

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

LUIS CHRISTIANO RUFINO DA SILVA

**EFEITO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DE *Cocos nucifera* LINN
(PALMAE) SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E SOBRE A
RESPOSTA IMUNOLÓGICA *IN VIVO***

FORTALEZA – CE

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

LUIS CHRISTIANO RUFINO DA SILVA

**EFEITO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DE *Cocos nucifera* LINN
(PALMAE) SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E SOBRE A
RESPOSTA IMUNOLÓGICA *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientadora: Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro.

FORTALEZA-CE

2008

Efeito do extrato acetato de etila de *Cocos nucifera* Linn (Palmae) sobre a resposta inflamatória e sobre a resposta imunológica *in vivo*

Luis Christiano Rufino da Silva

Dissertação aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Profª Drª Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro
Orientadora – UECE

Profª Drª Érika Freitas Mota
Examinadora-UFC

Profª Dr Cláudio Cabral Campello
Examinador-UECE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com todo
meu amor a Deus e aos meus
pais e irmãos

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me proporcionado este momento especial.

Aos meus pais Luis Ferreira da Silva e Julieta Rufino da Silva, por apoio e incentivo incondicional.

Aos meus irmãos Emanuell Rufino da Silva e Samyra Rufino da Silva que os vi nascer.

A minha namorada Adriana Aguiar Ximenes que tanto me apoiou e incentivou dando força positiva nos meus momentos de desabafos.

À Profª Drª Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro, pela sua orientação, ajuda, apoio e paciência comigo em algumas situações. Obrigado pela sua orientação.

À Profª Drª Virgínia Cláudia Carneiro Girão pelo seu apoio e amizade.

À Profª Drª Selene Maia de Moraes pelo seu apoio. Gostaria de agradecer profundamente pelas dúvidas que foram esclarecidas e pelo espaço cedido em seu laboratório.

Ao Prof. Dr Cláudio Cabral Campello pelo seu apoio.

Ao meu amigo José Cláudio Carneiro de Freitas por essa amizade de mais de 10 anos, desde o início da graduação.

Aos meus amigos bolsistas do Laboratório de Imunologia e Bioquímica Animal (LIBA) Michelle Sousa Agostinho, Belarmino Eugênio Lopes Neto, Glauco Jonas Lemos Santos e Jamille Cavalcante Albuquerque que foram essenciais à realização deste trabalho.

Ao PADETEC, por ter permitido utilizar suas instalações.

À EMBRAPA e à Estação de Beneficiamento do coco no Jangurussu.

Às secretárias da Coordenação do PPGCV, Adriana Maria Sales Albuquerque e Ana Cristina Sabóia do Nascimento e ao Frederico Rocha Cavalcanti.

Aos professores do PPGCV, pelos conhecimentos conquistados nesses 24 meses.

A todos os Médicos Veterinários desse país.

SUMÁRIO

Resumo.....	5
Abstract.....	6
Lista de abreviaturas e símbolos.....	7
Lista de tabelas.....	8
1.Introdução.....	10
2.Revisão de Literatura.....	11
2.1 Sistema Imunológico.....	11
2.2 Imunidade Inata e Adaptativa.....	11
2.3 Inflamação.....	16
2.3.1 Modelo de inflamação induzido pelo xileno.....	17
2.4 Plantas com Atividade Antiinflamatória	17
2.5 Imunomodulação.....	19
2.5.1 Modelo de imunização por Hemácias de Carneiro.....	19
2.6 Plantas Medicinais como Imunomoduladores.....	20
2.6.1 <i>Cocos nucifera</i>	23
3 Justificativa.....	24
4 Hipótese Científica.....	25
5 Objetivos.....	25
6 Capítulos.....	26
6.1 Avaliação toxicológica e efeito do extrato acetato de etila da fibra de <i>Cocos nucifera</i> Linn. (Palmae) sobre a resposta inflamatória <i>in vivo</i>	26
6.2 Atividade imunomoduladora do extrato acetato de etila de <i>Cocos nucifera</i> Linn. (Palmae) <i>in vivo</i>	41
7 Conclusões.....	56
8 Perspectivas.....	57
9 Referências.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - percentagem

cm - centímetro

mg/Kg – miligrama por quilo

μL – microlitro

mL – mililitro

ACCV – água da casca do coco verde

APC – célula apresentadora de antígeno

CsA – Ciclosporina A

DTH – resposta de hipersensibilidade tardia

EACN – extrato acetato *Cocos nucifera*

GD – grupo de diferenciação

HC – hemácias de carneiro

IFN γ – interferon gama

IL-1 – interleucina 1

IL-2 – interleucina 2

IL-3 – interleucina 3

IL-4 – interleucina 4

IL-5 – interleucina 5

IL-6 – interleucina 6

IL-7 - interleucina 7

IL-8 – interleucina 8

IL-9 – interleucina 9

IL-10 – interleucina 10

IL-13 – interleucina 13

LPS – lipopolissacarídeo

MHC – complexo de histocompatibilidade principal

NO – óxido nítrico

Tc - linfócito T citotóxico

Th1- linfócito auxiliar 1

Th2 – linfócito auxiliar 2

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

TNF- β – fator de necrose tumoral beta

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Toxicidade aguda dos tratamentos administrados por via oral em camundongos.....	34
Tabela 2: Leucócitos totais e peso relativo dos órgãos de animais tratados com EACN.....	35
Tabela 3: Efeito do pré-tratamento com EACN sobre o edema de orelha induzido por xileno em camundongos.....	36
Tabela 1. Leucócitos totais e peso relativo dos órgãos de animais tratados com EACN.....	48
Tabela 2 Efeito do pré-tratamento com EACN sobre o título de anticorpos específicos induzidos por Hemácias de Carneiro.....	49
Tabela 3 Efeito do pré-tratamento com EACN sobre a resposta imune retardada (DTH) induzida em animais previamente sensibilizados com hemácias de Carneiro.	50

RESUMO

Objetivou-se investigar o efeito do extrato acetato de *Cocos nucifera* (EACN) sobre parâmetros fisiológicos, sobre a inflamação tópica e sobre a resposta imune *in vivo*. EACN, obtido da água da fibra da casca do coco verde, apresentou taninos condensados, flavononas, flavonóis, flavononóis, xantonas e esteróides. EACN foi administrado aos camundongos Swiss, por via oral, em dose única diária de 0,2 mL nas concentrações de 10, 30, 100 e 250 mg Kg⁻¹ por cinco dias consecutivos para avaliação toxicológica e inflamação tópica. No teste de toxicidade foram observados os parâmetros clínicos, hematológicos e avaliação macroscópica do peso relativo dos órgãos. O efeito do EACN sobre a inflamação tópica foi avaliado utilizando-se grupos testes com as diferentes concentrações e grupos controles positivos, NaCl 0,9% ou veículo ou Dexametasona (6 mg Kg⁻¹). Todos os animais receberam xileno nas partes interna e externa da orelha direita duas horas após o último tratamento, exceto o grupo controle negativo. Cinquenta minutos após aplicação do xileno, os animais foram sacrificados e uma porção de cada orelha foi retirada e pesada. Considerou-se a diferença de peso entre as orelhas como o efeito induzido pelos tratamentos. Para avaliação da resposta imune, os camundongos receberam hemácias de carneiro (HC) seguidos dos tratamentos que foram administrados por via oral em dose única diária de 0,2 mL de EACN 10 e 100 mg Kg⁻¹, NaCl 0,9% ou veículo ou Levamisol (10 mg Kg⁻¹) por 14 dias consecutivos ou dose única de Ciclosporina (5 mg Kg⁻¹). Foram avaliados os títulos de anticorpos por hemaglutinação e a resposta imune celular através da reação de hipersensibilidade tardia (DTH). EACN não provocou sintomas tóxicos, nem alterou os parâmetros hematológicos e o peso relativo dos órgãos. EACN não provocou inibição do edema induzido por xileno, mas na dose de 250 mg Kg⁻¹ apresentou efeito pró-inflamatório (P<0,05). EACN inibiu a produção de anticorpos primários e secundários e não alterou a DTH (P<0,05). EACN não é tóxico, não apresentou atividade antiinflamatória tópica, não alterou o peso relativo dos órgãos e inibiu a produção de anticorpos. Conclui-se que EACN apresentou efeito imunomodulador sobre a resposta imune adquirida.

