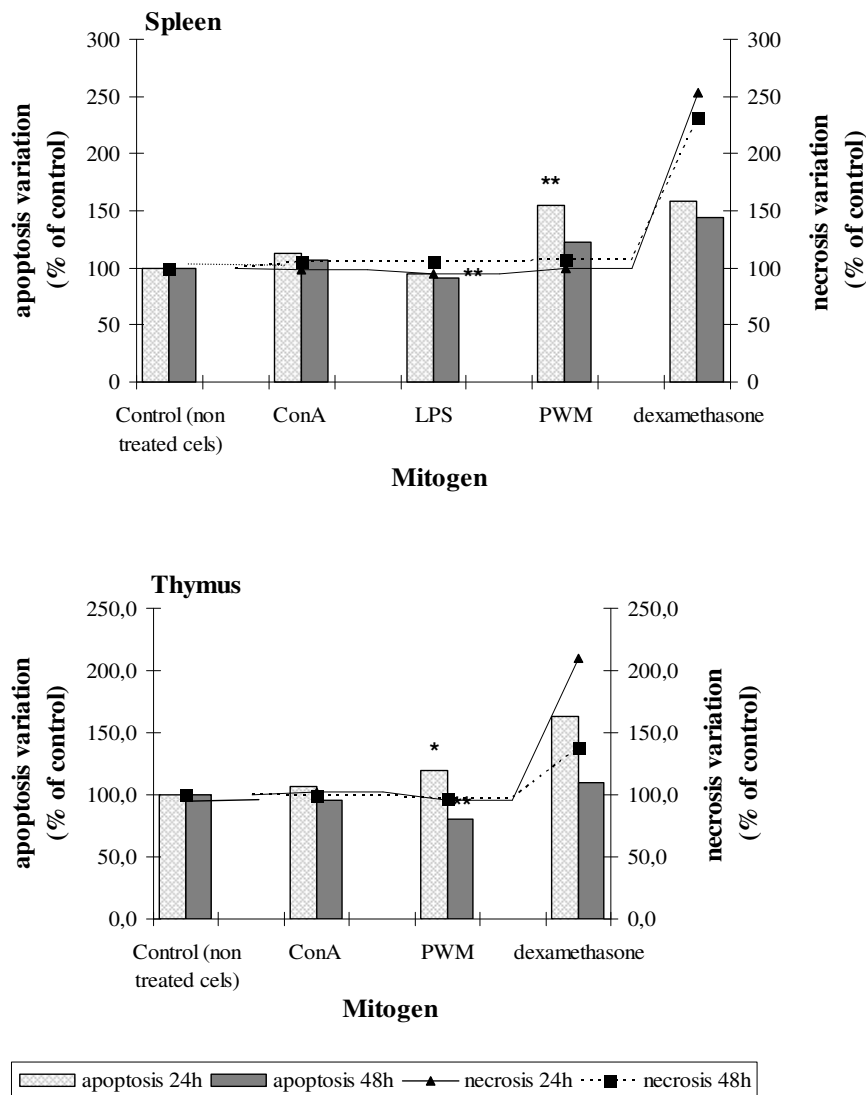


Fig. 5 Effect of arborinine on apoptosis and necrosis of murine splenocytes and thymocytes. Cells were exposed to ConA (10 $\mu$ g/ml), LPS (5 $\mu$ g/ml) or PWM (5 $\mu$ g/ml) and 10 $\mu$ M of arborinine for 24 or 48 hours. Results are the median % of variation compared to control (non treated cells). Representative data from 3 to 5 independent experiments. \* $P$ <0.01; \*\* $P$ <0.05. The median % of annexinV stained cells of untreated splenocytes after stimulation were with ConA: 1.02% (24h) and 0.6% (48h); LPS 2.35% (24h) and 1.5% (48h); PWM 1.00% (24h) and 3.38% (48h). The median % of annexinV stained cells of untreated thymocytes after stimulation were with ConA: 32.8% (24h) and 36.9% (48h); PWM: 45.9% (24h) and 46.26% (48h).

### Optional Figures and Tables

Lymphoproliferation and cytokine production data in the presence of arborinine are also expressed on Figures 6, 7 and 8 where it is possible to visualize a comparative affect of arborinine on spleen and thymus cells stimulated by the three different mitogens.

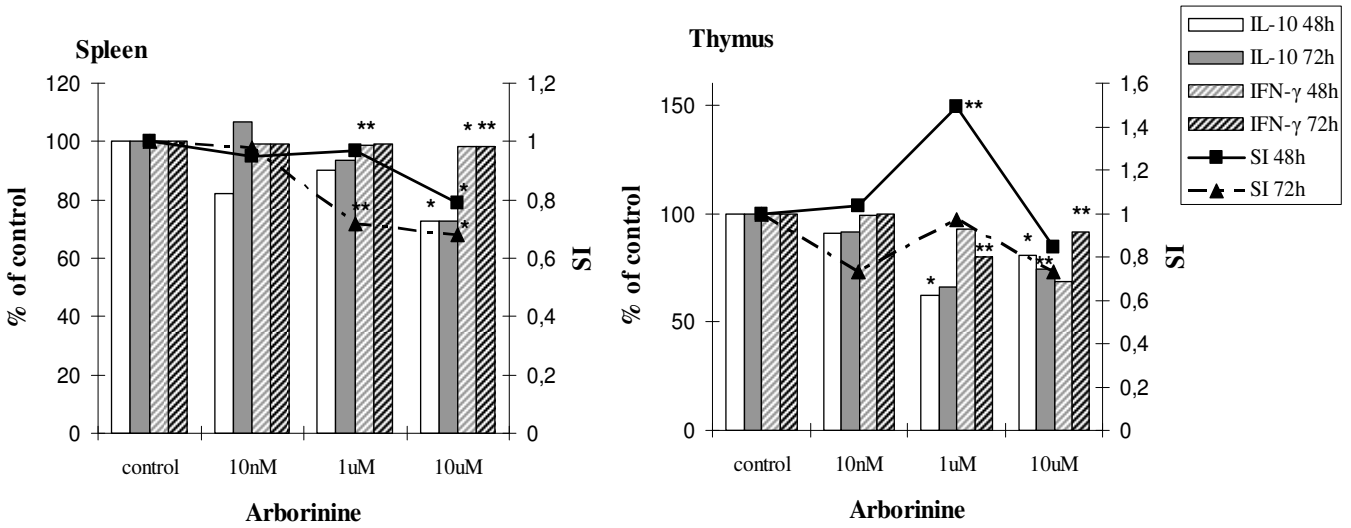


Fig.6 Effect of three different concentrations of arborinine on IL-10 and IFN- $\gamma$  production and on proliferation of spleen and thymus cells stimulated by ConA (10 $\mu$ g/ml) for 48 or 72 hours. Data are represented as median % of variation compared to control (non treated cells) and stimulation index from 3 to 7 independent experiments. \* $P$ <0.01; \*\* $P$ <0.05. Results with splenocytes treated with 10 $\mu$ M of arborinine show a decrease of 27% on IL-10 production after 48h ( $p$ <0.01), a decrease of 2% on IFN- $\gamma$  levels after 48h ( $p$ <0.01) and 72h ( $p$ <0.05) and a decrease of 21% and 32% on stimulation index (SI) after 48 and 72 hours ( $p$ <0.01), respectively. Arborinine at 1 $\mu$ M also induced a small decrease of 2% on IFN- $\gamma$  levels after 48h ( $p$ <0.05) and a decrease of 28% on SI after 72h ( $p$ <0.05). When thymocytes were stimulated with ConA and treated with 1 $\mu$ M of arborinine, it is observed a decrease of 38% on IL-10 production after 48h ( $p$ <0.01) and a decrease of 20% on IFN- $\gamma$  production after 72h and an increase of 49% ( $p$ <0.05) on stimulation index of these cells, after 48h. The highest concentration of drug (10 $\mu$ M) induced a decrease ( $p$ <0.05) on IL-10 production (20% after 48h and 25% after 72h) and a decrease of 10% on IFN- $\gamma$  levels after 72 hours.

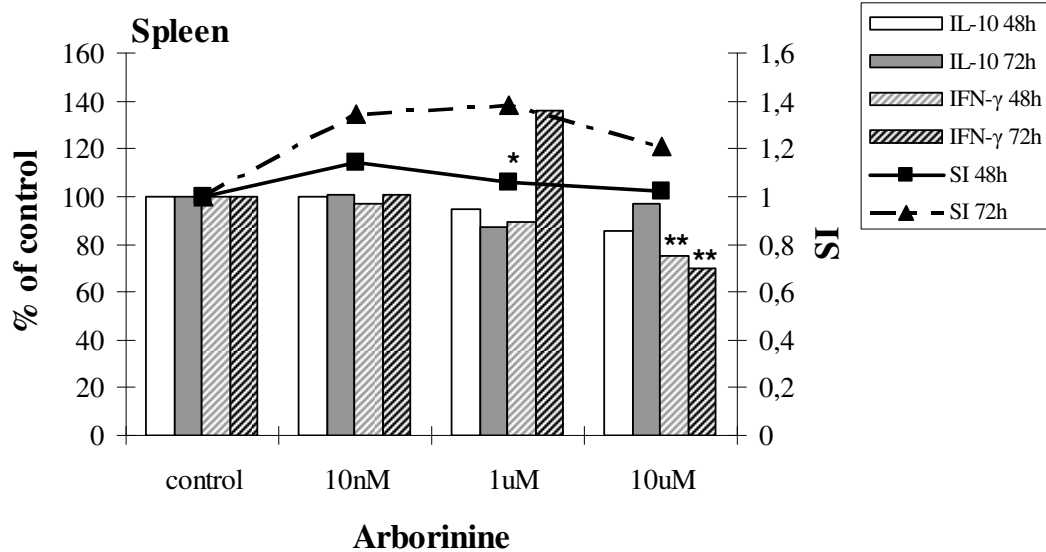


Fig.7 Effect of three different concentrations of arborinine on IL-10 and IFN- $\gamma$  production and on proliferation of spleen cells stimulated by LPS (5 $\mu$ g/ml) for 48 or 72 hours. Data are represented as median % of variation compared to control (non treated cells) and stimulation index (SI) from 3 to 7 independent experiments. \* $P$ <0.01; \*\* $P$ <0.05. Murine spleen cells, stimulated by LPS and in the presence of 10 $\mu$ M of arborinine showed a decrease ( $p$ <0.05) on its IFN- $\gamma$  production after 48h (25%) and 72h (30%). In the presence of this mitogen and 1 $\mu$ M of drug, it was observed a statistically significant increase of 6% on SI after 48 hours ( $p$ <0.01).

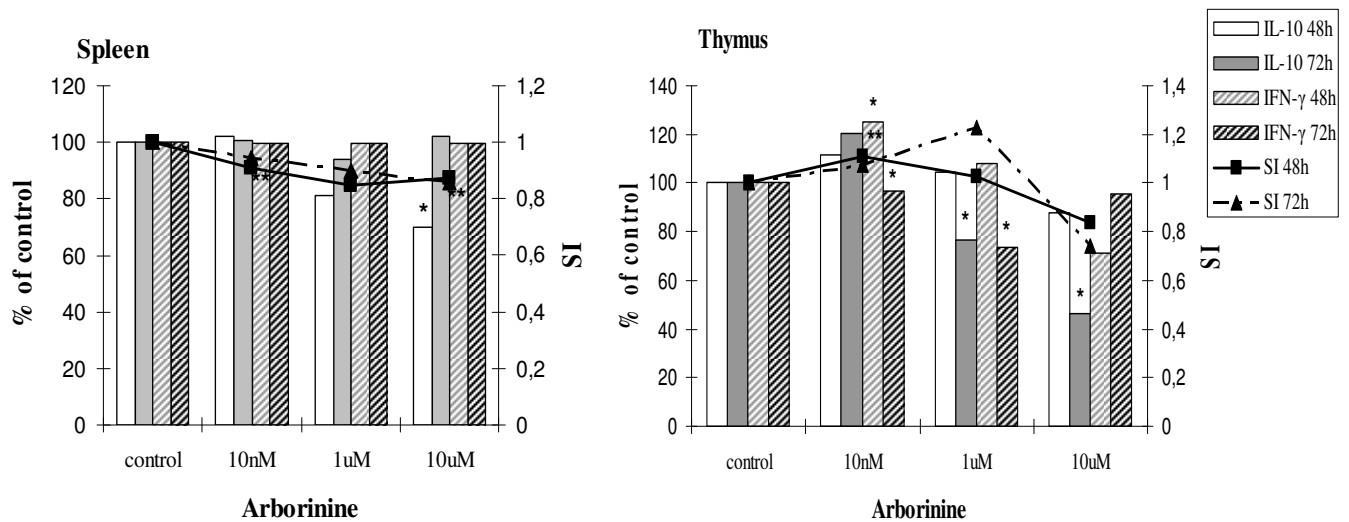


Fig.8 Effect of three different concentrations of arborinine on IL-10 and IFN- $\gamma$  production and on proliferation of spleen and thymus cells stimulated by PWM (5 $\mu$ g/ml) for 48 or 72 hours. Data are represented as median % of variation compared to control (non treated cells) and stimulation index (SI) from 3 to 7 independent experiments. \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.05$ . Spleen cells stimulated by PWM and treated with 10nM of arborinine showed a decrease of 9% on stimulation index ( $p < 0.05$ ). When these cells were treated with highest drug concentration (10 $\mu$ M) showed a decrease of 30% on IL-10 levels after 48 hours ( $p < 0.01$ ). In the presence of 10nM of arborinine, thymocytes stimulated by PWM showed an increase of 25% on IFN- $\gamma$  variation ( $p < 0.01$ ) and increase of 14% on SI ( $p < 0.05$ ) after 48h. After 72 hours, it was observed a decrease ( $p < 0.01$ ) on IL-10 production (23% with 1 $\mu$ M and 54% with 10 $\mu$ M of arborinine) and a decrease on IFN- $\gamma$  production (4% with 10nM and 27% with 1 $\mu$ M of arborinine).

Table 1  
Effect of arborinine on the proliferation of murine splenocytes induced by different mitogens

Compounds			
Mitogens	Arborinine	48h	72h
<b>ConA , LPS or PWM</b>	0nM (control)	1.00	1.00
<b>ConA</b> (10µg/ml)	10nM	0.95 (0.55-1.53)	0.98 (0.51-1.07)
	1µM	0.97 (0.68-1.39)	0.72 (0.56-0.95)**
	10µM	0.79 (0.62-0.94)*	0.68 (0.46-0.87)*
<b>LPS</b> (5µg/ml)	10nM	1.14 (0.81-2.32)	1.35 (0.73-1.84)
	1µM	1.06 (1.00-2.13)**	1.38 (0.92-2.71)
	10µM	1.02 (0.95-1.41)	1.21 (0.84-1.80)
<b>PWM</b> (5µg/ml)	10nM	0.91 (0.58-1.21)**	0.94 (0.54-1.12)
	1µM	0.85 (0.77-1.41)	0.90 (0.76-1.07)
	10µM	0.87 (0.68-1.23)	0.86 (0.61-1.16)
no	dexamethasone	0.05 (0.01-0.32)	0.41(0.06-3.60)

Stimulation index obtained by comparison with non treated group (cells plus mitogen and diluent - DMSO). Positive control of apoptosis is represented by cells treated with 100nM of dexamethasone. All data are expressed as median (range) of five experiments. Spleen cells were cultured for 48 and 72 hours in the presence of mitogens and three different concentrations of arborinine. \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.05$  (Mann-Whitney test).