Palavras-chave: *Cocos nucifera*, inflamação, resposta imune, imunomodulação

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the effect of ethyl acetate extract of *Cocos nucifera* (EACN) through physiological parameters, topical inflammation induced by xylen and immune response *in vivo*. EACN was obtained from fiber coconut water and the phytochemical test indicated the presence of condensed tannins, flavonoids, flavonols, flavonones, xanthones and steroids. EACN was administered to the Swiss mice orally in single dose, 0.2 mL, of 10, 30, 100 e 250 mg Kg⁻¹ for five consecutive days to the toxicity protocols and topic inflammation. On toxicity experiments, it was observed the clinical and hematological parameters and macroscopic evaluation of the organs. The effect of EACN on topic inflammation was done in tests groups with different concentrations of EACN and positive control groups which received NaCl 0.9% or DMSO 5% or Dexamethasone (6 mg Kg⁻¹, reference drug). All the animals received the flogistic agent (25 µL) in inner and outer parts of the ears two hours after the last treatment, except the negative control group. After 50 minutes from the xylen application, the animals were sacrificed, and a portion of each ear was took out and weighted. The difference between the weights of ears represents the effect induced by the treatments. To the protocols of immune response, mice were immunized with sheep red blood cells (SRBC) by followed treatments that were administered orally in single dose, 0.2 mL of EACN 10 and 100 mg Kg⁻¹, NaCl 0.9%, vehicle, Levamisole (10 mg Kg⁻¹) for 14 consecutives days or single dose of Ciclosporin (5 mg Kg⁻¹). Antibodies titres were evaluated by hemmaglutination while cell immune response through delayed hipersensibility (DTH). EACN did not cause toxic effects, nor change hematological parameters neither organs relative weight. EACN did not cause inhibition of oedema induced by xylen, but in 250 mg Kg⁻¹ presented pro-inflammatory effect (P<0.05). EACN inhibited primary and secondary antibodies production and did not inhibit DTH (P<0.05). EACN does not cause toxicity, nor anti-inflammatory activity neither altered relative weight of organs and it inhibited antibodies titres. In conclusion, EACN presented immunomodulatory effect on acquired immune response.

Keywords: *Cocos nucifera*, inflammation, immune response, immunomodulation

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é antigo na civilização humana e, por um longo tempo, minerais, plantas e produtos de origem animal foram utilizados como o principal meio de ação de drogas. A fitoterapia, ou tratamento pelas plantas, era conhecido e praticado pelas civilizações egípcias e gregas, ainda sendo bastante utilizado principalmente no oriente na qual se observa que inúmeras doenças são eliminadas por uso de plantas medicinais, sendo bastante comum em países como China, Paquistão e Tailândia (HERBARIUM, 2002).

No Brasil, a utilização das plantas como tratamento medicinal remonta desde o período indígena, aliando-se ao fato do país ter uma flora extraordinária nas quais diversos princípios são descobertos por pesquisadores, através da exploração tecnológica e econômica com o objetivo de prevenção, tratamento e cura de doenças nos animais e homem (SIMÕES *et al.*, 1998).

Os efeitos biológicos das plantas medicinais têm sido validados por pesquisas demonstrando os efeitos antibacteriano, antimicrobiano, anti-helmíntico, anti-séptico, antiinflamatório e imunomodulador de plantas medicinais. Devido ao alto custo de medicamentos industrializados, surge a necessidade de mais pesquisas nessa área com intuito de desenvolver fitoterápicos seguros, eficazes, de baixo custo e reduzido efeito colateral (BERG, 1993).

No Nordeste brasileiro, existe uma grande diversidade de plantas medicinais, no entanto, parte destas permanece desconhecida, tanto do ponto de vista químico quanto do imunofarmacológico (ESQUENAZI, 2002).

Cocos nucifera é abundante no Nordeste brasileiro e tem ampla utilização biológica, econômica e industrial. A sua utilização deixa um resíduo que vem sendo objeto de estudo por diversos pesquisadores. Dentre estas pesquisas destaca-se o trabalho de Mendonça-Filho *et al.* (2004) que demonstrou um efeito estimulador do extrato acetato de etila em macrófagos infectados por *Leishmania*. Viu-se então, a necessidade de avaliar seu potencial antiinflamatório e imunomodulador em modelos experimentais *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema Imunológico

O sistema imunológico é o sistema de defesa do organismo contra diferentes agentes agressores. O sistema imune compreende órgãos e células especializadas na resposta imune. Compreende o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo. O sistema imune inato é constituído pelas barreiras físicas, mecânicas, bioquímicas, pelo sistema fagocítico, células citotóxicas naturais, sistema complemento e citocinas. O sistema imune adaptativo é composto de órgãos e células linfóides. Os órgãos linfóides primários produzem, amadurecem e diferenciam os linfócitos em T e B que adquirem competência através de seus receptores específicos, TCR (receptor da célula T) e BCR (receptor da célula B), respectivamente. Os linfócitos T são diferenciados em T auxiliares e T citotóxicos. Os LT auxiliares (LTh) são diferenciados em Th0, Th1, Th2, Treg, Th17 e Th23, os quais estão associados a diferentes padrões de citocinas. De um modo geral, os LT e LB ao serem estimulados por antígenos específicos sofrem expansão clonal e diferenciam-se em linfócitos efetores e de memória. Os órgãos linfóides secundários armazenam os linfócitos provenientes dos órgãos linfóides primários e funcionam como locais da resposta imunológica. Vale salientar a participação de um pool de células circulantes que recirculam para órgãos e tecidos. (ROITT, 1999; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2008). Portanto, o sistema imune funciona como uma rede orquestrada por células, mediadores e receptores que funcionam para manutenção da homeostase interagindo através de mecanismos que regulam o processo saúde e doença

2.2 Imunidade Inata e Adaptativa

Imunidade é a capacidade do organismo de reconhecer substâncias, considerá-las estranhas e promover uma resposta a fim de eliminá-las através de etapas que inclui o reconhecimento, metabolização, neutralização e eliminação das substâncias consideradas estranhas ao organismo (TIZARD, 2006).

O sistema imune de um indivíduo saudável é capaz de responder a invasores através de muitos mecanismos que compreendem as imunidades inatas e adquiridas (DUTTA, 2002).

A imunidade inata caracteriza-se pelas barreiras físicas, células fagocitárias, células exterminadoras naturais, mediadores inflamatórios, complemento e citocinas (ROITT, 1999; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2008).

As células do sistema imune inato realizam quimiotaxia, fagocitose e síntese de

citocinas, além de desempenhar um papel crucial na iniciação e posterior direcionamento das respostas imunes adquiridas, as quais representam um mecanismo de defesa mais especializado que foi desenvolvido nos animais superiores durante a evolução (DELVES & ROITT, 2000).

O sistema complemento é um conjunto de proteínas plasmáticas que fazem parte da resposta imune, tendo como resultado final a formação de fatores quimiotáticos, anafilatoxinas, opsonização e lise de células ou de microrganismos. As vias de ativação do sistema complemento é a clássica, via alternativa e via das lectinas, tendo como resultado final a lise (ROITT, 1999; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2008).

A imunidade adquirida ou específica promove uma resposta que vai se desenvolvendo com o tempo e idade do indivíduo, variando quanto à qualidade e intensidade da exposição a substâncias estranhas. Possui como características ser de memória imunológica, específica e heterogênea. A imunidade específica caracteriza-se pela presença de anticorpos específicos, linfócitos ativados e de memória e de citocinas derivadas de sua ativação, estabelecendo-se um processo de regulação para a manutenção da homeostase. (ROITT, 1999; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2008).

A resposta imunológica é um processo de acomodação variável, que leva os animais a produzirem anticorpos e células reativas, em resposta a uma grande variedade de moléculas e de macromoléculas orgânicas. Constitui o principal meio de defesa do organismo, não somente contra agentes infecciosos, como também contra outros agentes e mesmo constituintes do próprio organismo nos processos de auto-imunidade (PARKIN & COHEN, 2001).

Na ativação de uma resposta imune, é importante a interação de diferentes populações de linfócitos e outros tipos de células. Algumas vezes, é necessário mais do que a presença do antígeno para deflagrar a resposta, sendo o segundo sinal recebido pelas células uma peça principal (GRAKOU, 1999). Este sinal envolve a interação de moléculas co-estimulatórias, moléculas de adesão e citocinas.

Os linfócitos T e B são as principais células do sistema imune adquirido e apresenta memória imunológica, que permite o reconhecimento de um estímulo antigênico caso ele entre novamente em contato com o organismo, evitando assim o restabelecimento da doença e resultando na imunidade contra a reinfecção ao mesmo agente infectante (DEFRANCO & WEISS, 1998; DUTTON *et al.*, 1998).

As respostas imunes adquiridas dos linfócitos T e B antígenos-específicos, são denominadas, respectivamente de imunidade celular e humoral. A imunidade celular defende

o organismo contra os microorganismos intracelulares e a imunidade humoral atua sobre os microorganismos extracelulares e suas toxinas (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002).

O mecanismo de reconhecimento e ativação da resposta imune específica tem início quando os antígenos são captados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) (BANCHEREAU *et al.*, 2000). Os principais tipos de APCs são os monócitos sangüíneos, os linfócitos B, os macrófagos, as células dendríticas foliculares. As APCs circulam pelo corpo ingerindo e digerindo os patógenos encontrados, fragmentando-os em peptídeos antigênicos. Partes destes peptídeos se ligam a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e são apresentados na superfície celular sob a forma de um complexo MHC/peptídeo (ZINKERNAGEL & DOHERTY, 1997).

As moléculas coestimulatórias que interagem durante a apresentação do antígeno fornecem um segundo sinal para a ativação dos linfócitos T (MURTAUGH & FOSS, 2002). Sem este segundo sinal não há uma resposta adequada e as células T tornam-se inativas, produzindo um estado de tolerância imunológica específica, conhecido por anergia clonal (KAMRADT & MITCHISON, 2001). O CD28 é provavelmente o co-estimulador mais importante das moléculas B7.1 e B7.2 encontradas nas APCs. A estimulação da CD28 prolonga e aumenta a produção de IL-2, que é responsável pela indução e proliferação dos linfócitos T (COYLE & GUTIERREZ-RAMOS, 2001).

As citocinas envolvidas no processo de apresentação do antígeno incluem a IL-1 e a IL-6, as quais são produzidas pelas APCs e agem induzindo a expressão de receptores para o fator de crescimento de células T ou IL-2. A IL-12 atua favorecendo a produção de INF- γ e induzindo o desenvolvimento de células T virgens em células T auxiliares (OPPENHEIM & FELDMAN, 2000).

A resposta imune humoral mediada por anticorpos é resultado de uma série de interações celulares que ocorrem em uma seqüência ordenada (HARLOW & LANE, 1988); onde inicialmente as células T são ativadas quando os antígenos são apresentados pelas APCs, em seguida as células B interagem com as células T auxiliares antígeno-específicas e só então, os linfócitos B ativados proliferam e se diferenciam em plasmócitos e células B de memória (MCHEYZER-WILLIAMS & MCHEYZER-WILLIAMS, 2005). Dentre as principais moléculas presentes, respectivamente, nas células T e B que interagem entre si, destaca-se a interação (CD40-CD40L), pois é considerada como a mais importante para ativação das células B (FOY *et al.*, 1996).

O receptor de antígeno das células B é formado por glicoproteínas transmembranares Ig- α e Ig- β juntamente com a imunoglobulina de membrana, onde se liga o

antígeno. Com exceção dos antígenos T - independentes, o contato com o antígeno é insuficiente para ativar as células B, sendo necessário auxílio das células T para produzir resposta. As células B são eficientes na captação de antígeno através do seu receptor pelo mecanismo da endocitose, e isso se deve ao fato de que a imunoglobulina atua como receptor de alta afinidade (SRIVASTAVA, 2002). No entanto, estas células são ineficazes na captação de antígenos por fagocitose ou pinocitose (BANCHEREAU *et al.*, 2000). Após a captação, o antígeno é processado e combina-se com moléculas recém sintetizadas de MHC II (PINET *et al.*, 1995).

A resposta por anticorpos pode ser induzida por dois tipos de antígenos. A maioria dos antígenos protéicos requer o auxílio das células T antígeno-específicas para produzir uma resposta humoral (antígenos T-dependentes). Porém alguns antígenos não necessitam da presença de células T auxiliares, sendo denominados T-independentes. Estes antígenos se classificam em subtipo 1 e subtipo 2. No subtipo 1, os antígenos T-independentes em altas concentrações, induzem ativação de muitas células B, tanto específicas quanto inespecíficas por isso denominados ativadores de células B policlonais. Também estimulam fortemente macrófagos a produzirem IL-1 e TNF- α . Um exemplo típico de antígeno T-independente subtipo 1 é o lipopolissacarídeo (LPS). Já no subtipo 2, os antígenos não possuem propriedades de ativadores de células B policlonais, nem ativam macrófagos (JANEWAY *et al.*, 2002).

Os antígenos T-independentes se caracterizam por constituírem grandes moléculas poliméricas, altamente resistentes à degradação, sendo a maioria de origem bacteriana, que provocam geralmente resposta mais fracas que os antígenos T - dependentes. Estes antígenos geram, principalmente, resposta IgM, no entanto não induzem a diferenciação de células B de memória (JANEWAY *et al.*, 2002).

São necessários dois sinais para ativar um antígeno T-dependente; primeiramente a interação do antígeno com os receptores imunoglobulina de superfície nas células B e em seguida, os sinais estimulatórios provenientes das células T auxiliares que respondem ao antígeno processado e ligado ao MHC II (PARKER , 1993).

As citocinas liberadas pelas células T são importantes na ativação das células B; a IL-2 induz a maturação de linfócitos B. Já TNF α e TNF β , são importantes para o crescimento das células B (OPPENHEIM & FELDMAN, 2000; MURTAUGH & FOSS, 2002).

Na resposta imune celular, os principais componentes compreendem os mecanismos especializados que envolvem a citotoxicidade mediada por linfócitos T e a ativação de macrófagos pelas células T efectoras (JANEWAY *et al.*, 2002).

Os linfócitos T apenas reconhecem o antígeno na forma de fragmentos peptídicos ligados a moléculas da classe I ou II do MHC próprio, através do TCR (receptor de células T). O TCR dá especificidade ao linfócito, sendo formado por duas cadeias glicopolipeptídicas contendo uma parte constante e outra variável, na qual ocorre a maior recombinação de peptídeos, dando a hipervariabilidade do linfócito. Os co-receptores CD4 e CD8 ligam-se, respectivamente, ao MHC II e MHC I. Os antígenos de histocompatibilidade MHC classe I são expressos em quase todas as células nucleadas do organismo e são responsáveis pela transdução de sinais para ativação das células T CD8⁺ citotóxicas (EFFROS *et al.*, 2003). Já os antígenos de histocompatibilidade MHC classe II são expressos pelas células imunocompetentes, incluindo macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e são responsáveis pela ativação das células T CD4⁺ (VILLADANGOS, 2001).

A identificação de subpopulações distintas de linfócitos T auxiliares (LTH CD4⁺) em camundongos, de acordo com as citocinas secretadas, denominadas Th 1 e Th2 (MOSMANN *et al.*, 1986), facilitou a compreensão da diversidade funcional destas células no sistema imune.

Deste modo, citocinas de Th1, IL-2, TNF- β , IFN- γ , estão principalmente envolvidas na resposta inflamatória mediada por macrófagos e dirigida a patógenos intracelulares. As células Th2 produzindo IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 auxiliam na produção de anticorpos por células B e participam da maturação e ativação de mastócitos e eosinófilos (MOSMANN & COFFMAN, 1989; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2008).

Os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos podem ser ativados diretamente pelas células APCs, quando estas expressam sinais estimulatórios. No entanto, na maioria das vezes, eles precisam de cooperação das células CD4⁺ Th1 para serem ativados. Uma vez ativados os linfócitos T citotóxicos (Tc) interagem com as células-alvo e liberam o conteúdo de seus grânulos. Os grânulos dos linfócitos Tc possuem perforina e granzimas (TILNEY *et al.*, 1996). As moléculas de perforina formam poros na membrana plasmática da célula-alvo, porém estes não são suficientes para destruir as células. Através dos poros, as granzimas entram na célula-alvo e deflagram o mecanismo de apoptose (FROELICH *et al.*, 1998). Outra forma pela qual o LT CD8 extermina outra célula é através da glicoproteína *fas* através do seu ligante *fasL* presente na célula alvo (EFFROS *et al.*, 2003).

As respostas imunes adquiridas declinam à medida que o antígeno vai sendo eliminado cessando os estímulos que são necessários para a sobrevivência dos linfócitos. Grande parte desse declínio é devida à morte apoptótica dos linfócitos ativados (LENARDO

et al., 1999) que ficam privados dos sinais para a sobrevivência. Esse processo mantém a homeostase do sistema imune, fazendo-o retornar ao seu estado de repouso basal (MURTAUGH & FOSS, 2002).