Table 2  
Effect of arborinine on the proliferation of murine thymocytes induced by different mitogens

Compounds			
Mitogens	Arborinine	48h	72h
<b>ConA or PWM</b>	0nM (control)	1.00	1.00
<b>ConA</b> (10µg/ml)	10nM	1.04 (0.52-1.85)	0.73 (0.62-1.26)
	1µM	1.49 (1.00-2.72)**	0.97 (0.86-1.03)
	10µM	0.85 (0.65-1.70)	0.73 (0.61-1.26)
<b>PWM</b> (5µg/ml)	10nM	1.11 (0.58-1.36)**	1.08 (0.75-1.24)
	1µM	1.02 (0.58-1.00)	1.23 (0.77-1.25)
	10µM	0.84 (0.46-1.29)	0.74 (0.23-1.41)
no	dexamethasone	0.76 (0.17-3.09)	0.66 (0.33-4.68)

Stimulation index obtained by comparison with non treated group (cells plus mitogen and diluent - DMSO). Positive control of apoptosis is represented by cells treated with 100nM of dexamethasone. All data are expressed as median (range) of five experiments. Thymus cells were cultured for 48 and 72 hours in the presence of mitogens and three different concentrations of arborinine. \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.05$  (Mann-Whitney test).



Table 3  
Effect of arborinine on the apoptosis and necrosis of murine splenocytes stimulated with different mitogens

Arborinine 10 $\mu$ M	apoptosis		necrosis	
	24h	48h	24h	48h
<b>Control</b> (non treated cels)	100	100	100	100
<b>ConA</b> (10 $\mu$ g/ml)	113.1 (91.6-122.1)	107.0 (60.0-120.0)	98.3 (88.5-107.3)	105.1 (88.1-108.6)
<b>LPS</b> (5 $\mu$ g/ml)	94.9 (45.3-100.0)	90.9 (57.1-94.6)**	94.2 (51.5-102.2)	105.3 (84.8-106.9)
<b>PWM</b> (5 $\mu$ g/ml)	154.3 (106-200)**	122.6 (96-133)	100.0 (86.6-114.8)	106.6 (88.5-107.5)
<b>Dexamethasone</b>	158.9 (39-3229.8)	144.2 (10.2-3615)	252.7 (115.8-263)	232.1 (88.4-278.1)

% of apoptosis and necrosis variation obtained by comparison with non treated group (cells plus mitogen and diluent - DMSO). Positive control of apoptosis is represented by cells treated with 100nM of dexamethasone. All data are expressed as median (range) of 3-5 experiments. Spleen cells were cultured for 24 and 48 hours in the presence of mitogens and 10 $\mu$ M of arborinine. \* $P$ <0.01; \*\* $P$ <0.05 (Mann-Whitney test).

Table 4  
Effect of arborinine on the apoptosis and necrosis of murine thymocytes stimulated with different mitogens

Arborinine 10 $\mu$ M	apoptosis		Necrosis	
	24h	48h	24h	48h
<b>Control</b> (non treated cels)	100.0	100.0	100.0	100.0
<b>ConA</b> (10 $\mu$ g/ml)	106.6 (64.6-139)	95.5 (89.0-105.9)	101.8 (97.9-109.1)	98.7 (93.7-100.9)
<b>PWM</b> (5 $\mu$ g/ml)	119.1 (103-201)*	80.2 (71.5-132)**	95.9 (93.5-104.9)	96.8 (84.3-101.5)
<b>dexamethasone</b>	162,9 (98.7-368.9)	110,2 (27.5-210.5)	209,9(143.8-292)	138.3 (98.3-169.9)

% of apoptosis and necrosis variation obtained by comparison with non treated group (cells plus mitogen and diluent - DMSO). Positive control of apoptosis is represented by cells treated with 100nM of dexamethasone. All data are expressed as median (range) of 3-5 experiments. Thymus cells were cultured for 24 and 48 hours in the presence of mitogens and 10 $\mu$ M of arborinine. \* $P$ <0.01; \*\* $P$ <0.05 (Mann-Whitney test).

## 5.2. ARTIGO 2

Submetido ao periódico *International Immunopharmacology*

### **Effect of flavonoid rutin obtained of *Dimorphandra mollis* from Bahia-Brazil on the viability and function of murine immune cells stimulated with different mitogens**

**Roseghini, R.<sup>a</sup>**; Rocha, D.<sup>a</sup>; Clarêncio, J. <sup>c</sup>; Nascimento, I.<sup>a</sup>; Schaer, R. <sup>a</sup>; Velozo, E. <sup>b</sup>; Costa, S.L.<sup>a</sup>; Costa, M.F.D. <sup>a</sup>; Tardy, M. <sup>d</sup>; Meyer, R.<sup>a</sup>; Freire, S.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia (PPGIm-UFBA)

<sup>b</sup>Faculdade de Farmácia- Universidade Federal da Bahia

<sup>c</sup>Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM- FIOCRUZ-BA)

<sup>d</sup>PPGIm-Brasil/Inserm-Université de Paris XII-France

#### **Abstract**

Rutin is a flavonoid obtained from *Dimorphandra mollis* (Benth.), a native medicinal plant from Brazil, and it has been used as anti-oxidative, anti-hemorrhagic and as a blood vessel protector. The present study has examined its effects on the viability and function *in vitro* of immune system cells in a murine model. Rat spleen and thymus cells were cultured with 10nM, 1µM e 10µM of the drug in the presence or absence of PWM, LPS or ConA mitogens. Cellular proliferation was analyzed by H<sup>3</sup>-thymidin uptake after 48 and 72 hours and viability was measured by flow cytometry using Annexin V and PI after 24 and 48 hours. In function studies, IFN-γ and IL-10 were measured by ELISA after 48 and 72h.

The flavonoid rutin showed an inhibitory effect on splenocytes and thymocytes proliferation under ConA stimulation. It was observed an increase on apoptosis levels of thymocytes stimulated with PWM in 24h and on splenocytes stimulated with PWM in 48h. Function studies showed a decrease on IFN-γ production by splenocytes and thymocytes stimulated with PWM or ConA. No changes occurred regarding the IL-10 levels except for an increase observed on spleen cells cultured with LPS and rutin for 48h. These cells also showed a decrease on apoptosis after 24 hours. It was not found any significantly change on viability and function values in the absence of mitogenic stimulus.

Our data suggest that rutin exerts diverse effects in some immunological parameters of splenocytes and thymocytes stimulated by mitogens without inducing necrosis.

Keywords: rutin, flavonoids, lymphocyte proliferation, mitogens, apoptosis, necrosis

## 1. Introduction

Rutin (Fig.1) is a glycosilated flavonoid, also known as quercetin 3-*O*-rutinoside [1]. In Brazil, it is extracted from the seeds of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae- Mimosoidae), a typical “cerrado” region tree [2], and commercialized as phytotherapeutic drug for the treatment of vascular disorders and hypertension. It is used also to helps the vitamin C absorption.

Quercetin is the non-glycosilated portion of rutin. As well as several other flavonoids, it is commonly found in fruits, vegetables, wine and tea and has been described as potent antioxidant [1] and antitumoral agent [3]. Quercetin also showed anti-inflammatory effect by suppressing the release of inflammatory mediators including TNF- $\alpha$ , RANTES, MIP-2 and PGE<sub>2</sub> in rats [4]. This effect is probably related to inhibition of tyrosine kinase [5] or its effects on the NF $\kappa$ B activation [6].

Rutin has been related to diverse effects as hepatoprotection against paracetamol and CCl<sub>4</sub> in rodents [7], inhibition of azoximethanol-induced neoplasia [8], suppressor of androgen-independent human prostate tumor proliferation [9] and suppressor of oxidative stress in rheumatoid arthritis leucocytes [10] but its effects on immune system cells are still not clear.

The purpose of the present work was to evaluate rutin effects on the viability and function of murine splenocytes and thymocytes stimulated with three distinct mitogens: concanavalin A (ConA), lipopolysaccharide (LPS) and pokeweed mitogen (PWM). It represents a cellular activation model which simulates different infection events with consequent cytokine release, cellular proliferation or death. It also helps to understand initial studies of drug effects and to determinate a cellular and tissue action mechanism of the drug.

## 2. Experimental Procedures

### 2.1. Rutin

Rutin flavonoid was extracted from the seeds of *Dimorphandra mollis* by recrystallization in tetrahydrofuran (THF), according to Merck S.A. procedures in LAPEMM-FFar-UFBA (98% of purity). Then it was solved with dimethyl sulfoxide (DMSO) to 10mM and stored at -20°C. Subsequent dilutions were done in RPMI-1640 L-glutamine medium (Sigma) supplemented with 2-mercaptoethanol  $5 \times 10^{-5}$  M and 2% of NaHCO<sub>3</sub>.

## 2.2. Rat spleen and thymus cells and culture condition

Male Wistar rats (200-260g) from the Biotery of Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)-Bahia were submitted to an ether chamber for previous anesthesia and surgery. Spleen and thymus were removed, in sterile conditions, and macerated in Petri dishes with RPMI-1640 L-glutamine medium (Sigma) supplemented with 10% of FBS (Gibco Invitrogen Corporation, USA), 2-mercaptoethanol  $5 \times 10^{-5}$  M, 2% of  $\text{NaHCO}_3$ , 1% of PSN Antibiotic mixture (Gibco Invitrogen Corporation, USA). The cell number was adjusted to  $2 \times 10^6$  cells/ml and cultured in supplemented RPMI as adapted protocol [11, 12].

Spleen and thymus cells were cultured with  $10 \mu\text{g/ml}$  of concanavalinA- ConA (Sigma),  $5 \mu\text{g/ml}$  pokeweed mitogen PWM from *Phytolacca americana* (Sigma) or  $5 \mu\text{g/ml}$  of lipopolysaccharide - LPS from *E.coli* (Sigma) plus three distinct concentrations of rutin ( $10 \text{nM}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ) and incubated for 24, 48 or 72 hours at  $37^\circ\text{C}$ . Controls were non-stimulated cells (cells plus DMSO or arborinine) and non-treated cells (cells plus DMSO and mitogen).

## 2.3. Lymphocyte proliferation assay

The effect of rutin on spleen and thymus cells proliferation induced by ConA, PWM or LPS was determined by [ $^3\text{H}$ ] thymidine incorporation. After mitogens and rutin addition, cells were incubated into 96-well plates in triplicate for 48 or 72 hours at  $37^\circ\text{C}$ . In the last 18 hours,  $1 \mu\text{Ci}/200 \mu\text{l}$  of [ $^3\text{H}$ ] thymidine (Sigma) was added to the culture. At the end of the incubation, cells were collected in glass fiber filter (Packard) using a cell harvester (Filtermate 196, Packard, Meriden, CT, EUA) and allowed to dry for 24 hours. Incorporation of radioactive thymidine was determined by gas scintillation in a Direct Beta Counter (Packard, Meriden, CT, EUA). Stimulation index (SI) was calculated by dividing arborinine treated cells counts per minute (cpm) by non-treated cells cpm as the following formula:

$$\text{SI} = \frac{\text{mean of treated cells cpm}}{\text{mean of non-treated cell cpm}}$$

(1)

#### 2.4. Measurement of IFN- $\gamma$ and IL-10 by ELISA

Interferon- $\gamma$  (OptEia™ Rat IFN- $\gamma$  Set - BD Biosciences) and interleukin-10 (ELISA Duo Set Rat IL-10 - R&D Systems) were measured into the supernatant of splenocytes and thymocytes cultures by sandwich ELISA. Cells were cultured in 24 well plates in the presence or absence of rutin and mitogens cited above for 48 and 72 hours at 37°C. Concentrations of cytokines were determined comparing values of standard curves obtained using recombinant cytokines in both systems following kit recommendations. Results are shown as percentage of increase or decrease comparing to the control calculated by the following formula:

$$\% \text{ of control} = \frac{\text{treated cells cytokine concentration (pg/ml)}}{\text{non-treated cell cytokine concentration (pg/ml)}} \times 100 \quad (2)$$

#### 2.5. Annexin V apoptosis assay and PI necrosis assay by flow cytometry

The detection of phosphatidylserine on the cell surface was performed by Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (R&D Systems). Non-treated and treated cells were cultured for 24 or 48 hours in 24 well plates. Then, approximately  $1 \times 10^6$  cells were resuspended with 100  $\mu$ l of binding buffer containing Annexin V-FITC (0,125  $\mu$ g/ml), propidium iodide (5  $\mu$ g/ml), H<sub>2</sub>O and annexin buffer, following kit recommendations. After 15 min incubation at room temperature in the dark, cells were analyzed by flow cytometry in a FACSort BD (US-BD Biosciences Clontech). For the positive control of apoptosis, cells were incubated with dexamethasone (Decadron™-PRODOME) at 100nM as described in the protocol [13]. At least 10,000 events were recorded and the results are shown as percentage of apoptosis or necrosis comparing to the control. The higher concentration of rutin (10  $\mu$ M) was tested on this assay.

This study was designed to investigate whether rutin exerted antiproliferative effects on murine immune system cells by inducing apoptosis or necrosis. Results are expressed as percentage of apoptosis or necrosis variation comparing to non-treated control (100).

## 2.6. Statistical Analysis

Intergroup comparisons between untreated samples and samples treated with different concentrations of rutin were done by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests using statistical software SPSS 12.0 for Windows.  $P < 0.05$  data were considered statistically significant.

## 3. Results

Cells treated with rutin but not stimulated with mitogens did not show any significant change in any of the parameters studied as compared with control cells. These data have not been incorporated.

The final concentration of dimethyl sulfoxide (1 $\mu$ l/ml) was shown in control experiments to have no significant effect on analysed parameters compared to that cells that did not receive the diluent.

### 3.1. Effect of rutin on lymphoproliferation

Rutin was studied in order to see how it affects thymus and spleen lymphocyte mitogen induced proliferation. The effects of rutin on the proliferation of these cells are represented as stimulation index median (fig. 2 and tables 1 and 2), a comparative index between stimulated treated and non-treated cells (SI=1).

Proliferation of ConA stimulated splenic lymphocytes was significantly ( $p < 0.05$ ) decreased (11%) after 48h by rutin at 1 $\mu$ M. The drug used at a higher concentration (10 $\mu$ M) caused inhibition of 15% on ConA stimulated thymocytes ( $p < 0.01$ ) after 72h.

### 3.2. Effects of rutin on spleen and thymus cells functions

Three concentrations of rutin and two different times of incubation were tested to verify if the drug induces a dose dependent response and in order to evaluate rutin effects on the cytokine production.

Data are expressed as median percentage of variation on cytokine production compared to control (stimulated and non-treated cells), considered as 100.

### 3.2.1 IL-10 production

Production of IL-10 by LPS stimulated splenocytes was significantly ( $p < 0.05$ ) enhanced (11%) by rutin at 10nM after 48h (fig.3). Rutin did not affect significantly IL-10 production by tested cells stimulated with other mitogens and at different times.