2.3 Inflamação

Inflamação é um processo que envolve uma série de eventos que podem ser nomeados por numerosos estímulos, tais como, agentes infecciosos, isquemia, interações antígeno-anticorpo e injúrias químicas, térmicas e mecânicas. A resposta inflamatória ocorre em três fases distintas, mediada por diferentes mecanismos: um agudo caracterizado por uma vasodilatação local e aumentada permeabilidade capilar, uma fase sub-aguda caracterizada por infiltração de leucócitos e células fagocíticas e uma fase proliferativa crônica, na qual ocorre degeneração do tecido e fibrose (ROTELLI *et al.*, 2003).

Dentre as moléculas vasoativas produzidas durante o processo inflamatório, podemos citar, segundo Abbas, Lichtman e Pober (2008) : Histamina com origem principal nos mastócitos, basófilos e plaquetas e com função de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e dor; Serotonina, originária de plaquetas, mastócitos e basófilos com aumento da permeabilidade vascular; Cininas originária dos cininogênios plasmáticos e tecidos com função de provocar vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e dor. Dos mediadores icosanóides destacam-se as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos B₄, C₄, D₄ e E₄, todos originários do metabolismo do Ácido araquidônico, com as prostaglandinas desempenhando a função de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, os tromboxanos com aumento da agregação plaquetária, o leucotrieno B₄ com função de quimiotaxia neutrofílica e aumento da permeabilidade vascular, e os leucotrienos C₄, D₄ e E₄ responsáveis pela contração da musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular.

O fator ativador plaquetário é originário de células fagocíticas e células endoteliais com função de secreção plaquetária, secreção neutrofílica e aumento da permeabilidade vascular

Os produtos de desdobramento do fibrinogênio são originários do coágulo sanguíneo com a função de contração da musculatura lisa, quimiotaxia neutrofílica e permeabilidade vascular aumentada.

Os mediadores C3a e C5a, originários do complemento sérico, possuem a função de degranulação mastocítica, contração da musculatura lisa e quimiotaxia neutrofílica (C5a).

A resposta inflamatória, dependendo do agente, pode ser desencadeada por diferentes mecanismos, tais como a reação anafilática envolvendo dextran e o processo de inflamação neurogênica envolvendo o xileno quando aplicado topicamente, sendo que esta

inflamação tem mecanismos celulares envolvidos na regulação de liberação de substâncias pró-inflamatórias originárias de neurônios sensoriais (RICHARDSON & VASKO, 2002).

2.3.1 Modelo de inflamação induzido pelo xileno

O mecanismo bioquímico da inflamação neurogênica provocado pelo xileno desencadeia mecanismos celulares envolvidos na regulação da liberação de substâncias pró-inflamatórias originárias de neurônios sensoriais. Esta inflamação é iniciada pela ação de mediadores, tais como acetilcolina, bradicinina, prostaglandinas, capsaicina etc, provocando liberação direta dos neuropeptídeos, pela excitação dos neurônios, com ativação dos seus receptores, incluindo o VR1, B2 e PARs; promovido, respectivamente, por influxo de cálcio, ativação da proteína quinase C ou desinibição do fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) (RICHARDSON & VASKO, 2002).

2.4 Plantas com atividade Anti-inflamatória

Diferentes estudos realizados com plantas medicinais detectaram potencial anti-inflamatório. Entre seus constituintes com essa propriedade foram encontrados, através de análise fitoquímica, fenóis totais, flavonóides, ligninas, esteróides, taninos, triterpenos, xantonas e saponinas, cujas plantas estão exemplificados a seguir.

O extrato hidroalcoólico das folhas de *Garcinia gardneriana* apresentou efeito anti-inflamatório na redução do edema de pata induzido por carragenina, em modelo de inflamação aguda, devido a presença de biflavonóides isolados das folhas, além de esteróides e triterpenos (CASTARDO *et al.*, 2008).

O extrato metanólico das folhas de *Mallotus peltatus*, nas frações A e B, nas doses de 50 ml/Kg via oral, reduziu significativamente o edema de pata induzido por dextran em ratos, em modelo de inflamação sub-aguda, com percentual de inibição de 60%, semelhante à inibição provocada pela indometacina. O estudo fitoquímico do extrato revelou a presença de constituintes tais como, flavonas, taninos, triterpenos e saponinas (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2002).

O extrato etanólico da casca de *Syzygium cumini* apresentou atividade anti-inflamatória em modelo de inflamação crônica induzido por peletes de algodão, implantados subcutâneo nos flancos de ratos. O estudo fitoquímico revelou a presença de taninos,

responsável pelo potencial anti-inflamatório (MURUGANANDAN *et al.*, 2001).

Kaileh *et al.* (2007), estudando diversas plantas indígenas palestinas, revelou que o extrato metanólico das folhas de *Salvia fruticosa*, *Alcea setosa* e sementes de *Coriandrum sativum* apresentou efeito anti-inflamatório em modelo de inflamação pulmonar e intestinal, confirmando a presença de constituintes fitoquímicos, como taninos, flavonas e saponinas.

O extrato metanólico da erva perenial *Pogonatherum crinitum* apresentou atividade anti-inflamatória, com a inibição da produção de NO pelas células RAW 264-7 estimuladas com LPS. Estudos fitoquímicos revelaram a presença de flavonóides que provocaram inibição da atividade da iNOS, pela supressão da expressão de mRNA (WANG *et al.*, 2008).

A raiz de *Panax ginseng* possui como constituinte o ginsenosídeo que apresenta atividade anti-inflamatória e anti-oxidativa, por inibir a interação entre a COX-2 e iNOS, bem como a superprodução de peroxinitrito, em modelo de lesão endotelial induzida com L-metionina (LI *et al.*, 2008).

O extrato metanólico de frutos da *Forsythia koreana* possui como constituintes a filigenina e o pinosinol que apresentou atividade anti-inflamatória *in vivo* e *in vitro* por inibir o edema de pata induzido por carragenina e a produção de NO e de PGE2 em células RAW 264-7 tratadas com LPS, respectivamente. Filigenina inibe a COX-2; e, conseqüentemente, a síntese de prostanóides, além de inibir a produção da iNOS, via inibição do fator nuclear *κ*B. Estudos fitoquímicos revelaram a presença de ligninas, flavonóides, glicosídeos caffeoyl e terpenos (LIM *et al.*, 2008).

O extrato acetato de etila originário de *Garcinia hanburyi* mostrou ter atividade anti-inflamatória, em camundongos usados como modelo experimental, por inibir o edema de orelha induzido por fenilpropionato de etila. O estudo fitoquímico do extrato revelou a presença de 11 novos compostos de xantonas (PANTHONG *et al.*, 2007).

O extrato aquoso da casca do caule de *Tabebuia avellanedae* mostrou ter efeito anti-inflamatório na inibição do edema de orelha induzido por ácido aracdônico, um ativador da COX-2, além de suprimir a produção de PGE2 e de NO, em macrófagos ativados por LPS. O estudo fitoquímico do extrato revelou a presença de antraquinonas, naftoquinonas, flavonóides e cumarins (BYEON *et al.*, 2008).

O extrato etanólico de Shuang-Qing-Cao *B*-Ciclo dextrin (SQC-*B*-CD) inibiu a inflamação aguda pulmonar induzida por LPS em camundongos, por inibir o extravasamento de polimorfonucleares, inibir a expressão de RNA-m na formação da iNOS, com o decréscimo de NO. O estudo fitoquímico revelou a presença de flavonóides, triterpenóides e

saponinas (FENG *et al.*, 2008).

A fração butanólica de frutos de *Phellinus linteus* apresentou atividade anti-inflamatória por inibição de proteínas da família MAPKS, com a diminuição da produção de NO, PGE2, iNOS e COX-2 por macrófagos ativados por LPS (KIM *et al.*, 2007).

O extrato etanólico das folhas de *Rhododendron ponticum* inibiu o edema de pata induzido por carragenina em camundongos, bem como o edema de orelha induzido por TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato). O estudo fitoquímico do extrato revelou a presença de compostos como quercitrin, isoquercitrin, hiperosídeos e 6-C-glicosilnaringenina (ERDEMOGLU *et al.*, 2008).

O extrato metanólico da casca do caule de *Allanblackia monticola* e suas frações apresentaram atividade anti-inflamatória inibindo o edema de pata induzido por carragenina, histamina, ácido araquidônico e por dextran em ratos. O estudo fitoquímico do extrato identificou a presença de xantonas, triterpenos e biflavonóides (NGUEMFO *et al.*, 2007).

2.5 Imunomodulação

Imunomodulação é um procedimento que interfere nas funções do organismo, alterando o sistema imune que pode ser estimulado ou suprimido. No primeiro caso, a imunoestimulação resulta no aumento das respostas imunes, implicando na estimulação do sistema imune inato, composto por granulócitos, macrófagos, complemento, células NK, mediadores e citocinas; e do sistema imune adquirido, composto por linfócitos T e B ativados e de memória, imunoglobulinas, citocinas, além dos órgãos linfóides primários e secundários. Imunossupressão do organismo implica na redução das respostas imunes, na redução da resistência orgânica contra infecções, estresse e fatores ambientais ou por quimioterápicos, além de compostos utilizados no controle das doenças auto-imunes (MAKARE *et al.*, 2001).

Imunoestimulação e imunossupressão fazem parte de um equilíbrio homeostático do sistema imune que regula a condição do organismo frente às condições de perigo que ele se encontra, ao entrar em contato com um agente estranho (MAKARE *et al.*, 2001).

2.5.1 Modelo de imunização por Hemácias de Carneiro

As hemácias de Carneiro são antígenos potentes, pois estimulam tanto a resposta mediada por Linfócitos T quanto por Linfócitos B através da cooperação entre T e B. De acordo com Benacerraf (1978), o aumento da resposta de anticorpos induzido por hemácias de carneiro em camundongos, indica o aumento da ação de macrófagos e de linfócitos B, no

processo de síntese de anticorpos.

A Reação de Hipersensibilidade Retardada é caracterizada por um aumento de células inflamatórias não específicas, na qual o macrófago é o principal participante. Desenvolve-se uma reação do tipo IV, quando o antígeno ativa linfócitos T sensibilizados. Essas células geralmente são uma subpopulação de Linfócitos T auxiliar, Th1, podendo as células T citotóxicas estarem envolvidas. A ativação das células T resulta na secreção de várias citocinas, incluindo a IL-2, interferon- γ , fator da inibição da migração de macrófagos e fator de necrose tumoral- β (ASKENASE & VAN LOVEREN, 1983).

2.6 Plantas medicinais como imunomoduladores

Uma variedade de substâncias, como polissacarídeos, lectinas, peptídeos, saponinas, óleos e outras, oriundas de plantas medicinais são capazes de modular o sistema imune e são citadas a seguir.

Um polissacarídeo isolado do mesocarpo de frutas de *Orbignya phalerata* elevou a atividade de células fagocíticas *in vivo* apresentando atividade imunomoduladora (SILVA & PARENTE, 2001).

O tratamento crônico com dose reduzida oriunda do polissacarídeo de *Ganoderma lucidum* resultou numa acelerada cobertura da imunossupressão em camundongos tratados com ciclofosfamida sem evidentes efeitos colaterais (ZHU *et al.*, 2007).

O extrato rico em polifenóis originário da fibra da casca de *Cocus nucifera* Linn apresentou atividade leishmanicida em macrófagos infectados, constituindo-se como uma nova droga alternativa, pela ação imunoestimulante do extrato, com ação comparável ao INF- γ , com seu poder de indução da síntese de NO em macrófagos de camundongos (MENDONÇA-FILHO *et al.*, 2004).

O extrato etanólico de *Desmodium gangeticum* e suas frações derivadas (hexânica, butanólica e aquosa) apresentaram potencial imunomodulatório em modelo de infecção experimental com *Leishmania donovani* em hamsters, inibindo a multiplicação do parasita, por conter compostos fenólicos contendo grupos hidroxilas na sua estrutura, na qual afeta o sistema enzimático e de transferência de elétrons resultando em propriedades imuno moduladoras e atividade fagocítica (SINGH *et al.*, 2005).

O extrato alcoólico de *Mangifera indica*, contém como constituinte ativo o mangiferin, possuindo propriedades imunoestimulantes por aumentar a produção de anticorpos humorais e aumentar a resposta imune celular (DTH) em camundongos, pela ativação das células T e B (MAKARE *et al.*, 2001).

O extrato etanólico de *Houttuynia cordata* através de Th2 induziu a imunossupressão da produção de suas citocinas (IL-4 e IL-5), bem como inibiu a migração induzida pelo quimiocina regulatória da ativação do timo (TARC), constituindo-se um efetivo imunossupressor (LEE *et al.*, 2008). Polissacarídeos têm sido relatados como excêntricos imunomoduladores, estimulando a resposta imune. Polissacarídeos extraídos de *Codonopsis pilosula* e *Poria cocos*, tem potencializam os mecanismos de defesa, através da ativação do sistema imune (LIN *et al.*, 2006).

Em estudos experimentais com leucócitos humanos, o extrato aquoso das folhas de *Achirocline satureoide*, rico em quercetina, induziu a proliferação e produção de INF-gama e de IL-4 em humanos que receberam a infusão do extrato, constituindo-se um potente imunoestimulante (COSENTINO *et al.*, 2008).

O extrato etanólico de *Panax notoginseng* diminuiu a produção de TNF- α e de IL-6 em células DC2.4 estimuladas por LPS, atuando como imunoestimulante pela ativação de receptores Toll (TLR) (Rhule *et al.*, 2008).

O extrato etanólico de *Artemisia vestita* apresentou excelente atividade imunossupressora, inibindo a ação do cloro pícrico em reação de hipersensibilidade do tipo retardada em camundongos. Os compostos isolados do extrato apresentaram 9 tipos de flavonas, destacando-se entre os maiores componentes, cirsilineol, 6-metoxitricin e apigenin (YIN *et al.*, 2008).

O monômero caffeoil glicosídeo, isolado das raízes de *Picrorhiza scrophulariiflora*, tem efeito potencial imunomodulatório, regulando a expressão das citocinas relacionadas a Th1 e Th2 na regulação do sistema imune (ZENG *et al.*, 2008).

O óleo da casca de *Cedrus deodora* atuou sobre os neutrófilos, reduzindo sua atividade fagocítica, inibindo a liberação de várias enzimas lisossomais e mediadores envolvidos na inflamação (SHINDE *et al.*, 1999).

As frações do extrato metanólico das raízes de *Bergenia stracheyi*, bergenin e norbergenin, apresentaram efeito imunomodulatório em modelo de artrite induzida por adjuvante, com redução do edema de pata, pelo potencial das citocinas Th1/Th2, que estão fortemente relacionadas a uma atividade anti-artrítica (NAZIR *et al.*, 2007).

O extrato aquoso de Gingyo-san teve efeito protetor e imunomodulatório em camundongos, num modelo de inflamação pulmonar aguda induzido por LPS, via intra-traqueal, por atenuar a expressão de TNF α , IL-1 β , IL-6, KC, MCP-1, iNOS e ativação do fator nuclear no tecido pulmonar (YEH *et al.*, 2007).

A *Calendula officinalis*, possui em sua composição uma fração lipofílica, os

triterpenóides, responsáveis pela ação antiinflamatória, além de carotenóides, flavonóides, carboidratos, ácidos graxos e polissacarídeos, que lhe conferem também ação imunoestimulante (AKIHISA *et al.*, 1996).

O extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus*, usado popularmente no tratamento de doenças reumáticas, apresentou efeito imunossupressor na produção de anticorpos na dose de 0,5 mg/Kg e na redução do edema da DTH, nas doses de 0,5 e 5 mg/Kg, induzido por hemácias de carneiro. O efeito imunossupressor do extrato *in vivo* propõe uma ação sobre as células T e/ou B, agindo sobre esta direta ou indiretamente. O balanço padrão de citocinas Th1/Th2 parece não explicar o efeito inibitório do extrato *in vivo* (PINTO *et al.*, 2007). O estudo fitoquímico do extrato revelou a presença de polifenóis e alcalóides que segundo Johnson *et al.* (2003) algumas plantas apresentam efeito imunossupressor com esses constituintes.

O extrato aquoso de *Clausena excavata* apresentou efeito imunoestimulante para resposta imune humoral com um aumento na produção de linfócitos B e da resposta de macrófagos, indicativo da síntese de anticorpos. DTH, induzida por hemácias de carneiro, sofreu redução significativa do edema comparando-se à ação da Indometacina. O estudo fitoquímico revelou a presença de alcalóides carbazoles e cumarins (MANOSROI *et al.*, 2005).