### 3.2.2. IFN- $\gamma$ production

Production of IFN- $\gamma$  (fig.4) by splenocytes stimulated with PWM was statistically significant ( $P < 0.01$ ) reduced (1%) in the presence of 10nM of rutin. In ConA stimulated thymocytes the reduction of this cytokine production was 18% after 48h. At this time, IFN- $\gamma$  levels were also significantly ( $p < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively) reduced on ConA (3%) or PWM stimulated splenocytes (2%) by rutin at 1 $\mu$ M. After 72 hours of incubation, rutin at 10nM induced a decrease (6%,  $P < 0.01$ ) on IFN- $\gamma$  production by thymocytes stimulated with PWM (fig.4) whereas at 1 $\mu$ M rutin induced a lower (1%) inhibition on this cytokine production by PWM stimulated splenocytes ( $P < 0.05$ ).

### 3.3. Effect of rutin on apoptosis and necrosis of murine splenocytes and thymocytes

Apoptosis variation was significantly ( $p < 0.01$ ) increased on PWM stimulated thymocytes by rutin at 10 $\mu$ M after 24h (17%) and on PWM stimulated splenocytes after 48h (33%). An opposite effect was observed on LPS stimulated splenocytes after 24h. A significant ( $p < 0.01$ ) decrease of 20% on apoptosis was observed on these cells. Rutin did not affect significantly necrosis values on spleen or thymus cells stimulated with PWM, ConA or LPS mitogens.

## 4. Discussion

Flavonoids are phenolic compounds widely distributed in plants and represent an important element of the human diet. They are found in fruits, vegetables, seeds, flowers, wine, coffee and tea and have been reported to those antioxidant [10], antiproliferative [14], anti-inflammatory and antiallergic [5] effects.

Rutin, the targeted flavonoid of the present work, was extracted and purified from *Dimorphandra mollis*, a Brazilian native plant, and has been used as a phytotherapeutic medicine to reduce blood vessel frailty.

In some works, it was demonstrated that rutin inhibits lymphocyte proliferation from peripheral blood [15] and prostate tumoral cells and inhibits antigen presentation by antigen presenting cells (APCs) [9]. Quercetin, the non-glycosilated component of rutin, has been widely studied because of its antiinflammatory effect in rats [4] and also by its apoptosis induced antitumoral activity [3].

In the present work, it was not observed any statistically significant change on lymphoproliferation, apoptosis, necrosis or cytokine production of non stimulated murine immune cells in the presence of rutin (data not shown). These data suggest that mechanisms of drug action are related to the proliferation and activation of the cells.

The suppression of mitogen induced proliferation by flavonoids has been described by several authors [5,16]. Artelastin, a prenylated flavone, has demonstrated inhibitory effect on human PBMC lymphoproliferation induced by PHA or ConA and on splenocytes stimulated by ConA or LPS [14]. Certain flavonoids were reported to block early steps occurring within the first 24-48h of lymphocyte stimulation [13,17]. Others showed an inhibitory activity even when added 2 days after stimulation, suggesting an interference with the late proliferative phase [16].

In this approach, the rutin inhibitory effect on ConA stimulated spleen and thymus cells at different times indicates that the drug acts on different periods of the cell proliferative process. During the period of 48h, it was also observed a decrease on IFN- $\gamma$  production by splenocytes and thymocytes stimulated by this mitogen.

A large number of natural compounds and plants extracts, including flavonoids, are currently know as activators of many pro-inflammatory cytokines and inflammatory process by modulation of the NF- $\kappa$ B [18]. One possible rutin mechanism of action could be the modulation of the transcription factor NF $\kappa$ B.

On the other side, the rutin induced decrease on apoptosis of splenocytes and the following increase on IL-10 levels of these cells stimulated by LPS suggest that the flavonoid could interfere on the association of LPS to its receptor BCR complex on B cells [20] or TLR-4 on macrophages and dendritic cells (DCs) [21]. This action would lead to an immunostimulation and apoptosis reduction of some cells. The increase on the level of IL-10, know as immunomodulatory cytokine [22], could also lead to an increase on apoptosis of these cells.



Thus, rutin demonstrated to have distinct effects on mitogen stimulated cells. Similar results were reported for genistein, a selective protein kinase inhibitor isoflavon [5]. The genistein sensitivity varies considerably to three distinct mitogenic stimuli as LPS, ConA and mixed lymphocyte culture [19]. This point strongly suggests that the flavonoid sensitivity reflects exploitation of different pathways of cell activation. In addition, it is known that quercetin and genistein affect protein tyrosine phosphorylation by tyrosine phosphatase [5], associated to phosphatidylinositol activation pathway and triggered by TCR peptide linkage which leads to cellular activation and proliferation [23].

Apoptosis induction by quercetin was reported by several authors. Wei et al (1994) have shown an increase on apoptosis at G1 and S mitosis phase of tumor cell lines and Knowless et al (2000) verified an increase in the proportion of cells in the S phase within 24h but not evident apoptosis in the androgen-independent human prostatic tumor cells PC-3 line. In addition, rutin was reported by the same author [9] as antiproliferative of tumor cell lines but not related to apoptosis increasing. It was also described as an inhibitor of azoximethanol, a tumor inducer drug [8].

The significant increase of apoptosis on PWM stimulated thymocytes in the earliest period of stimulation and on splenocytes in the later period in the presence of rutin, complemented by a significant decrease of IFN- $\gamma$  production by these cells, show that rutin has a different sensitivity to cells stimulated by distinct mitogens and may be involved in another stimulation or death pathway.

In conclusion, rutin plays a moderate inhibitory role *in vitro* on murine immune cells in agreement with the already studied quercetin. It opens perspectives for its *in vivo* tests and its uses as a modulator of the inflammatory process. Rutin also seems to be an apoptosis inducer of stimulated cells, indicating a possible use for rutin in anticancer therapies. Nevertheless, rutin showed a decrease on apoptosis and IL-10 stimulation during the initial phase of cellular stimulation by LPS.

The employment of outbred animals and macerated cells suspension tends to generate heterogeneous results due to the genetic variation and cellular diversity but provides a closer simulation of the *in vivo* situation and human heterogeneity. Further studies are necessary in order to identify the subpopulations which are under the effect of the drug, using specific markers and to verify the effects of rutin on inflammation and tumoral models *in vivo* in order to characterize its action mechanisms. It would also be interesting to investigate activation and

death cell pathways by NF $\kappa$ B and other transcriptional factors expression, as it this was observed by other authors using quercetin, and also the expression of caspases or apoptosis inhibitors.

## Aknowledgement

This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular – Instituto de Ciências da Saúde – UFBA and Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia (PPGIm-UFBA).

We thank E. Velloso for providing the rutin, R. Ribeiro and J.F.O. Costa for thymidine measurement on LETI – CPqGM- FIOCRUZ-BA, M. Barral and J. Clarêncio for the cytometry analysis on CPqGM –FIOCRUZ-BA and T. Bittencourt for the statistical analysis.

## References

1. Martinez-Florez S., Gonzalez-Gallego, J.; Culebras, J.M.; Tuñon, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrition Hosp.*, 2002 ; XVII:6, 271-278.
2. Lorenzi H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Second ed., Rio de Janeiro: Plantarum, 1949; 175.
3. Wei Y. Q., et al. Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein *Cancer Research*, 1994; 54:18, 4952-4957.
4. Morikawa K., et al. Inhibitory effect of quercetin on carragenan-induced inflammation in rats. *Life Sciences*, 2003; 74:709-721.
5. Middleton E.J.R., Kandaswami C., Theoharides T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer. *Pharmacology Review*, 2000; 52: 673–751.
6. Muraoka K., Shimizu, K, Sun, X. et al. Flavonoids exert diverse inhibitory effects on the activation of NF- $\kappa$ B pathway. *Transplantation Procedures*, 2002; 34:1335-1340.
7. Janbaz K.H., Saeed S.A., Gilani A.H. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCL<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia*, 2002; 73:557-563.
8. Deschner E.E., Ruperto, J., Wong, G., Newmark, H.L. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, 1991; 12:7, 1193-6.
9. Knowless L. M., et al. Flavonoids suppresses androgen-independent human prostate tumor proliferation. *Nutrition and Cancer*, 2000; 38:1, 116-122.
10. Ostrakhovitch E.A., Afanas'ev I.B. Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators. *Biochemical Pharmacology*, 2001; 62:743-746.
11. Bustamante J., Slater A.F.G., Orrenius S. Antioxidant inhibition of thymocytes apoptosis by dihydrolipoic acid. *Free Radical Biology & Medicine*, 1995; 19:3, 339-347.
12. Petit P. X., et al. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 1995; 130: 157-167.
13. Renner K., Kofler R., Gnaiger E. Mitochondrial function in glucocorticoid triggered T-ALL cells with transgenic Bcl-2 expression. *Molecular Biology Rep.*, 2002; 29: 97-101.
14. Cerqueira, F.; Cordeiro-da-Silva, A.; Araújo, N.; Cidade, H. Kijoa, A.; Nascimento, M.S.J. Inhibition of lymphocyte proliferation by prenylated flavones: Artelastin as a potent inhibitor. *Life Sciences*, 2003; 73, 2321-2334.

15. Hirano R., Sasamoto, W., Matsumoto, A. Itakura, H., Igarashi, O. Y., Kondo K. Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal of Nutrition Sciences Vitaminol.*, Tokio, 2001; 47:357-362.
16. You K.M., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S., Kim H.P. Vitexcarpin, a flavonoid from the fruits of *Vitex rotundifolia*, inhibits mouse lymphocyte proliferation and growth of cell lines in vitro. *Planta Medica*, 1998; 64(6): 546-550.
17. Mookerjee B.K., Lee T-P., Lippes H.A. and Middleton E. Some effects of flavonoides on lymphocyte proliferative responses. *Journal of Immunopharmacology*, 1986; 8: 371-392.
18. Bremner P., Heirich M. Natural products as target modulators of the nuclear factor- kappaB pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2002; 54:453-472.
19. Namgoong S.Y., et al. Effects of naturally occurring flavonoids on mitogen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sciences*, 1993; 54:313-320.
20. Thome M., Tschopp J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nature Reviews*, 2001; 1:50-58
21. Medzhitov R. Toll-Like receptors and innate Immunity. *Nature Review Immunology*, 2001; 1: 135-145.
22. Petzka, S. et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annual Review Immunology*, 2004; 22:929-979.
23. Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., Vandenaabeele, P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*, 1999; 18:7719-7730.

## Figures

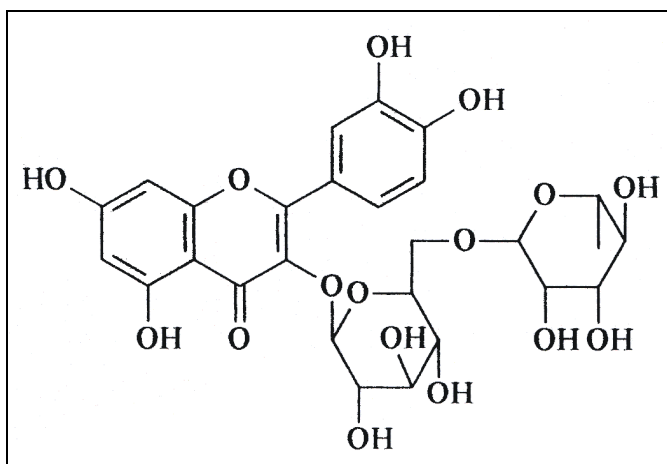


Fig. 1 Rutin (quercetin 3-O-rutinoside)(LAPEMM-UFBA)

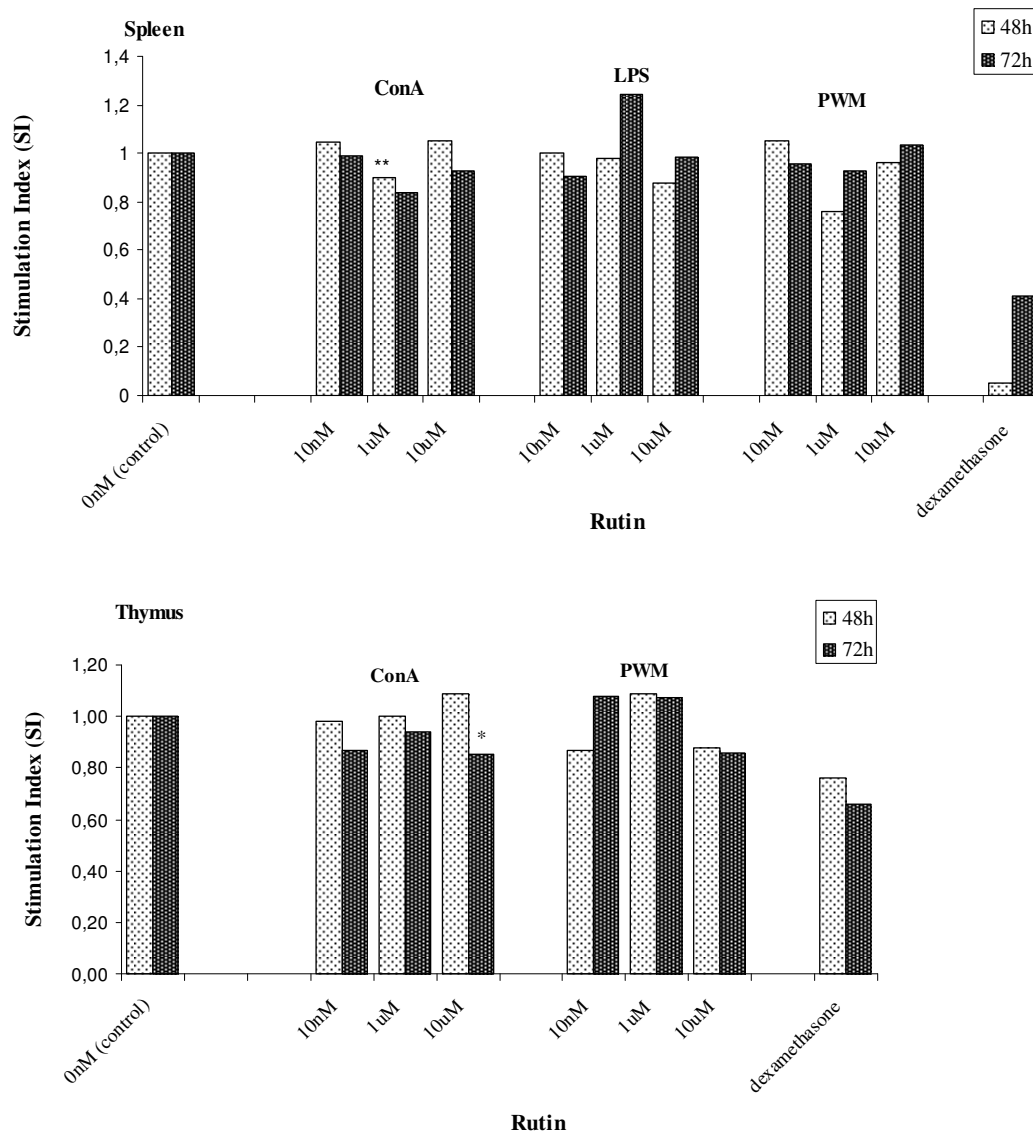


Fig.2 Effect of rutin on the mitogenic response of murine splenocytes and thymocytes measured by [ $^3\text{H}$ ] thymidine uptake. Cells were exposed to ConA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), LPS (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or PWM (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) plus three different concentrations of rutin. Results are the stimulation index (SI) median from 4 to 6 independent experiments in triplicate. \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.05$ . The median cpm values of untreated splenocytes after stimulation were with ConA: 15168 (48h) and 38684 (72h), LPS 4166 (48h) and 5259 (72h), or with PWM 11163 (48h) and 30014 (72h), The median cpm values of untreated thymocytes after stimulation were with ConA: 8821 (48h) and 16532 (72h), or with PWM: 3044 (48h) and 9741 (72h).