O extrato aquoso de *Tridax procumbens* tem efeito imunoestimulante por aumentar a resposta imune humoral e a resposta imune celular, induzida por hemácias de carneiro. O estudo fitoquímico revelou a presença de triterpenóides e sesquiterpenos que são responsáveis pela formação de complexos imunoestimulantes (TIWARI *et al.*, 2004).

O extrato metanólico da raiz *Curculigo orchioides* teve efeito imunoestimulante, com aumento da resposta imune humoral e celular induzidos por hemácias de carneiro, em camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida. O estudo fitoquímico do extrato relevou a presença de alcalóides, fenóis, taninos, saponinas e esteróides (BAFNA & MISHRA, 2006).

A fração acetato de etila do extrato *Tetrastigma hemsleyanum* apresentou efeito imunoestimulante sobre a resposta imune humoral e celular, esta induzida por SRBC. O teste fitoquímico revelou a presença de flavanóides kaempferol, quercetina e *b*-sitosterol que são responsáveis pelas propriedades imunoestimulantes, anti-inflamatórias, anti-virais, anti-tumorais, fagocíticas com aumento da ação de macrófagos (XU *et al.*, 2008).

A suspensão aquosa da raiz de *Withania somnifera* foi investigada em procedimentos experimentais *in vitro* e *in vivo*, apresentando efeito anti-inflamatório por

inibir a atividade do complemento, impedindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios. O efeito imunossupressor foi considerado por impedir a proliferação de linfócitos T, a resposta imune humoral e a resposta imune celular induzida por hemácias de carneiro (RASOOL & VARALAKSHMI, 2006).

A fração metanólica bioativa de *Sphaeranthus indicus* produziu um aumento da resposta imune humoral e da resposta de hipersensibilidade retardada (DTH), evidenciando-se no aumento da produção de anticorpos e do edema de pata, induzidos por hemácias de carneiro, em animais imunossuprimidos com ciclofosfamida. A imunestimulação do extrato deve-se também a uma resposta exacerbada de macrófagos, importantíssimo como célula apresentadora de antígeno, juntamente com linfócitos T e B. O estudo fitoquímico do extrato revelou a presença de alcalóides, fenóis e flavonóides (BAFNA & MISHRA, 2006).

Verifica-se, portanto, ampla atuação das plantas medicinais nos diferentes protocolos empregados para avaliação de suas ações sobre o sistema imunológico. Muitos desses trabalhos foram responsáveis por validar sua utilização na medicina popular.

2.6.1- *Cocos nucifera* Linn.

Cocos nucifera pertence à família Palmae, sub-família Cocoideae de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, destacando-se nas diversas regiões do mundo: Sudeste da Ásia (Tailândia, Vietnã, Cingapura, Indonésia e Malásia); Continente indiano (Bangladesh, Índia e Sri Lanka); África (Nigéria, Moçambique, Camarões, Quênia); América (Brasil, Equador, México e Jamaica) além de ilhas na Polinésia e Melanésia. A planta possui as seguintes características: Altura de 20 a 22 m numa idade de 40 anos e de 40 m numa idade de 80 anos, crescendo de 30 a 50 cm anuais chegando a até 9 m de diâmetro de copa. Possui como hábitat regiões ao nível do mar, podendo ser encontrado em altitudes de até 600 m, próximo ao Equador e com precipitações de 1500 a 2500 mm anuais. Numa árvore madura, pode-se atingir uma produção de 50 a 80 frutos anuais. A planta é nativa do litoral do sudeste asiático (Malásia, Indonésia), sendo suas sementes transportadas por correntes marítimas para costa leste da África, ilhas do pacífico, costa da Índia e ilhas tropicais (Seychelles, Maurício) no oceano Índico. A planta foi introduzida no oeste da África e na América Central e do Sul por exploradores europeus no século XVI. Sua importância econômica é diversificada, destacando-se a utilização da sua água (endosperma líquido) que é consumida abundantemente, o branco da semente (endosperma celular) é apreciado para consumo, podendo ainda ser preparado doces e leite de coco. A copra, parte seca da semente, é usada para preparar o óleo de coco. O tronco fornece madeira para construção, sua fibra é utilizada para o fabrico de cordas, tapetes, redes, sofás e bancos de carros, além de peças

ornamentais de artesanato. O fruto de *Cocos nucifera* Linn (Palmae) var. typical A tem a fibra da casca rica em compostos polifenólicos, cuja decocção tem sido usada contra artrite e diarreia na medicina popular no Nordeste do Brasil (ESQUENAZI *et al.*, 2002). Diversos trabalhos foram realizados destacando-se o de Esquenazi *et al.* (2002) que sugeriram atividade antimicrobiana e antiviral no extrato acetato de etila de *Cocos nucifera*. Alviano *et al.* (2004) demonstraram o efeito antinociceptivo e seqüestrador de radicais livres do extrato aquoso de *Cocos nucifera in vivo e in vitro*. Mendonça-Filho *et al.* (2004) demonstraram o efeito leishmanicida *in vitro* do extrato acetato de etila de *Cocos nucifera*. Abreu e Faria (2007) concluíram que o uso do ácido ascórbico (200 mg/L) mantém a estabilidade físico-química da água do coco em tratamento térmico a 139°C por 10 segundos apresentando excelente efeito anti-oxidante e conservante. Koschek *et al.* (2008) sugeriram atividade anti-neoplásica para o extrato aquoso de *Cocos nucifera* em células leucêmicas de linhagem K562.

Verifica-se, portanto, um interesse por esta planta nos seus diversos efeitos biológicos.

3 JUSTIFICATIVA

O uso potencial de plantas medicinais com atuação sobre a resposta imune na medicina veterinária ainda é insignificante (NUNES-PINHEIRO *et al.*, 2003). *Cocos nucifera* Linn é uma planta facilmente encontrada na vegetação natural do Nordeste brasileiro e têm várias aplicações.

Nesta planta foram identificados catequinas que são polifenóis que tem a forma de flavonóides com vários grupos fenóis. Esses grupos podem capturar prooxidantes e radicais livres, conferindo-lhes potentes características antioxidantes (JOYEX *et al.*, 1995). Estudos mostraram que as catequinas têm um poderoso inibidor de crescimento celular, apresentando atividades anticâncer, antimutagênica, antibacteriana, antiviral e antiinflamatória (YANG *et al.*, 1998; FUJIKI *et al.*, 1998).

O líquido oriundo da fibra de sua casca apresentou excelente atividade leishmanicida em testes realizados *in vitro* (Mendonça-Filho *et al.*, 2004), sugerindo uma atividade estimulante desse extrato sobre os macrófagos.

Este dado despertou interesse em nosso grupo em verificar suas propriedades imunomoduladoras destacando-se a avaliação de parâmetros fisiológicos, avaliação da resposta inflamatória e a avaliação das respostas imune celular e humoral *in vivo*.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

O extrato acetato de etila de *Cocos nucifera* Linn (EACN) apresenta atividades antiinflamatória e imunomoduladora *in vivo*.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Esse trabalho tem como objetivo investigar o efeito do extrato acetato de etila de *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) (EACN) sobre a resposta inflamatória e sobre a resposta imunológica em modelos de animais experimentais *in vivo*.

5.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o efeito do EACN sobre os parâmetros fisiológicos, sobre o peso relativo dos órgãos e sobre os parâmetros hematológicos.
- b) Estudar o efeito do EACN sobre o processo inflamatório tópico.
- c) Verificar o efeito do EACN sobre a produção de anticorpos
- d) Investigar o efeito do EACN sobre a resposta imune celular.

Avaliação toxicológica e efeito do extrato acetato de etila da fibra de *Cocos nucifera*

Linn. (Palmae) sobre a resposta inflamatória *in vivo*

SILVA, L.C.R.¹; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.^{1,2*}; MORAIS, S.M.¹; LOPES-NETO, B.E.²; SANTOS, G.J.L.², CAMPELLO, C.C.²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Avenida Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Serrinha, CEP 60740-000, Fortaleza, CE, E-mail: csnpdiana@hotmail.com ²Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária/UECE, Avenida Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Serrinha, CEP 60740-000, Fortaleza, CE.