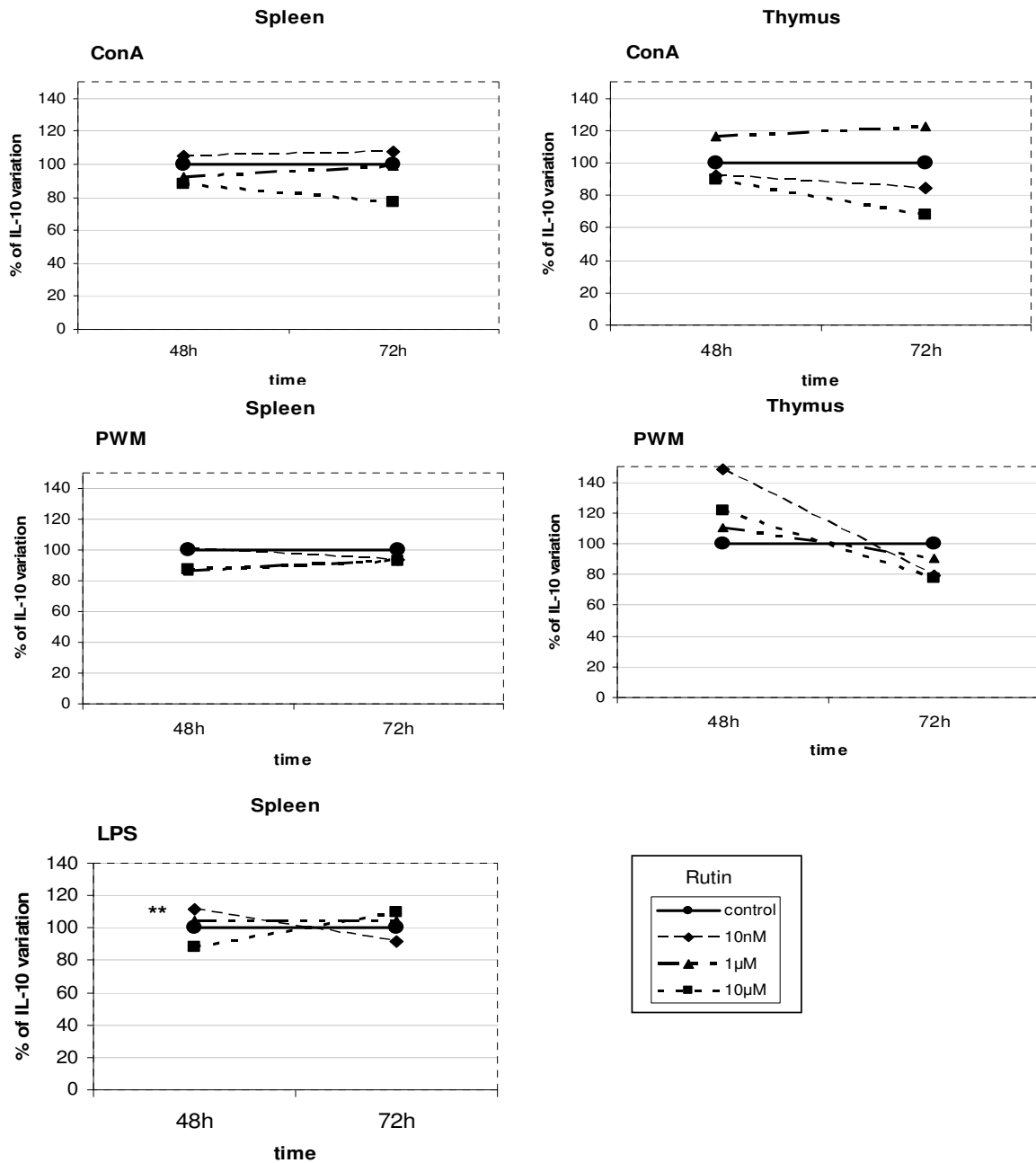


Fig.3 IL-10 production by spleen and thymus cells treated with 10nM, 1µM or 10µM of rutin and stimulated with ConA, LPS or PWM for 48 or 72 hours. Data are shown as median % of control from 5 to 7 independent experiments. \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.05$ . The median IL-10 concentration (pg/ml) of untreated splenocytes after stimulation were with ConA: 1192.3 (48h) and 2116.1 (72h); LPS 1986.7 (48h) and 4048.2 (72h); PWM 2690.8 (48h) and 7768.7 (72h). The median IL-10 concentration (pg/ml) of untreated thymocytes after stimulation were with ConA: 217.2 (48h) and 608.7 (72h); PWM: 236.7 (48h) and 2142.4 (72h).

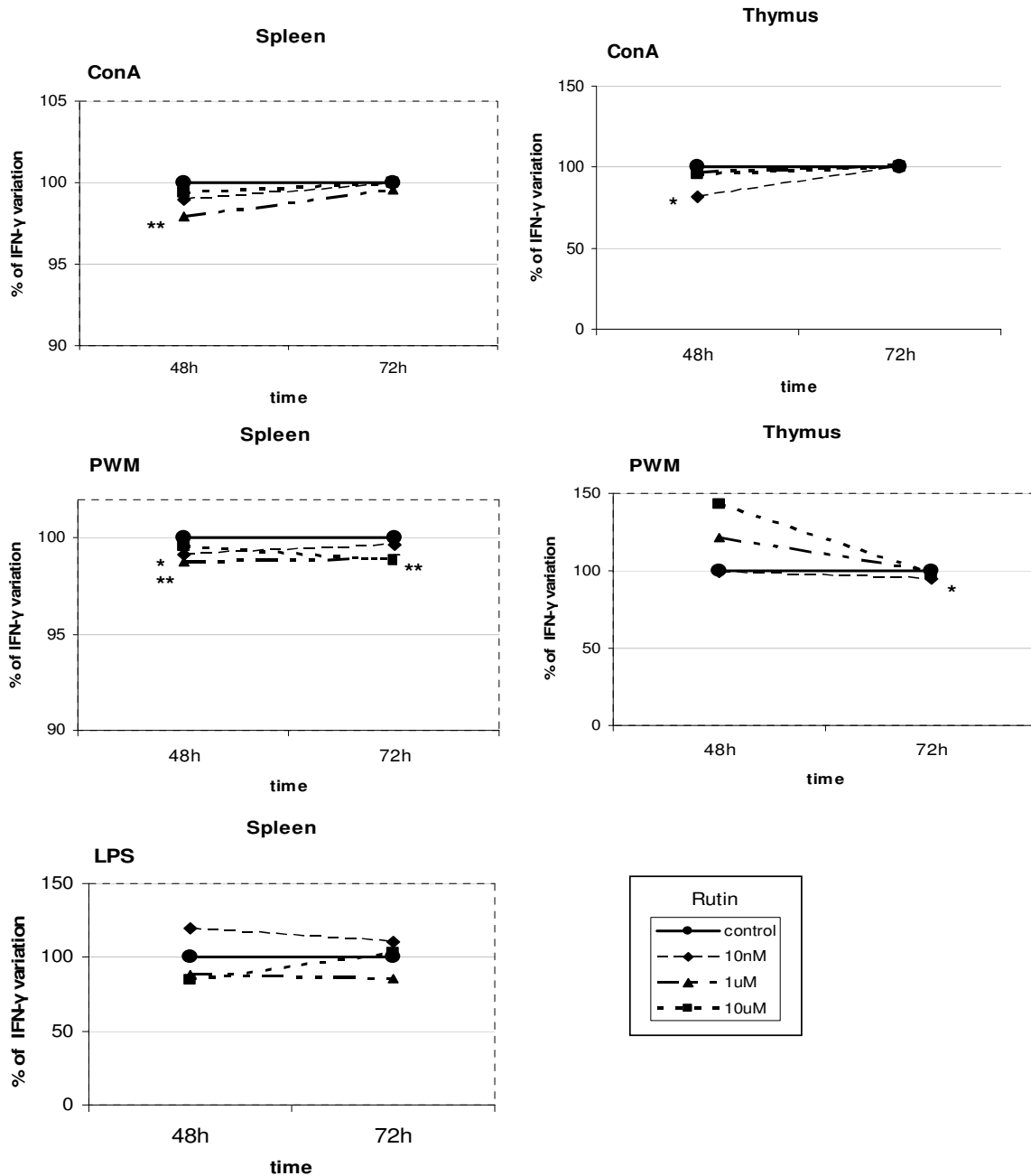


Fig.4 IFN- $\gamma$  production by spleen and thymus cells treated with 10nM, 1 $\mu$ M or 10 $\mu$ M of rutin and stimulated with ConA, LPS or PWM for 48 or 72 hours. Data are shown as median % of control from 5 to 7 independent experiments. \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.05$ . The median IFN- $\gamma$  concentration (pg/ml) of untreated splenocytes after stimulation were with ConA: 2276.5 (48h) and 2529.6 (72h); LPS 55.4 (48h) and 96.5 (72h); PWM 2545.9 (48h) and 2434.4 (72h). The median IFN- $\gamma$  concentration (pg/ml) of untreated thymocytes after stimulation were with ConA: 2069.9 (48h) and 2150.4 (72h); PWM: 712.3 (48h) and 2372.1 (72h).

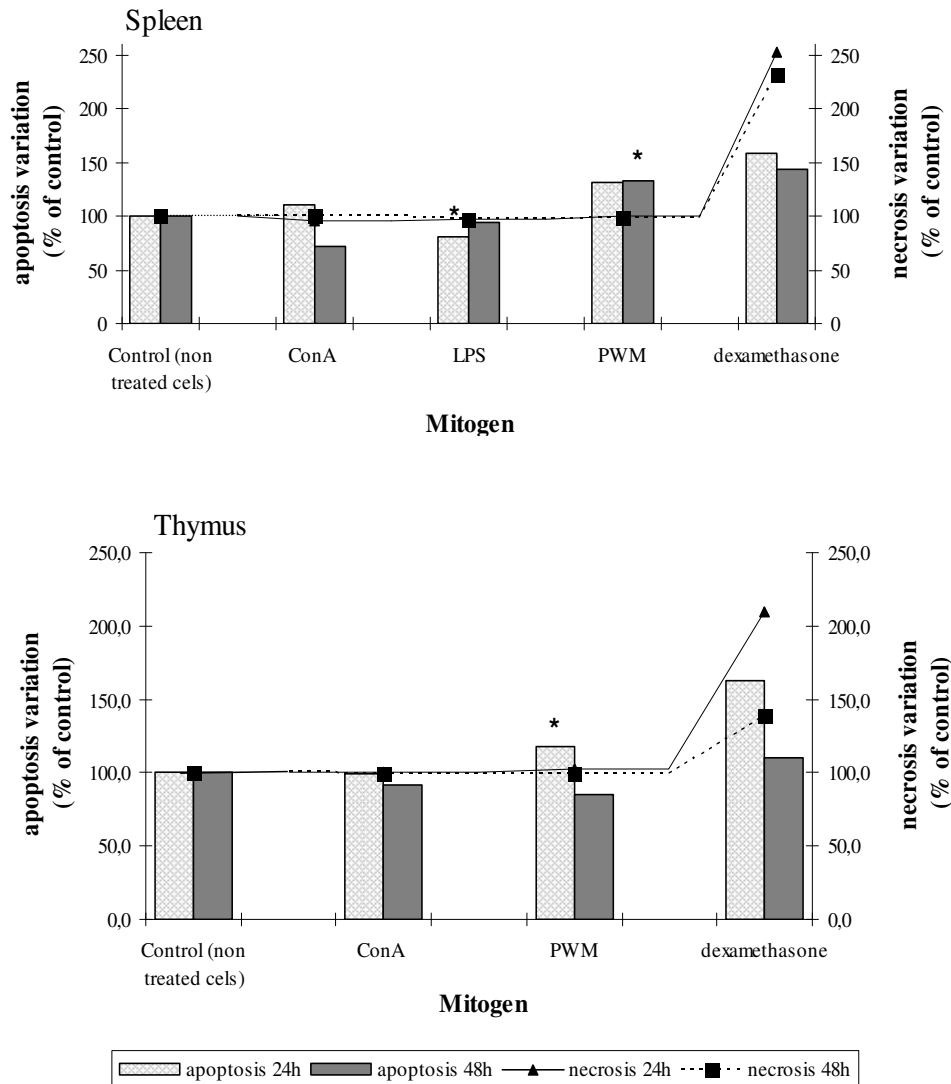


Fig. 5 Effect of rutin on apoptosis and necrosis of murine splenocytes and thymocytes. Cells were exposed to ConA, LPS or PWM and 10 $\mu$ M of rutin for 24 or 48 hours. Results are the median % of apoptosis or necrosis variation compared to control (non treated cells). Data from 3 to 5 independent experiments. \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.05$ . The median % of annexinV stained cells of untreated splenocytes after stimulation were with ConA: 1.02% (24h) and 0.6% (48h); LPS 2.35% (24h) and 1.5% (48h); PWM 1.00% (24h) and 3.38% (48h). The median % of annexinV stained cells of untreated thymocytes after stimulation was with ConA: 32.8% (24h) and 36.9% (48h); PWM: 45.9% (24h) and 46.26% (48h).

### Optional Figures and Tables

Lymphoproliferation and cytokine production data are also expressed on Figures 6, 7 and 8 where it is possible to visualize a comparative affect of rutin on spleen and thymus cells stimulated by the three different mitogens.

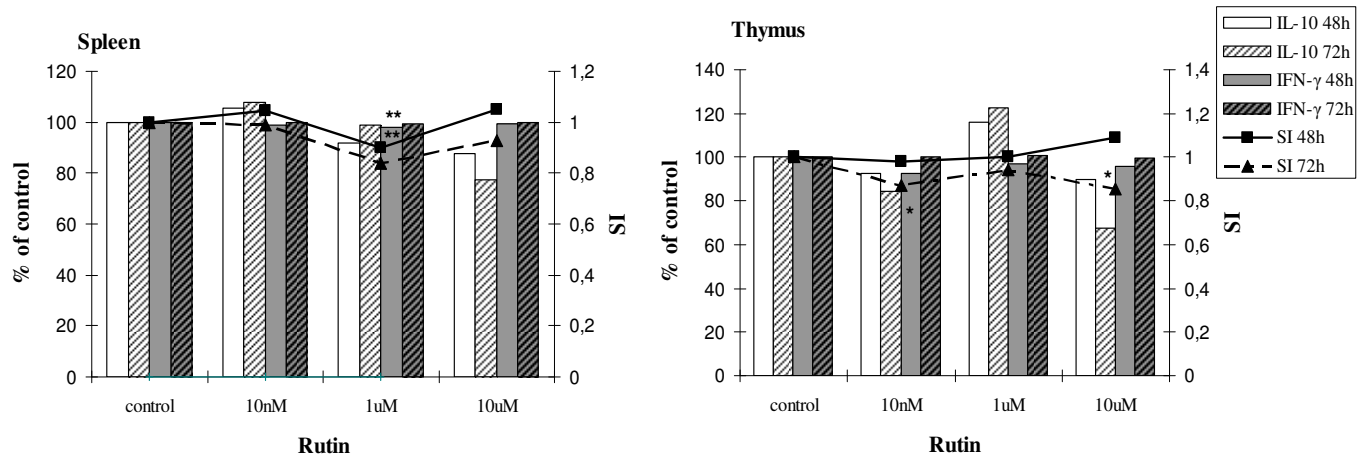


Fig.6 Effect of three different concentrations of rutin on IL-10 and IFN- $\gamma$  production and on proliferation of spleen and thymus cells stimulated by ConA (10 $\mu$ g/ml) for 48 or 72 hours. Data are represented as median % of variation compared to control (non treated cells) and stimulation index from 3 to 7 independent experiments. \* $P$ <0.01; \*\* $P$ <0.05. Results with splenocytes treated with 1 $\mu$ M of rutin showed a small, but statistically significant, decrease of 3% ( $p$ <0.05) on IFN- $\gamma$  levels and a decrease of 11% ( $p$ <0.05) on stimulation index (SI) after 48 hours. Thymocytes treated with rutin at 10nM showed a decrease ( $p$ <0.01) of 18% on the same cytokine levels and a decrease of 15% ( $p$ <0.01) on SI after 72h when treated with the highest concentration of drug (10 $\mu$ M).