RESUMO: Objetivou-se investigar o efeito do extrato acetato de etila de *Cocos nucifera* (EACN) sobre parâmetros fisiológicos e sobre a inflamação tópica induzida por xileno. EACN foi obtido a partir da água da fibra da casca do coco verde e o teste fitoquímico indicou a presença de taninos condensados, flavononas, flavonóis, flavononóis, xantonas e esteróides. EACN foi administrado aos camundongos Swiss por via oral em dose única diária de 10, 30, 100 e 250 mg Kg⁻¹ por cinco dias consecutivos para os protocolos de toxicidade e inflamação tópica. No ensaio de toxicidade foram observadas as frequências cardíacas e respiratórias, a presença de diarreia, analgesia e apatia e realizada a contagem total dos leucócitos do sangue periférico, avaliação macroscópica dos órgãos e peso relativo do rim, fígado, timo e baço. O efeito do EACN sobre a inflamação tópica foi realizado utilizando-se grupos testes com as diferentes concentrações de EACN e grupos controles positivos que receberam, pela mesma via nas mesmas condições, NaCl 0,9% ou DMSO a 5% ou Dexametasona (6 mg Kg⁻¹, droga de referência). Todos os animais receberam o agente flogístico (25 µL) nas partes interna e externa da orelha duas horas após o último tratamento, enquanto os animais do grupo controle negativo não receberam qualquer tratamento. Após 50 minutos da aplicação do xileno, os animais foram sacrificados, e uma porção de cada orelha foi retirada e pesada. A diferença de peso entre as orelhas representa o efeito induzido pelos tratamentos. EACN não se mostrou tóxico, não induziu alterações na contagem total de leucócitos, não alterou o peso e nem o peso relativo dos órgãos dos animais tratados em relação aos controles. EACN não inibiu a inflamação provocada pelo xileno, apresentando efeito pró-inflamatório dependente da dose. Conclui-se que EACN nos protocolos utilizados não é tóxico e não possui atividade antiinflamatória tópica.

Palavras chaves: *Cocos nucifera*, Inflamação tópica, toxicidade, parâmetros fisiológicos

ABSTRACT: Toxicological evaluation and effect of ethyl acetate extract of fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) on inflammatory response *in vivo*. It was investigated the effect of ethyl acetate extract of *Cocos nucifera* (EACN) through physiological parameters and topic inflammation induced by xylene. EACN was obtained from fiber coconut water and the phytochemical test indicated the presence of condensed tannins, flavonoids, flavonols, xanthones and steroids. EACN was administered to the Swiss mice orally in single dose of 10, 30, 100 e 250 mg Kg⁻¹ for 5 consecutive days to the toxicity protocols and topic inflammation. On toxicity experiments it was observed the heart and respiratory frequency, the presence of diarrheas, analgesia and apathy, and it was also counted the total leukocytes on peripheral blood, macroscopic evaluation of the organs and relative weight of kidneys, liver, thymus and spleen. The effect of EACN on topic inflammation was done with tests groups with different concentrations of EACN and positive control groups which received, by the same way and conditions, NaCl 0,9%, or DMSO 5% or Dexamethasone (6 mg Kg⁻¹, reference drug). All the animals received the flogistic agent (25 µL) in inner and outer parts of the ears two hours after the last treatment, while the negative control group animals did not received any kind of treatments. After 50 minutes from the xylene application, the animals were sacrificed, and a portion of each ear was took out and weighted. The difference between the weights of ears represents the effect induced by the treatments. The results were expressed by mean±s.d. and analyzed by ANOVA and Kruskal-Wallis test was utilized to analyzed the difference between the weight of each ear (P<0.05). EACN not developed toxicity, neither changed the leucocytes total count, nor the animals' weight and animals' organs relative weight treated in relation to the control groups. EACN did not inhibit the inflammation induced by xylene, demonstrating pro-inflammatory dose dependent effect. In conclusion, the EACN used on these experimental protocols is not toxic and does not have topic anti-inflammatory activity.

Key words: *Cocos nucifera*, Xylen, topic inflammation, toxicity, physiological parameters

INTRODUÇÃO

Inflamação é um processo que envolve uma série de eventos que podem ser nomeados por numerosos estímulos, tais como, agentes infecciosos, isquemia, interações antígeno-anticorpo e injúrias químicas, térmicas e mecânicas. A resposta inflamatória ocorre em três fases distintas, mediada por diferentes mecanismos: uma aguda caracterizada por uma vasodilatação local e aumentada permeabilidade capilar, uma fase sub-aguda caracterizada por infiltração de leucócitos e células fagocíticas e uma fase proliferativa crônica, na qual ocorre degeneração do tecido e fibrose (Rotelli et al., 2003).

A resposta inflamatória, dependendo do agente, pode ser desencadeada por diferentes mecanismos, tais como a reação anafilática envolvendo dextrana, a reação inflamatória desenvolvida por carragenina e oxazalona e o processo de inflamação neurogênica envolvendo o xileno quando aplicado topicamente (Richardson & Vasko, 2002).

O mecanismo bioquímico da inflamação neurogênica provocado pelo xileno desencadeia mecanismos celulares envolvidos na regulação da liberação de substâncias pró-inflamatórias originárias de neurônios sensoriais (Richardson & Vasko, 2002). Esta inflamação é iniciada pela ação de mediadores, tais como acetilcolina, bradicinina, prostaglandinas, capsaicina etc, provocando liberação direta dos neuropeptídeos, pela excitação dos neurônios, com ativação dos seus receptores, incluindo o VR1, B2 e PARs; promovido, respectivamente, por influxo de cálcio, ativação da proteína quinase C ou desinibição do fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) (Richardson & Vasko, 2002).

Cocos nucifera, planta típica do nordeste brasileiro, é muito utilizada pela população. A água do fruto é consumida de maneira abundante, o seu fruto é apreciado para consumo na culinária e indústria alimentícia, e a fibra da casca do coco tem sido utilizada na indústria na confecção de redes, sofás e bancos de carro, entre outros. Muitos estudos foram

publicados utilizando a água de coco verde em medicina humana e em medicina veterinária (Esquenazi et al., 2002).

Nos últimos anos pesquisadores têm demonstrado interesse em estudar a água da fibra da casca do coco verde ou preparação de extratos a partir da fibra da casca do coco seco. Estudos realizados por Esquenazi et al. (2002) demonstraram que o extrato acetato de etila da fibra da casca de *Cocos nucifera*, apresentava atividades antimicrobiana e antiviral. Estudos fitoquímicos detectaram a presença de catequinas, epicatequinas e taninos como constituintes do mesmo. Mendonça-Filho et al. (2004) utilizando este mesmo extrato demonstrou sua atividade leishmanicida *in vitro* e sugeriu seu efeito imunomodulador sobre os macrófagos ativados.

O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito do extrato acetato de etila de *Cocos nucifera* (EACN) sobre parâmetros fisiológicos e sobre a inflamação tópica induzida por xileno, *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato acetato de etila da água da casca de *Cocos nucifera*

Resíduos de cocos verdes foram prensados, triturados (Fortalmag, modelo UBRC) para obtenção da água da fibra da casca do coco verde (ACCV) que foi congelada a -10°C, a fim de evitar o processo de fermentação. Vinte litros de ACCV foram descongelados e filtrados à vácuo. O extrato de *Cocos nucifera* foi obtido utilizando-se como substância extratora o acetato de etila numa proporção de 20%. Foram recuperados 14g de EACN.

Estudo fitoquímico do extrato acetato de etila de *Cocos nucifera* (EACN)

Testes fitoquímicos do EACN foram realizados para verificar a presença de heterosídeos cianogênicos, fenóis, taninos, antocianidinas, antocianinas, flavonóides, catequinas, flavanonas, flavonóis, flavanonóis, xantonas, esteróides, triterpenóides, saponinas e alcalóides, de acordo com Matos (1997).

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, entre 2 e 4 meses, oriundos de colônias do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos na sala de experimentação animal do Laboratório de Imunologia e Bioquímica (LIBA/FAVET) da Universidade Estadual do Ceará em caixas plásticas sob condições adequadas de luz e temperatura, recebendo ração e água à vontade. Os animais foram manuseados de acordo com as normas éticas da experimentação animal. O protocolo experimental nº 8352607-2 foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará.