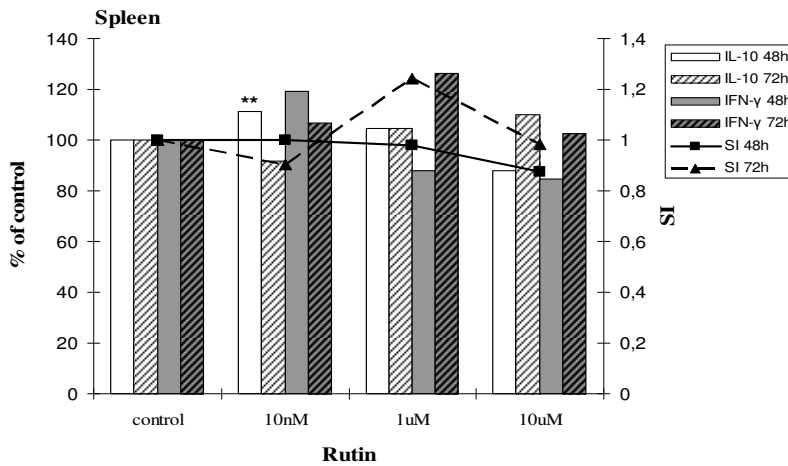


Fig.7 Effect of three different concentrations of rutin on IL-10 and IFN- $\gamma$  production and on proliferation of spleen cells stimulated by LPS ( $5\mu\text{g/ml}$ ) for 48 or 72 hours. Data are represented as median % of variation compared to control (non treated cells) and stimulation index from 3 to 7 independent experiments. \* $P<0.01$ ; \*\* $P<0.05$ . Murine spleen cells, stimulated by LPS and in the presence of 10nM of rutin showed an increase of 11% ( $p<0.05$ ) on its IL-10 production after 48h.

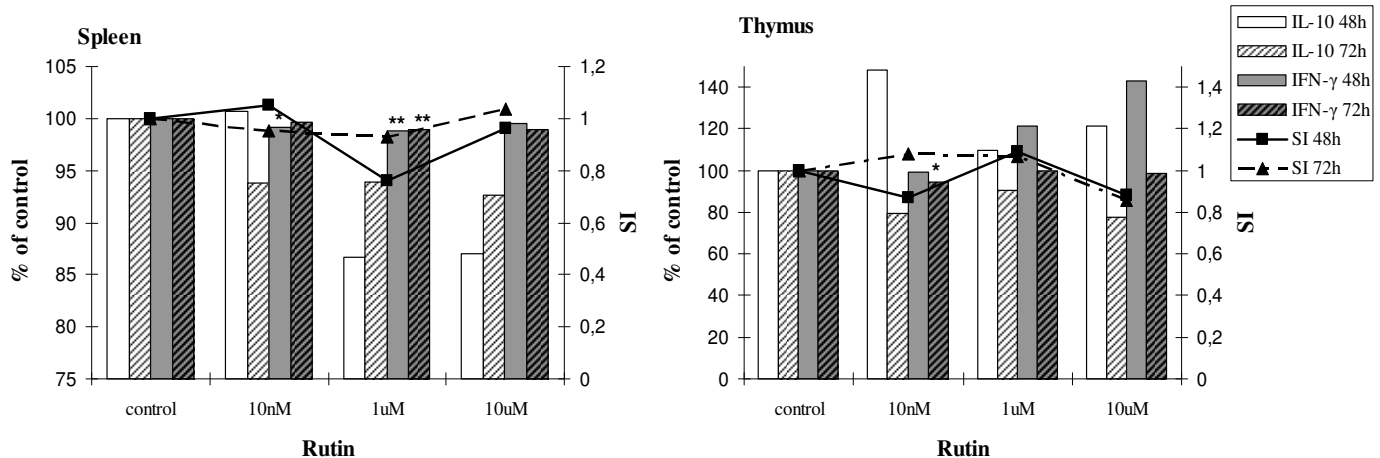


Fig.8 Effect of rutin on IL-10 and IFN- $\gamma$  production and lymphoproliferation of spleen and thymus cells stimulated by PWM for 48 and 72 hours. Spleen cells stimulated by PWM and treated with 10nM or  $1\mu\text{M}$  of rutin showed a small decrease of 1-2% on IFN- $\gamma$  levels after 48h and 72h ( $p<0.05$ ). In the presence of 10nM of rutin, thymocytes stimulated by PWM showed a decrease of 6% on this cytokine levels ( $p<0.01$ ) after 72 hours. No statistically significant changes occurred regarding the IL-10 production by these cells stimulated with PWM and treated with rutin.

Table 1  
Effect of rutin on the proliferation of murine splenocytes induced by different mitogens

Compounds			
Mitogens	Rutin	48h	72h
<b>ConA , LPS or PWM</b>	0nM (control)	1.00	1.00
<b>ConA</b> (10µg/ml)	10nM	1.05 (0.29-1.06)	0.99 (0.48-1.46)
	1µM	0.90 (0.57-0.93) **	0.84 (0.82-1.05)
	10µM	1.05 (0.66-1.70)	0.93 (0.65-1.23)
<b>LPS</b> (5µg/ml)	10nM	1.00 (0.26-2.36)	0.91 (0.39-2.23)
	1µM	0.98 (0.79-1.74)	1.24 (0.67-1.62)
	10µM	0.87 (0.41-1.11)	0.98 (0.68-1.81)
<b>PWM</b> (5µg/ml)	10nM	1.05 (0.82-1.20)	0.95 (0.60-1.29)
	1µM	0.76 (0.71-1.31)	0.93 (0.33-1.17)
	10µM	0.96 (0.76-1.12)	1.04 (0.88-1.10)
no	dexamethasone	0.05 (0.01-0.32)	0.41(0.06-3.60)

Stimulation index obtained by comparison with non treated group (cells plus mitogen and diluent - DMSO). Positive control of apoptosis is represented by cells treated with 100nM of dexamethasone. All data are expressed as median (range) of five experiments. Spleen cells were cultured for 48 and 72 hours in the presence of mitogens and three different concentrations of rutin. \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.05$  (Mann-Whitney test).

Table 2  
Effect of rutin on the proliferation of murine thymocytes induced by different mitogens

Compounds			
Mitogens	Rutin	48h	72h
<b>ConA or PWM</b>	0nM (control)	1.00	1.00
<b>ConA</b> (10µg/ml)	10nM	0.98 (0.40-1.81)	0.87 (0.39-1.12)
	1µM	1.00 (0.61-1.46)	0.94 (0.63-1.41)
	10µM	1.09 (0.55-1.65)	0.86 (0.49-0.95) *
<b>PWM</b> (5µg/ml)	10nM	0.87 (0.40-1.45)	1.08 (0.33-1.41)
	1µM	1.09 (0.92-1.12)	1.07 (0.98-1.33)
	10µM	0.88 (0.59-1.11)	0.86 (0.75-1.12)
no	dexamethasone	0.76 (0.17-3.09)	0.66 (0.33-4.68)

Stimulation index obtained by comparison with non treated group (cells plus mitogen and diluent - DMSO). Positive control of apoptosis is represented by cells treated with 100nM of dexamethasone. All data are expressed as median (range) of five experiments. Thymus cells were cultured for 48 and 72 hours in the presence of mitogens and three different concentrations of rutin. \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.05$  (Mann-Whitney test).

Table 3  
Effect of rutin on the apoptosis and necrosis of murine splenocytes stimulated with different mitogens

Rutin 10 $\mu$ M	apoptosis		necrosis	
	24h	48h	24h	48h
<b>Control</b> (non treated cels)	100	100	100	100
<b>ConA</b> (10 $\mu$ g/ml)	110.5 (52.6-173.1)	71.4 (40-105.6)	96.1 (90.3-102.8)	100.1 (98.1-100.9)
<b>LPS</b> (5 $\mu$ g/ml)	80.7 (61.9-97.7)*	94.5 (71.4-265.9)	97.1 (68.2-100.3)	96.4 (85.9-108.5)
<b>PWM</b> (5 $\mu$ g/ml)	132.1 (83.3-423.6)	133.3(102.9-216)*	100.6 (97.1-113.7)	99.3 (87.3-104.1)
<b>Dexamethasone</b>	158.9 (39-3229.1)	144.2 (10.2-3615)	252.7 (115.8-263)	232.1 (88.4-278.1)

% of apoptosis and necrosis variation obtained by comparison with non treated group (cells plus mitogen and diluent - DMSO). Positive control of apoptosis is represented by cells treated with 100nM of dexamethasone. All data are expressed as median (range) of 3-5 experiments. Spleen cells were cultured for 24 and 48 hours in the presence of mitogens and 10 $\mu$ M of rutin. \* $P$ <0.01; \*\* $P$ <0.05 (Mann-Whitney test).

Table 4  
Effect of rutin on the apoptosis and necrosis of murine thymocytes stimulated with different mitogens

Rutin 10 $\mu$ M	apoptosis		Necrosis	
	24h	48h	24h	48h
<b>Control</b> (non treated cels)	100.0	100.0	100.0	100.0
<b>ConA</b> (10 $\mu$ g/ml)	99.2 (82.9-116.5)	92.1 (81.4-135.5)	100.9 (99.4-113.8)	99.6 (96.1-101.7)
<b>PWM</b> (5 $\mu$ g/ml)	117.6 (102-141)*	85.1 (49.8-103.6)	102.4 (93.3-118.3)	98.8 (96.9-101.4)
<b>dexamethasone</b>	162.9 (98.7-368.9)	110.2 (27.5-210.5)	209.9 (143.8-292)	138.3 (98.3-169.9)

% of apoptosis and necrosis variation obtained by comparison with non treated group (cells plus mitogen and diluent - DMSO). Positive control of apoptosis is represented by cells treated with 100nM of dexamethasone. All data are expressed as median (range) of 3-5 experiments. Thymus cells were cultured for 24 and 48 hours in the presence of mitogens and 10 $\mu$ M of rutin. \* $P$ <0.01; \*\* $P$ <0.05 (Mann-Whitney test).

## 6. DISCUSSÃO GERAL E CONSIDERAÇÕES

O presente estudo caracteriza-se como um teste pré-clínico no desenvolvimento de novos fármacos. Esta etapa *in vitro* do trabalho é, normalmente, seguida de testes *in vivo* em animais, sendo ambas extremamente importantes para que se estabeleçam as condições de segurança para a aplicação em seres humanos como absorção, distribuição, metabolismo, eliminação, efeitos indesejáveis e atuação da droga.

Os resultados mostram que tanto a rutina quanto a arborinina interferem moderadamente na linfoproliferação de células esplênicas e tímicas. No entanto, a arborinina apresenta tanto efeitos positivos quanto negativos na linfoproliferação induzida pelos três mitógenos testados e a rutina induz apenas inibição da proliferação das células estimuladas e somente com as lectinas mitogênicas ConA e PWM e numa intensidade menor quando comparadas com os valores alterados pela arborinina.

As duas drogas também mostraram ter efeito indutor e inibidor de apoptose em células esplênicas ou tímicas estimuladas com LPS ou PWM. Células estimuladas com ConA não apresentaram variação nos valores de apoptose sob efeito das drogas.

A funcionalidade, testada pela produção de citocinas, também se mostrou alterada de maneira diferente na presença de cada droga. A arborinina induziu diminuição na produção de IL-10 por células estimuladas com as lectinas ConA e PWM enquanto que a rutina induziu aumento na produção desta citocina por células estimuladas com LPS. A produção de IFN- $\gamma$  se mostrou diminuída por células esplênicas e tímicas estimuladas com os três diferentes mitógenos e aumentada somente em células tímicas estimuladas com PWM na presença de arborinina e mas se apresentou diminuída em células estimuladas com ConA e PWM.

As variações nos resultados relacionados à apoptose e à proliferação de células esplênicas e tímicas estimuladas com o mesmo mitógeno e que sofrem ação das drogas em períodos diferentes, pode ser explicada pelo fato de as células se encontrarem em diferentes estágios de maturação e/ou ativação nestes órgãos.

Não foi observada nenhuma alteração estatisticamente significativa nos valores de linfoproliferação, apoptose, necrose ou produção de citocinas na presença das drogas sem estímulo mitogênico (dados não mostrados). Estes dados sugerem que os mecanismos de ação da droga estão relacionados a estados proliferativos e de ativação da célula.

É importante ressaltar também que apenas as células cultivadas na presença dos diferentes mitógenos e da droga na maior concentração, de 10 $\mu$ M, foram submetidas ao ensaio de apoptose e necrose devido à verificação de que os principais efeitos da droga sobre a funcionalidade e proliferação das células, observados nos experimentos iniciais, estavam relacionados às maiores concentrações da droga. Estes resultados se repetiram na maioria dos casos ao longo da execução dos experimentos. No entanto, foram observados resultados estatisticamente significativos de alteração dos valores de proliferação e produção de citocinas na presença das drogas em concentrações menores (10nM e 1 $\mu$ M).

Os resultados não apresentaram distribuição normal e, portanto, foram submetidos à análise estatística não paramétrica e expressos como mediana e não como média e desvio padrão. No anexo III é possível visualizar a distribuição dos dados relacionados à variação na produção das citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$ . Alguns dados apresentaram valores abaixo de 10% de variação em relação ao controle mas foram mencionados por representarem valores estatisticamente significativos apesar de discutível significância biológica.

A utilização de um modelo com animais *outbred* (ratos Wistar), onde as respostas podem variar de indivíduo para indivíduo, e de suspensão celular resultante de maceração dos órgãos do sistema imunológico (baço e timo), onde se encontram diferentes tipos celulares e componentes moleculares, pode gerar resultados heterogêneos e de análise mais complexa. No entanto, apresenta como principal vantagem a simulação da atividade das drogas em uma situação genética comparativamente mais favorável para uma população heterogênea e um microambiente mais próximo do que ocorreria *in vivo*.

A partir destes dados, faz-se necessária uma investigação mais detalhada de identificação das subpopulações que sofrem ação da droga, através de marcadores específicos, e de verificação do efeito das drogas em células tumorais e em modelos de inflamação, como a expressão de NOS ou na função fagocítica das células. É necessário investigar mais profundamente as vias de ativação e morte celular através da expressão de NF $\kappa$ B e outros fatores de transcrição, de caspases ou de inibidores da apoptose como o FLIP e genes da família bcl-2.

## 7. CONCLUSÕES

1. O alcalóide arborinina e o flavonóide rutina apresentaram efeitos diversos frente aos diferentes mitógenos utilizados.
2. As duas drogas testadas não apresentaram efeitos sobre as células não estimuladas.
3. As duas drogas testadas, na maior concentração, não induziram necrose nas células.
4. O efeito inibitório da arborinina e da rutina sobre a proliferação e funcionalidade de células esplênicas ou tímicas estimuladas com ConA não foi em decorrência de morte celular por apoptose ou por necrose na maior concentração das drogas testadas.
5. A arborinina possui inicialmente efeito indutor de apoptose em células esplênicas e tímicas estimuladas com PWM em 24 horas e tardiamente efeito inibidor de apoptose em células esplênicas estimuladas por LPS e em células tímicas estimuladas com PWM.
6. A arborinina possui efeito inibidor sobre a proliferação de células esplênicas estimuladas com ConA ou PWM e sobre a produção das citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  por estas células estimuladas com ConA, PWM ou LPS.
7. A arborinina possui efeito estimulador sobre a proliferação de células esplênicas estimuladas com LPS e sobre a proliferação e a produção da citocina IFN- $\gamma$  de células tímicas estimuladas com ConA e PWM em 48 horas.
8. A rutina possui ação indutora moderada de apoptose em células estimuladas por PWM, ação inibitória *in vitro* sobre a proliferação das células estimuladas com ConA e moderada nos níveis de IFN- $\gamma$  pelas células estimuladas com estas lectinas mitogênicas.
9. A rutina possui efeito inibidor de apoptose e estimulador da produção de IL-10 em células esplênicas no período iniciais da estimulação celular com LPS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIMA H.; ASHIDA, H.; DANNO, G-I. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.66, n.5, p.1009-1014, 2002.
- ASHRAF, M. T.; KHAN R H. Mytogenic Lectins. **Med Sci Monit.**, v.9, n.11, p.265-269, 2003.
- AUTORE, G., et al. Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia allata* its derived flavonols. **Life Sci.**, V.70, p.523-534, 2001.
- BAGCHI, D. et al. Cellular protection with protocianidins derived from seeds. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.957, p.260-270, 2002.
- BAUMGERTEL, A., et al. Purification and characterization of a flavonol 3-O- $\beta$ -heterodisaccharidase from the dried herb of *Fagopyrum esculentum* Moench. **Phytochemistry**. V.64, n.2, p. 411-418 ,2003.
- BOTSARIS, A.S. **Fitoterapia Chinesa e Plantas Brasileiras**. 2<sup>a</sup>ed. Cidade: Ícone, 2002. p.37-41.
- BREKELMANS, P.; VAN EWIJK, W. Phenotypic characterization of murine thymic microenvironments. **Seminars in Immunology**, v.2, p.13-24, 1990.
- BREMNER P.; HEINRICH, M. Natural products as target modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.54, p.453-472, 2002.
- BUSTAMANTE, J.; SLATER, A F.G.; ORRENIUS, S. Antioxidant inhibition of thymocytes apoptosis by dihydrolipoic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.19, n.3, p. 339-347, 1995.
- CERQUEIRA, F., et al. Inhibition of lymphocyte proliferation by prenylated flavones: Artelastin as a potent inhibitor. **Life Sciences**, v.73, p.2321-2334, 2003.
- CHEN, J-J; DEADY L. W.; MACKAY M.F. Synthesis of some acridone alkaloids and related compounds. **Tetrahedron.**, v.53,n.37, p.12717-12728, 1997.
- DAFTARIAN, P. M., et al. **J. Immunology**, v.157, p.12, 1996.
- DESCHNER, E.E. et al. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinog.**, v12, n.7, p.1193-6, 1991.
- FIERS, W., et al. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. **Oncogene.**, v.18, p.7719-7730, 1999.
- FLETCHER, M. A., et al. Lymphocyte Proliferation. In: Rose, N. R. et al. **Manual of Clinical Laboratory Immunology**. 5.ed. Cidade, ASM Press, 1997, p.313-319

- FONSECA, C.A. et al. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v.16, n.7-8, p. 49-52, 2004.
- GEETHA, V. S.; VISWANATHAN S.; KAMESWARAN L. Comparison of total alkaloids of *Thylophora indica* and disodium cromoglycate on mast cell stabilization. **Ind. J. Pharmac.**, v.13, n.1, p.199-201, 1981.
- GALLATI, E.M., et al. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.4903-4908, 2003.
- HEINEN, E.; CORWANN, N.; KINET-DENOEL. The lymph follicle: a hard nut to crack. **Immunology Today**, v.9, p. 240-243, 1988.
- HENRIQUES A. T., et al. Alcalóides, generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1.ed, Porto Alegre: Florianópolis, Universidade, 1999, p. 641-655.
- HIRANO, R., et al . Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. **J. Nutr Sci.Vitaminol.,Tóquio.**, v.47, p.357-362, 2001.
- JANBAZ,K.H.; SAEED,S.A.; GILANI,A.H. Protective effect of rutin on paracetamol- and CCL<sub>4</sub>- induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia.**, v.73, p.557-563, 2002.
- JANUÁRIO, A.H. **Estudo fitoquímico de *Esembeckia grandiflora* e *Almeidea rubra* (RUTACEAE)**. 1995. Tese (doutorado em farmacologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995.
- JUNG, M., et al. Amide analogues of trichostatin A as inhibitors of histone deacetylase and inducers of terminal cell differentiation. **J Med Chem.**, v.42, n.22, p.4669-79, 1999.
- KAWAII, S., et al. Acridones as inducers of HL-60 cell differentiation. **Leukemia Research.**, v.23, p.263-269, 1999.
- KNOWLESS, L. M., et al. Flavonoids suppress androgen-independent human prostate tumor proliferation. **Nutrition and Cancer**, v.38, n.1, p. 116-122, 2000.
- KOBAYASHI, S. et al. Polyphenols from some foodstuffs as inhibitors of ovalbumin permeation through Caco-2 cell monolayers. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.67, n.6, p.1250-1257, 2003.
- LIEW, F. Y. Th1 and Th2 cells: a historical perspective. **Nature reviews Immunol.**, v2, p.55-60, 2002.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2.ed. Rio de Janeiro: Plantarum, 1949. p175



LOU, Y., et al. Homoharringtonine mediates myeloid cell apoptosis via upregulation of proapoptotic bax and inducing caspase-3mediated cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). *American J. of Hematology*, v.76, n.3, p.199-204, 2004.

MARTINEZ-FLOREZ, S., et al. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr.Hosp.*, v.XVII, n.6, p.271-278, 2002.

MATSUURA, H. et al. Isolation and measurement of quercetin glucosides in flower buds of japanese butterbur (*Petasites japonicus* subsp. *gigantea* Kitam.), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v.66, n.7, p.1571-1575, 2002.

MEDZHITOV. R. Toll-Like receptors and innate Immunity. *Nature Rev. Immunol.*, v.1, p.135-145, 2001.

MIDDLETON, E.J.R., KANDASWAMI C., THEOHARIDES, T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer. *Pharmacol Rev.*, v.52, p.673-751, 2000.

MILLER, K. The stimulation of human B and T lymphocytes by various lectins. *Immunobiology*, v.165, n. 2, p.132-146, 1983.

MOOKERJEE B.K., LEE T-P., LIPPES H.A, MIDDLETON E. Some effects of flavonoides on lymphocyte proliferative responses. *J Immunopharmacol*, v.8, p.371-392,1986.

MORIKAWA, K., et al. Inhibitory effect of quercetin on carragenan-induced inflammation in rats. *Life Sciences*, v.74, p. 709-721, 2003.

MURAOKA K. et al.. Flavonoids exert diverse inhibitory effects on the activation of NF- kappaB pathway. *Transplant. Proc.*, v. 34, p. 1335-1340, 2002.

NAMGOONG, S.Y., et al. Effects of naturally occurring flavonoids on mitogen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sciences*, v. 54, p. 313-320, 1993.

NG, T.B.; LIU, F.; WANG Z. T. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sciences*, v.66, n.8, p.709-723, 2000.

OSTRAKHOVITCH, E.A.; AFANAS'EV, I.B. Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators. *Biochem. Pharmacol.*, v.62, p.743-746, 2001.

PETIT, P. X. et al. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, v.130, p.157-167, 1995.

PETZKA, S. et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, v.22, p.929-979, 2004.

QUEENER, S.F., et al. In vitro activities of acridone alkaloids against *Pneumocystis carinii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 2, p. 377-399.

REIS, M. S.; MARIOT, A. Diversidade Natural e aspectos agronômicos de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1.ed, Porto Alegre: Florianópolis, Universidade, 1999, p. 39-41

RENNER, K.; KOFLER, R.; GNAIGER, E. Mitochondrial function in glucocorticoid triggered T-ALL cells with transgenic Bcl-2 expression. **Mol.Biol. Rep.**, v.29, p. 97-101, 2002.

ROBBINS, S. Patologia Celular: Lesão e morte da célula. In: ROBBINS, S. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 1-26.

ROSSIO, J. L. Cytokines and Immune cells products. In: Rose N. R. et al . **Manual of Clinical Laboratory Immunology**. 5.ed. Cidade: ASM Press, 1997. p. 348-356.

SOLIS-MALDONADO, C., et al. Differential effects of synthetic indoloquinolisinines on in vitro rat lymphocyte and macrofage functions. **Int. Immunopharmacology**, v.3, p.1261-1271, 2003.

SU, T-L. et al. **J. Med. Chem.**, v.35. p.2703-2710, 1992.

TAYLOR, G.A.; FENG, C.G.; SHER, A. P47 GTPases: Regulators of immunity to intracellular pathogens. **Nature Rev. Immunol.**, v.4, p100-107, 2004.

THATTE, U.; BAGADEY, S.; DAHANUKAR, S. Modulation of programmed cell death by medicinal plants. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v.46, n.1, p.199-214, 2000.

THOME, M.; TSCHOPP, J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. **Nature Reviews**, v.1, p.50-58, 2001.

VARNEY, M. L., et al. **J. Interf. Cytokine Res.**, v.19, p. 351, 1999.

WANG, J.; MAZZA G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumour necrosis factor alpha in LPS /IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 4183-4189, 2002.

WEI, Y. Q. et al. Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein **Cancer Research**, v. 54, n.18, p. 4952-4957, 1994.

YI, H., et al. Regulation of Vinca alkaloid-induced apoptosis by NF-kappaB/IkappaB pathway in human tumor cells. **Mol. Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 3, p. 271-277, 2004.

YOU, K.M., et al. Vitexcarpin, a flavonoid from the fruits of *Vitex rotundifolia*, inhibits mouse lymphocyte proliferation and growth of cell lines in vitro. **Planta Medica**, v.64, n.6, p. 546-550, 1998.

YOUDIM, K.A., et al. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. **J. Nutr. Biochem.**, v.13, p. 282-288, 2002.

YUAN, Z. et al. Constituents of the underground parts of *Glehinia littoralis*. **Chem. Pharm. Bull.**, v.50, n.1, p.73-77, 2002.

ZBIGNIEW D., et al. Methods for analysis of apoptosis by flow citometry. In: Rose, N.R. et al. **Manual of Clinical Laboratory Immunology**. 5.ed, Cidade, ASM Press, 1997. p.334-343.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1.ed, Porto Alegre: Florianópolis, Universidade, 1999, p. 489-515.

## CITAÇÕES ELETRÔNICAS

HENRIQUES R. P. B. **Ciência Hoje**. v. 33, n.195, 1996. Disponível em:  
(<http://cienciahoje.uol.com.br/materia/resources/files/chmais/pass/ch195/cerrado.pdf>)  
Acesso em janeiro de 2005.

LAPEMM: <http://www.lapemm.ufba.br/LAPEMM.doc>  
Acesso em novembro/ 2004

Merck S.A.: <http://www.mercksa.com.br>  
Acesso em janeiro/ 2005

OMS: <http://www.who.int/mediacentre/facsheets/fs134/en/>  
Acesso em novembro/ 2004.

PVP: <http://www.pvp.com.br>  
Acesso em novembro/ 2004

[http://www.radiobras.gov.br/ct/2002/materia\\_040102\\_4.htm](http://www.radiobras.gov.br/ct/2002/materia_040102_4.htm). Acesso em janeiro de 2005.

SIMÕES, C.M.O. ; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. In: Simões, C.M.O. et al **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Universidade, 2001.  
Disponível em:  
[www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sti/publicacoes/futAmaDilOportunidades/rev20011219\\_08.pdf](http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/sti/publicacoes/futAmaDilOportunidades/rev20011219_08.pdf)  
Acesso em novembro/ 2004

SOUZA, J. A.; MIRANDA , E.M. Plantas medicinais e fitoterápicos: alternativas viáveis.  
Disponível em FUNBIO:  
<http://www.funbio.org.br/publique/web/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=1329&sid=17>  
Acesso em novembro/ 2004.

## ANEXO I

### VARIÁVEIS UTILIZADAS

Células puras

Arb 10nM

Arb 10µM

Ru 10nM

Ru 10µM

Controle: DMSO (1:1000)

ConA

Arb 10nM + ConA

Arb 1µM + ConA

Arb 10µM + ConA

Ru 10nM + ConA

Ru 1µM + ConA

Ru 10µM + ConA

Controle: DMSO + ConA

LPS

Arb 10nM + LPS

Arb 1µM + LPS

Arb 10µM + LPS

Ru 10nM + LPS

Ru 1µM + LPS

Ru 10µM + LPS

Controle: DMSO + LPS

PWM

Arb 10nM + PWM

Arb 1µM + PWM

Arb 10µM + PWM

Ru 10nM + PWM

Ru 1µM + PWM

Ru 10µM + PWM

Controle: DMSO + PWM

Células + dexametasona (100nM)

## ANEXO II

### RESUMO ESQUEMÁTICO DOS RESULTADOS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS

ARBORININA	24h		48h		72h	
	B	T	B	T	B	T
Proliferação			↓ ConA/PWM ↑ LPS	↑ ConA PWM	↓ ConA	NA
Apoptose	↑ PWM	↑ PWM	↓ LPS	↓ PWM		
Necrose	NA	NA	NA	NA		
IFN- $\gamma$			↓ ConA /LPS	↑ PWM	↓ ConA/ LPS	↓ ConA/PWM
IL-10			↓ ConA/PWM	↓ ConA	NA	↓ ConA/PWM

RUTINA	24h		48h		72h	
	B	T	B	T	B	T
Proliferação			↓ ConA	NA	NA	↓ ConA
Apoptose	↓ LPS	↑ PWM	↑ PWM	NA		
Necrose	NA	NA	NA	NA		
IFN- $\gamma$			↓ ConA/PWM	↓ ConA	↓ PWM	↓ PWM
IL-10			↑ LPS	NA	NA	NA

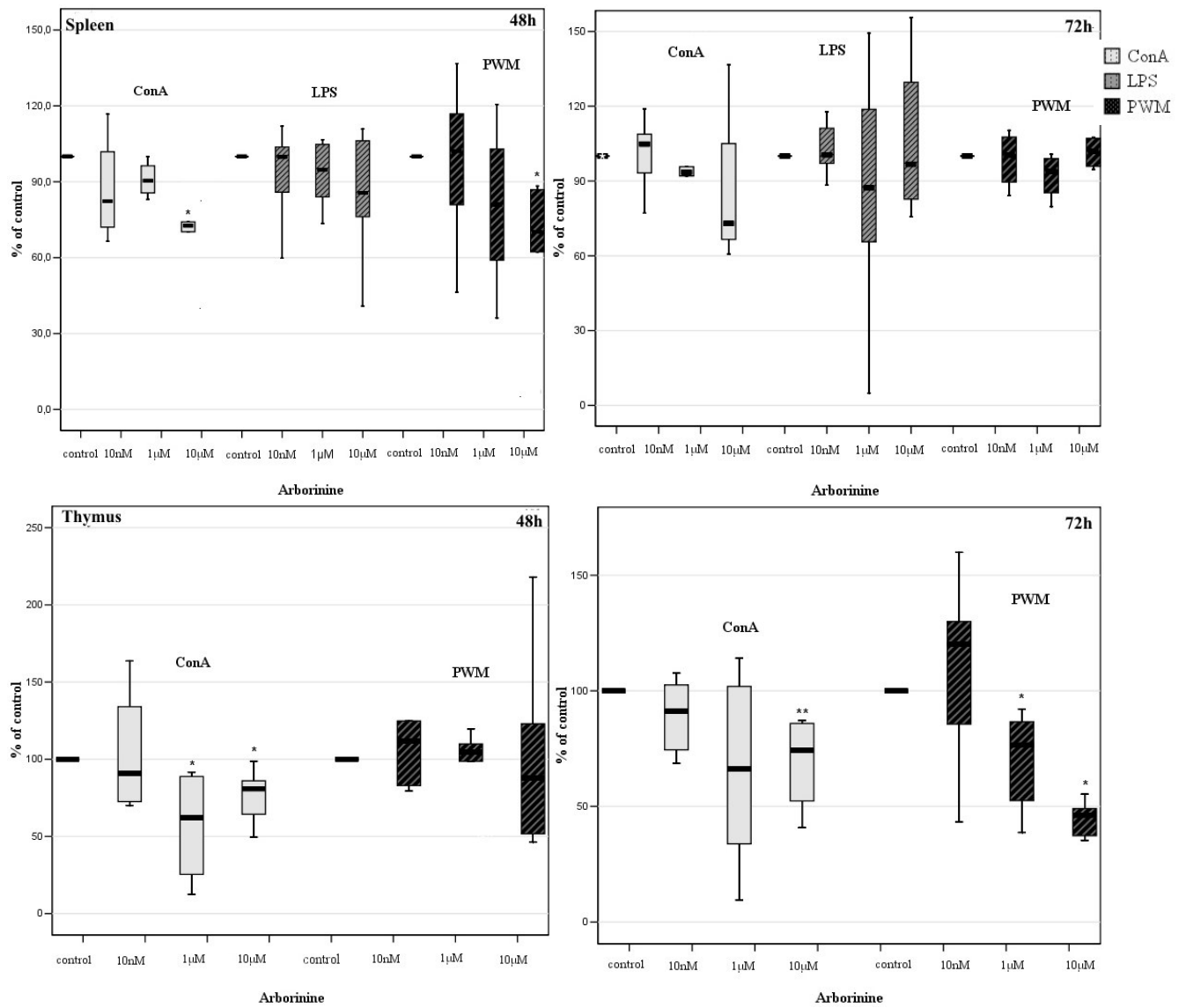
NA: não alterado

Em branco: não medido

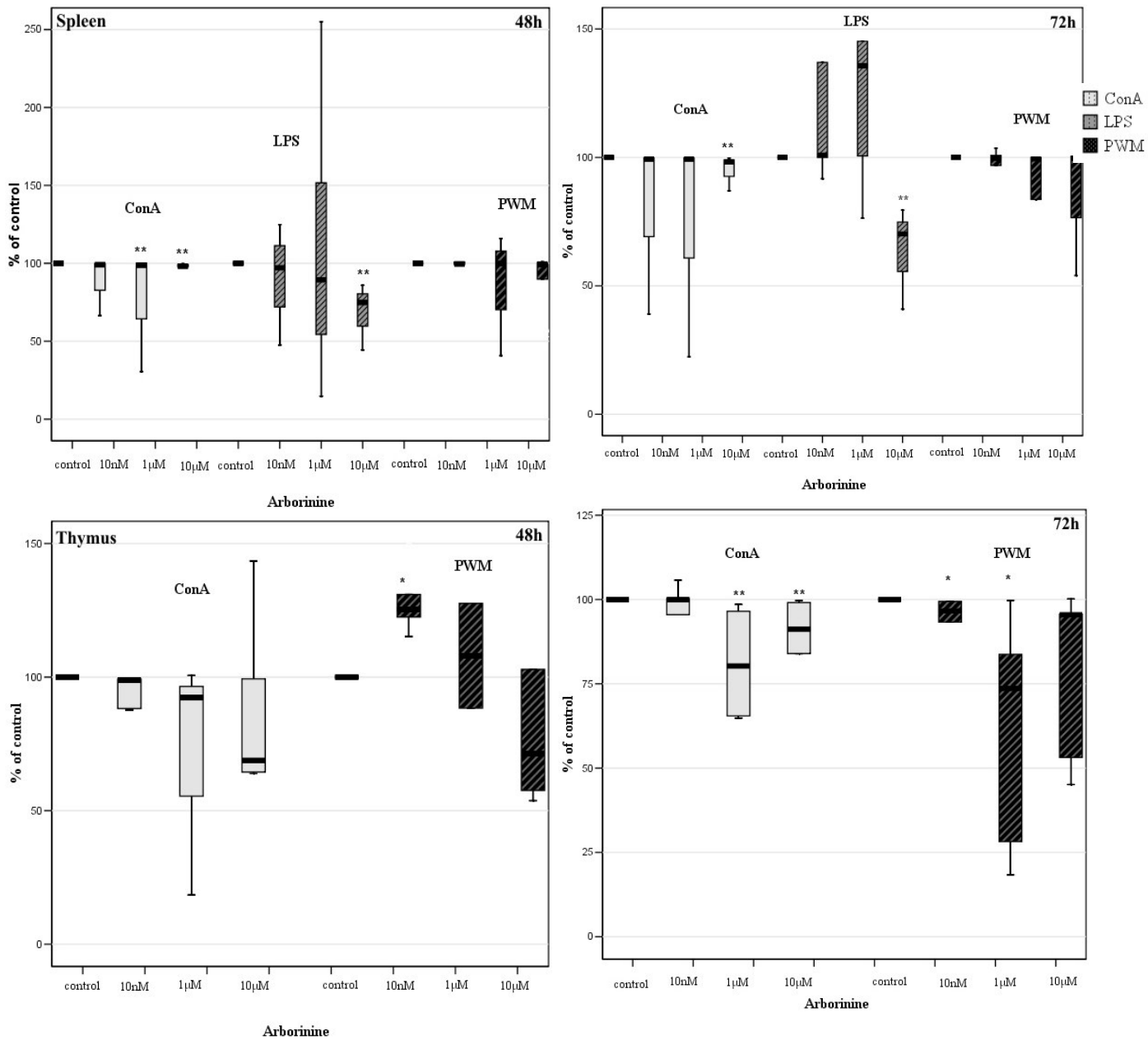
## ANEXO III

### DISTRIBUIÇÃO DOS DADOS REFERENTES À AÇÃO DAS DROGAS SOBRE A

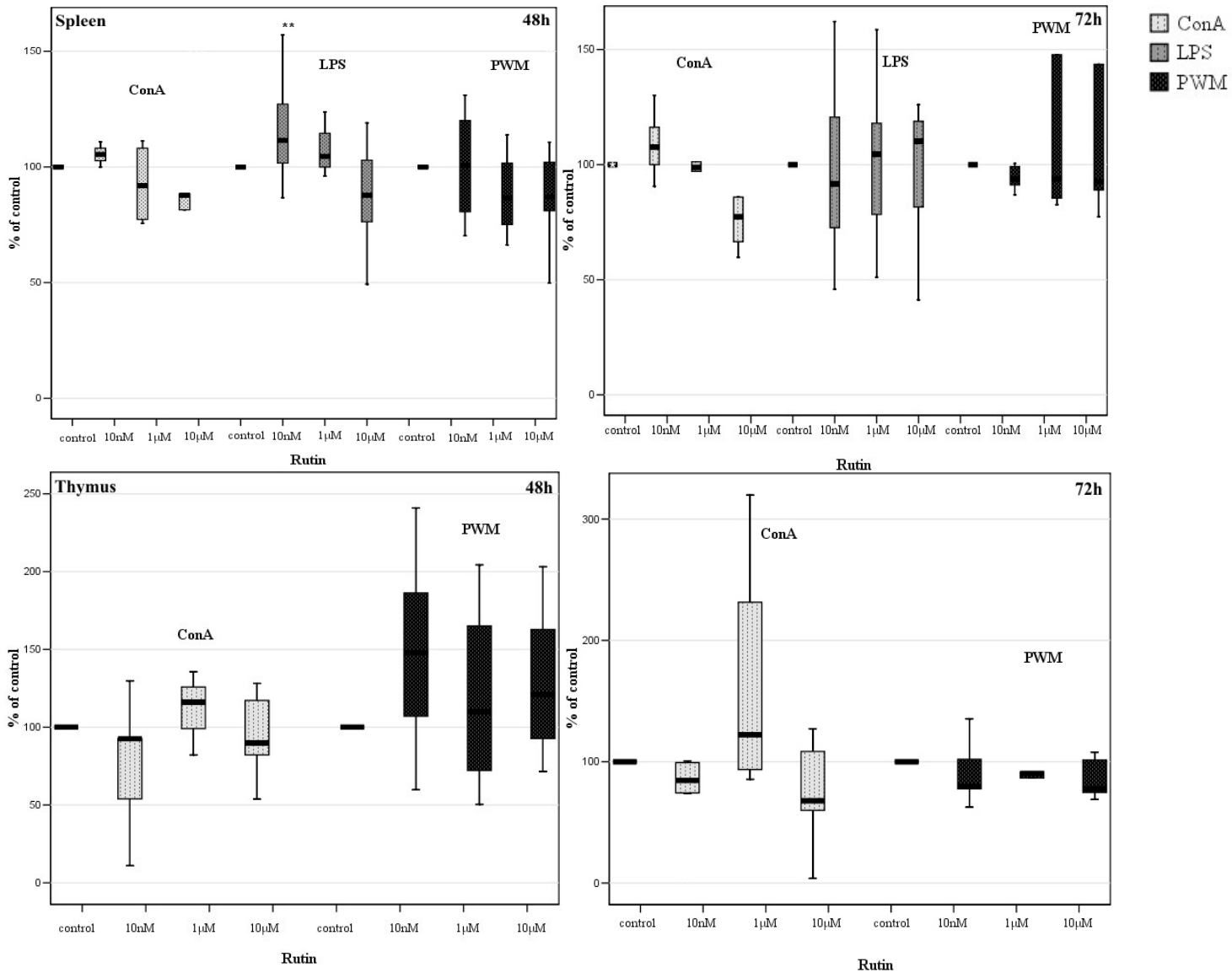
### VARIAÇÃO NA PRODUÇÃO DAS CITOCINAS IL-10 E IFN- $\gamma$



Efeito da arborinina na produção de IL-10 por células esplênicas e tímicas tratadas com 10nM, 1µM ou 10µM da droga e estimuladas com ConA (10µg/ml), LPS (5µg/ml) ou PWM (5µg/ml) por 48 e 72 horas.  
\* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.05$ .

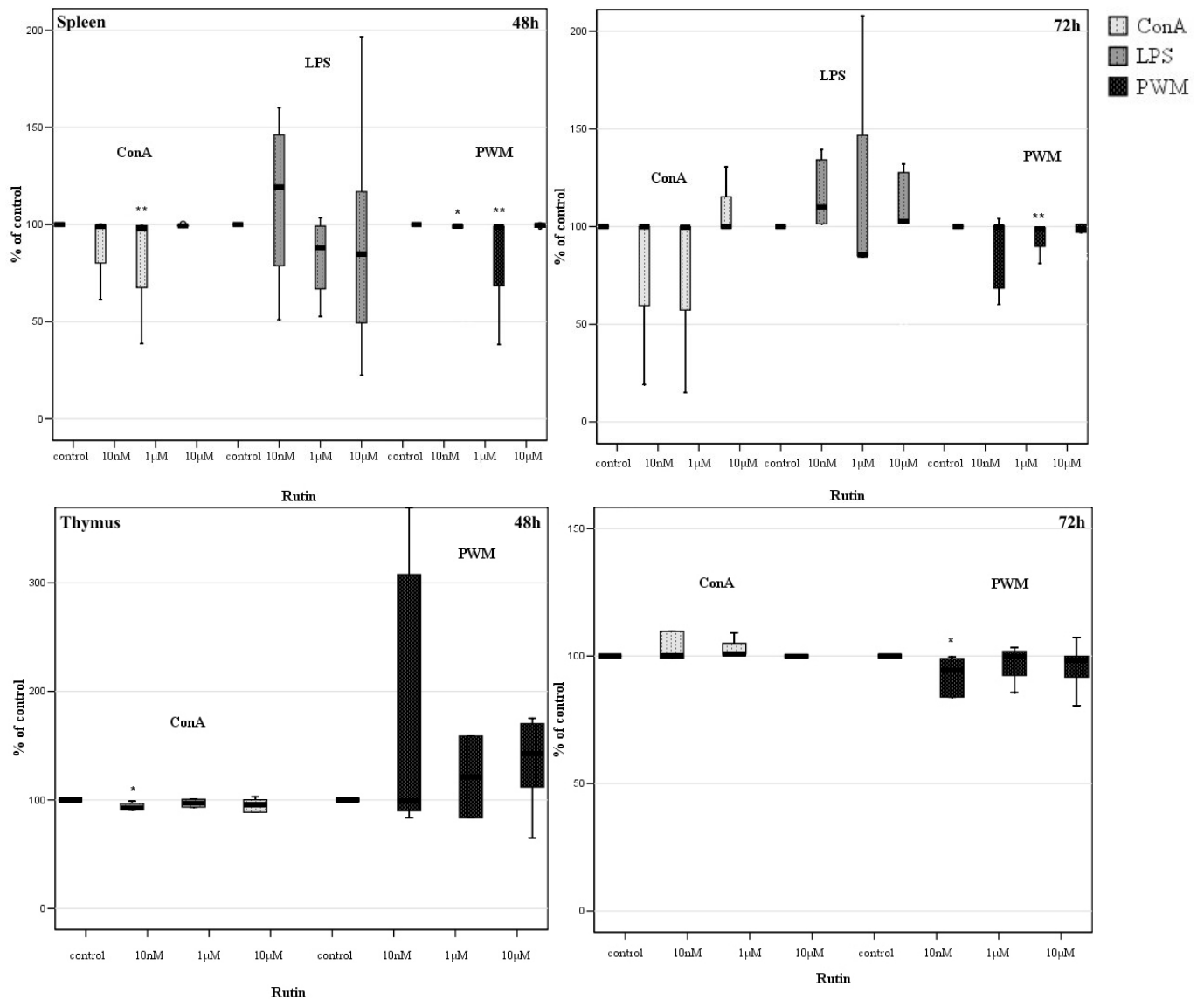


Efeito da arborinina na produção de IFN- $\gamma$  por células esplênicas e tímicas tratadas com 10nM, 1 $\mu$ M ou 10 $\mu$ M da droga e estimuladas com ConA (10 $\mu$ g/ml), LPS (5 $\mu$ g/ml) ou PWM (5 $\mu$ g/ml) por 48 e 72 horas. \* $P$ <0.01; \*\* $P$ <0.05.



Efeito da rutina na produção de IL-10 por células esplênicas e tímicas tratadas com 10nM, 1μM ou 10μM da droga e estimuladas com ConA (10μg/ml), LPS (5μg/ml) ou PWM (5μg/ml) por 48 e 72 horas.  
 \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.05$ .





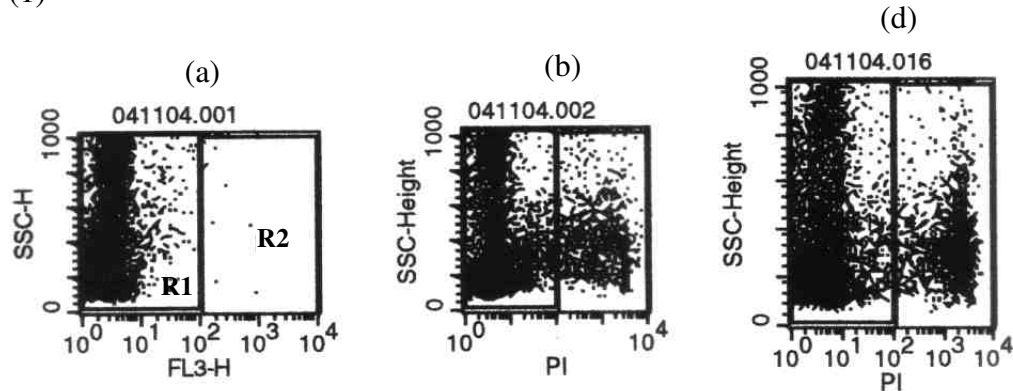
Efeito da rutina na produção de IFN- $\gamma$  por células esplênicas e tímicas tratadas com 10nM, 1 $\mu$ M ou 10 $\mu$ M da droga e estimuladas com ConA (10 $\mu$ g/ml), LPS (5 $\mu$ g/ml) ou PWM (5 $\mu$ g/ml) por 48 e 72 horas. \* $P$ <0.01; \*\* $P$ <0.05.

## ANEXO IV

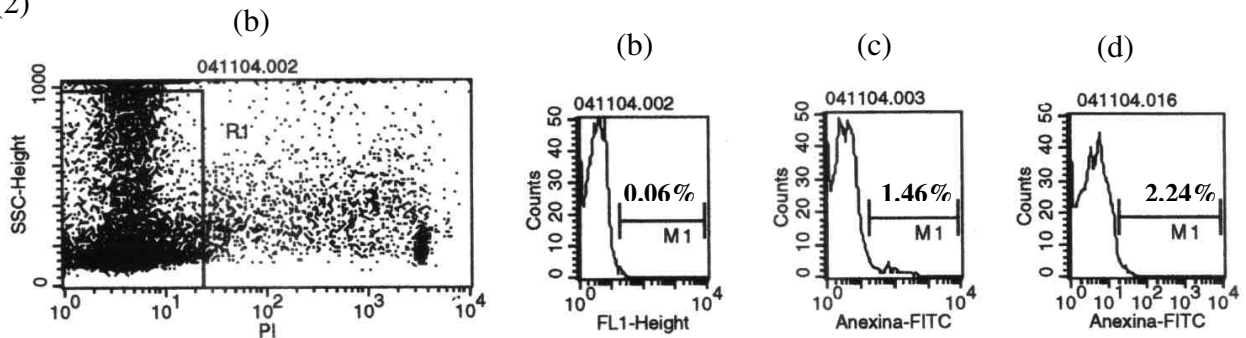
### DOT PLOTS E HISTOGRAMAS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO

#### I- BAÇO

(1)



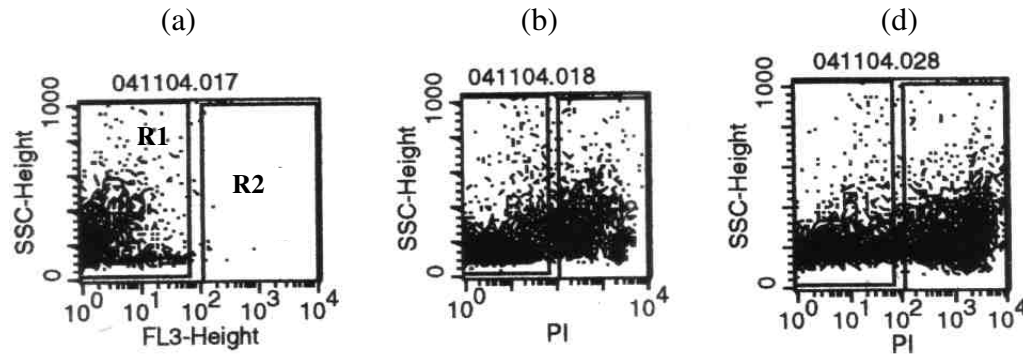
(2)



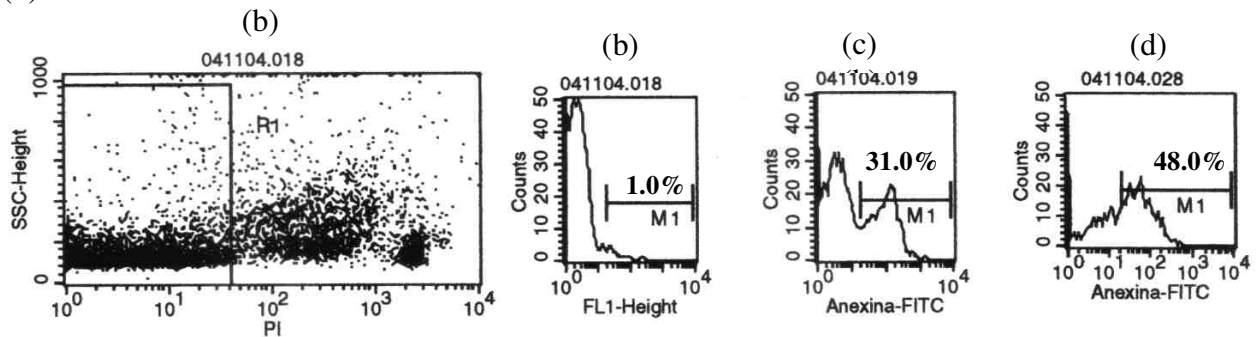
Dot plots mostrando os as células esplênicas marcadas com PI (1) e histogramas representando a marcação destas com anexina V (2). Os quadrantes delimitando as células viáveis (R1) foi estabelecido pelo controle sem marcação com PI (a) e com PI (b). A porcentagem de células em necrose foi estabelecida pela área correspondente R2. A porcentagem de células em apoptose foi estabelecida pela área correspondente a M1, obtida dentro do quadrante R1 (células viáveis), pelo controle com PI e sem anexina V (b). (c): células puras com anexinaV e PI (d): células esplênicas tratadas com 100nM de dexametasona. (controle positivo de apoptose).

## II- TIMO

(1)



(2)



Dot plots mostrando os as células tímicas marcadas com PI (1) e histogramas representando a marcação destas com anexina V (2). Os quadrantes delimitando as células viáveis (R1) foi estabelecido pelo controle sem marcação com PI (a) e com PI (b). A porcentagem de células em necrose foi estabelecida pela área correspondente R2. A porcentagem de células em apoptose foi estabelecida pela área correspondente a M1, obtida dentro do quadrante R1 (células viáveis), pelo controle com PI e sem anexina V (b). (c): células puras com anexinaV e PI (d): células tímicas tratadas com 100nM de dexametasona. (controle positivo de apoptose).

## ANEXO V

## RESUMO E CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSO I

**Nitric Oxide, Cytokines and Inflammation**  
An International Symposium

Rio de Janeiro, Brasil

**Certificate**

This is to certify that *R Roseghini, D Rocha, J Clarencio, I Nascimento, R Schaer, E Velozo, V Vale, R El-Bacha, S Costa, AM Pinheiro, MFD Costa, M Tardy, R Meyer and S Freire* have attended the International Symposium "Nitric Oxide, Cytokines and Inflammation", held in Rio de Janeiro from June 6 to 9, 2004, presenting the poster *Effect of arborinine alkaloid obtained from Brazilian Erthela bahiensis on spleen and thymus cells stimulated in vitro with different mitogens.*

Rio de Janeiro, June 9, 2004

 Renato SB Cordeiro Oswaldo Cruz Foundation Brazil	 John L Wallace University of Calgary Canada	 Louis J Ignaro UCLA USA
		

**Effect of arborinine alkaloid obtained from Brazilian *Erthela bahiensis* on spleen and thymus cells stimulated in vitro with different mitogens**

**R Roseghini<sup>+</sup>, D Rocha, J Clarencio, I Nascimento, R Schaer, E Velozo, V Vale, R El-Bacha, S Costa, AM Pinheiro, MFD Costa, M Tardy, R Meyer, S Freire**



Laboratório de Imunologia, Departamento de Biointeração, PPGIm-ICS-UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon s/n,  
40110-100 Salvador, BA, Brasil

Arborinine is an alkaloid obtained from *Erthela bahiensis*, a plant popularly used as diuretic, antidiabetic, antithermic and expectorant drug. The goal of the present study was to evaluate its effect on in vitro viability and function of immune system cells in murine model. Spleen and thymus cells were cultured with 10nM, 1mM, and 10mM of arborinine in the presence or absence of PWM (5mg/ml), LPS (5 mg/ml) or ConA (10 mg/ml). Cellular proliferation was analyzed by <sup>3</sup>H-thymidin uptake and cellular viability by flow cytometry using Annexin V and propidium iodide. IFN- $\gamma$  and IL-10 were measured by ELISA in the supernatant culture after 48 and 72 h. The results showed a decrease of 23% to 90% on IL-10 levels, after 72 h, in spleen cells cultured with LPS and thymus cells cultured with ConA. IL-10 levels increased (10-64%) with low (10 nM) and decreased (15-77%) with high (1 mM, 10 mM) concentrations of arborinine in both thymus and spleen cells stimulated with PWM. After 48 h, in presence of arborinine, IFN- $\gamma$  levels decreased in all experiments, except for thymus cells stimulated with PWM which showed an increase from 31 to 41%. After 72 h, the decrease is maintained by spleen cells with ConA (13-78%) and PWM (38 a 45%) and by thymus cells with PWM (17- 82%). In spleen cells stimulated with PWM (15-29%) and in thymus cells stimulated with ConA (35%) and PWM (20-45%) lymphoproliferation decreased after 48 h in the presence of the alkaloid. After 72 h, this decrease appears also in spleen cells stimulated with LPS (8-25%). Percentage of apoptosis increased in presence of arborinine after 24 h in spleen cells stimulated with PWM (35%) and in thymus cells stimulated with ConA (39%) and PWM (100%) and decreased in spleen cells stimulated with LPS (18%). After 48 h, the increase of apoptosis persisted only in cells stimulated with PWM (spleen-21%/thymus-12%). There was no variation in arborinine effects in the absence of mitogenic stimulus.

Key words: arborinine – alkaloid – lymphoproliferation

<sup>+</sup>Corresponding author. E-mail: bino7@ig.com.br

**ANEXO VI****RESUMO E CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSO II**

<b>I U I S</b> International Union of Immunological Societies		<b>FOCIS</b> Federation of Clinical Immunology Societies <small>www.focisnet.org</small>
<p>This is to certify that</p>		
<p><i>Renata Roseghini</i></p>		
<p>has attended the 12<sup>th</sup> International Congress of Immunology and 4<sup>th</sup> Annual Conference of the Federation of Clinical Immunology Societies</p>		
<p>held in Montréal, Canada from July 18 – 23, 2004</p>		
		
<hr/> <p>Emil Skamene, Congress President</p>		



# CIM

Clinical and Investigative Medicine  
Médecine clinique et expérimentale

Vol. 27 • No. 4 • August • août • 2004  
www.cma.ca/cim

## T7.166

**Effect of the Flavonoid Rutin Obtained of *Dimorphandra mollis* from Bahia-Brazil on the Viability and Functionality of Murine Immune Cells Stimulated with Different Mitogens.**

Renata Roseghini, Debora S Rocha, Jorge Clarendio, Ivana Nascimento, EudesVELOZO, Robert Schaefer, Vera Vale, Ramon El-Bachá, Silvia Costa, Marcienne Tardy, Roberto Meyer, Maria de Fatima D Costa, Songeli M Freire. Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIm), Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil; Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - Bahia, Fundação Osvaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil; Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil; INSERM - U421, Université de Paris XII (Paris-Val-de-Marne), Creteil, Paris, France.

The effect of rutin, flavonoid obtained from *Dimorphandra mollis*, a native medicinal plant from "cerrado" region in Bahia-Brazil, has been described as anti-oxidative, anti-hemorrhagic and as a blood vessel protector. The present study has examined its effects on the viability and functionality *in vitro* on the immune system cells, using a murine model. Spleen and thymus cells were cultured with 10nM, 1mM and 10mM of rutin in the presence or absence of the mitogens PWM (5mg/ml), LPS (5mg/ml) or ConA (10mg/ml). The cellular proliferation was analyzed by <sup>3</sup>H-thymidin uptake and their viability by flow cytometry using Annexin V and propidium iodide. In the functionality studies, IFN $\gamma$  and IL-10 were measured in the supernatant culture after 48 and 72h by ELISA. The results showed a dose-dependent decrease, after 72h, on IL-10 levels (15% to 60%) in spleen cells when cultured with LPS and on thymus cells stimulated with ConA or PWM. It was observed a non dependent dose decrease on other variables (spleen cells with ConA or PWM). In the presence of rutin, thymus cells stimulated with PWM showed gamma IFN production increasing (42 to 76%) after 48h in contrast of the results of 72h results which showed a decrease (15% to 47%) only when 10 nM of rutin was used. We observed a decrease of lymphoproliferation in the presence of rutin and LPS or PWM on culture of both spleen and thymus cells. When the thymus cells were stimulated with PWM and treated with the rutin, there was an increased rate of apoptosis (about 20%) without change on basal values of necrosis. During the first 24h, thymus cells treated with 10mM of rutin and ConA showed an apoptosis decrease of 17% and a necrose increase of 13% without changes on these parameters after 48h. It was not found any variation in the apoptosis rate of cells treated with rutin and LPS.

## Abstracts

**Tuesday, July 20, 2004**

12<sup>th</sup> International Congress of Immunology  
and 4<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS

July 18–23, 2004 • Montréal, Canada

## ANEXO VII

### QUADRO COMPARATIVO DOS VALORES DAS CÉLULAS NÃO ESTIMULADAS EM RELAÇÃO ÀS CÉLULAS ESTIMULADAS

órgão	TESTE	% de variação de IL-10		% de variação de IFN- $\gamma$		% de variação do índice de estimulação (SI)		% de variação de apoptose		% de variação de necrose	
		48h	72h	48h	72h	48h	72h	24h	48h	24h	48h
Baço	<i>ConA</i>	23	10	3	1	3	2	34	31	43	41
	<i>LPS</i>	19	27	55	36	15	24	40	38	63	60
	<i>PWM</i>	18	14	1	1	4	3	32	27	62	60
Timo	<i>ConA</i>	24	17	1	1	6	1	35	32	44	41
	<i>PWM</i>	38	2	2	1	20	1	37	34	41	40

Dados referentes à porcentagem de variação dos valores de produção de citocinas, índice de estimulação, apoptose e necrose das células não estimuladas (células puras + diluente DMSO) em relação aos valores das células estimuladas (células + DMSO + mitógeno) pelos três diferentes mitógenos em diferentes períodos.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)