Avaliação dos parâmetros fisiológicos e do aspecto macroscópico dos órgãos linfóides

Sessenta camundongos Swiss divididos em 6 grupos (n=10) receberam 0,2 ml do EACN, nas doses de 10, 30 100 e 250 mg Kg⁻¹ em dose única diária, através de sonda orogástrica, durante cinco dias consecutivos de acordo com o seguinte protocolo: Grupo I – animais que receberam salina fisiológica, como controle; Grupo II – animais que receberam DMSO a 5% em salina fisiológica, como veículo; Grupo III – animais que receberam EACN 10 mg Kg⁻¹; Grupo IV – animais que receberam EACN 30 mg Kg⁻¹; Grupo V – animais que receberam EACN 100 mg Kg⁻¹; Grupo VI – animais que receberam EACN 250 mg Kg⁻¹. Os animais foram observados nos tempos imediatamente após a aplicação dos tratamentos com 1/2, 2, 4, 8, 24, 48 e 72 h. O exame clínico destes animais foi baseado na observação das

frequências respiratória e cardíaca; mudanças comportamentais e parâmetros como: diarreia, analgesia, contorções, sialorréia, apatia, lacrimejamento, pêlo eriçado, entre outros. No sexto dia, os animais foram pesados, coletadas amostras de sangue; e, em seguida, sacrificados e necropsiados para observação macroscópica, e retirados timo, baço, rim e fígado, para pesagem. As amostras de sangue foram coletadas do plexo retro-orbital nos dias zero e no sexto dia, com auxílio de pipetas Pasteur, e foram acondicionadas em tubos contendo heparina. A contagem total dos leucócitos foi realizada utilizando-se uma câmara de Neubauer.

Efeito do EACN sobre o processo inflamatório induzido por xileno

Oitenta camundongos Swiss foram divididos em 8 grupos de 10 animais cada, recebendo os tratamentos, durante 5 dias consecutivos, por via oral, através de sonda orogástrica, de acordo com o seguinte protocolo: Grupo I – animais que não receberam tratamento (controle negativo); Grupo II – animais que receberam salina fisiológica (NaCl 0,9%); Grupo III – animais que receberam DMSO 5% em salina fisiológica, como veículo; Grupo IV – animais que receberam EACN 10 mg Kg⁻¹; Grupo V – animais que receberam EACN 30 mg/Kg; Grupo VI – animais que receberam EACN 100 mg Kg⁻¹; Grupo VII – animais que receberam EACN 250 mg Kg⁻¹; Grupo VIII – animais que receberam dexametasona 6 mg Kg⁻¹, como droga de referência (KOU et al., 2005). Após cinco dias dos tratamentos, 2 h após o último tratamento, os animais receberam 25 µl de xileno nas faces interna e externa da orelha direita, exceto o Grupo I, controle negativo. Após 50 minutos da aplicação do xileno, os animais foram sacrificados, e foi retirada uma porção das orelhas direita e esquerda de cada camundongo, utilizando-se uma pinça punch 5 mm. As porções foram pesadas e a diferença de peso entre as orelhas foi considerada como o efeito provocado pelos tratamentos sobre o processo inflamatório induzido pelo xileno (Kou et al., 2005).

Análise estatística

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett para confirmação da distribuição normal e homocedasticidade, respectivamente. As variáveis peso dos animais e peso relativo dos órgãos foram então submetidas à ANOVA e comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Os leucócitos totais e as diferenças do peso dos órgãos não apresentaram homogeneidade de variância, mesmo após transformação dos dados e foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5% e os resultados foram expressos como média± desvio padrão.

RESULTADO

Estudo fitoquímico do extrato acetato de etila de *Cocos nucifera* (EACN)

O teste fitoquímico indicou a presença de taninos condensados, flavononas, flavonóis, flavononóis e xantonas. EACN também apresentou esteróides em baixa concentração.

Efeito do EACN sobre os parâmetros fisiológicos e sobre os aspectos macroscópicos dos órgãos linfóides

Os grupos tratados não demonstraram diferença significativa de peso nos dias 0 e 6 do experimento. EACN nas doses de 10, 30, 100 e 250 mg Kg⁻¹ não provocou toxicidade aparente nos animais, e não ocorreu nenhuma morte (Tabela 1). Os animais foram observados diariamente e não demonstraram mudanças comportamentais, nem apresentaram diarreia, apatia, lacrimejamento, sialorréia, emagrecimento ou eriçamento do pêlo.

TABELA 1. Toxicidade aguda de EACN administrado por via oral

Tratamentos	Mortalidade	Peso (g)		Sintomas tóxicos
		Dia 0	Dia 6	
Salina	0/10	32,02±1,42 ^a	31,72±2,17 ^a	nenhum
DMSO 5%	0/10	22,40±2,66 ^c	23,20±2,56 ^c	nenhum
EACN 10 mg Kg ⁻¹	0/10	25,43±2,48 ^b	26,88±2,58 ^b	nenhum
EACN 30 mg Kg ⁻¹	0/10	29,89±2,47 ^a	28,37±2,11 ^a	nenhum
EACN 100 mg Kg ⁻¹	0/10	23,19±1,53 ^c	23,47±0,79 ^c	nenhum
EACN 250 mg Kg ⁻¹	0/10	30,63±2,75 ^a	30,41±2,23 ^a	nenhum

Letras distintas representam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$)

A contagem dos leucócitos totais dos grupos avaliados foi realizada nos dias 0 e 6 do experimento, demonstrando que não houve diferença significativa dentro do mesmo grupo. No dia 6, os animais foram necropsiados e retirados fígado, baço, timo e rim, para o cálculo do peso relativo dos órgãos (Tabela 2). Não houve alteração macroscópica dos órgãos e nem houve alteração no peso dos órgãos induzido pelo tratamento.

TABELA 2. Leucócitos totais e peso relativo dos órgãos de animais tratados com EACN

Tratamentos	Leucócitos totais (mm ³)		Peso relativo dos órgãos (g)			
	Dia 0	Dia 6	Fígado	Baço	Timo	Rim
Salina	5160±820 ^b	4085±1235 ^b	4,93±0,51 ^b	0,36±0,06 ^a	0,41±0,09 ^a	0,66±0,05 ^a
EACN 100 mgKg ⁻¹	5525±389 ^{ab}	3390±1014 ^b	4,99±0,60 ^b	0,42±0,07 ^a	0,35±0,08 ^a	0,68±0,08 ^a
EACN 250 mgKg ⁻¹	7077±1660 ^a	6144±1993 ^a	5,51±0,28 ^b	0,44±0,08 ^a	0,40±0,04 ^a	0,56±0,05 ^a

Letras distintas representam diferenças significativas entre tratamentos ($p < 0,05$)

Efeito do EACN sobre o processo inflamatório induzido por xileno

A tabela 3 representa o tratamento com diferentes doses de EACN, seguido de exposição ao xileno como agente flogístico. O grupo II que recebeu salina fisiológica, respondeu ao xileno, demonstrando seu efeito inflamatório, enquanto o grupo I, que não recebeu nenhum tratamento, não apresentou alteração que caracteriza processo inflamatório, caracterizando o controle negativo. Os grupos que receberam DMSO a 5% em salina fisiológica e EACN nas doses de 10, 30, 100 mg Kg⁻¹ seguidos do agente flogístico não apresentaram diferenças significativas entre si, conforme tabela 3. EACN na concentração de 250 mg Kg⁻¹ apresentou efeito estimulatório ($P < 0,05$) quando comparado com as outras doses do referido extrato. Dexametasona, droga de referência, inibiu o efeito inflamatório provocado pelo xileno.

TABELA 3. Efeito do pré-tratamento com EACN sobre o edema de orelha induzido por xileno

Grupos	Dose (mg Kg ⁻¹)	Peso da orelha direita (mg)	Peso da orelha esquerda (mg)	Diferença (mg)
Controle negativo	-	5,61 ±0,75	5,58±0,70	0,03±0,56 ^c
Salina 0,9%	-	5,58 ±0,84	4,70±0,80	0,88±0,44 ^b
DMSO 5%	-	5,35±0,99	4,17±0,30	1,08±0,70 ^b
EACN	10	5,67±1,71	4,00±0,80	1,67±0,91 ^b
EACN	30	5,15±1,2	4,4±0,7	0,95±1,18 ^b
EACN	100	6,28±0,6	5,09±0,7	1,19±0,62 ^b
EACN	250	8,10±1,1	5,50±0,6	2,60±0,90 ^a
Dexametasona	6	3,91±1,1	3,90±1,0	0,01±0,92 ^c

Letras distintas representam diferenças significativas entre tratamentos (p<0,05)

DISCUSSÃO

No presente estudo, o efeito do extrato acetato de etila de *Cocos nucifera* (EACN) administrado por via oral, em diferentes concentrações, foi investigado em modelos experimentais *in vivo*, avaliando-se os parâmetros fisiológicos e o processo inflamatório tópico. O teste fitoquímico do EACN indicou a presença de taninos condensados, flavononas, flavononóis, flavonóis e xantonas. De acordo com Di Carlo et al. (1999) estes constituintes exercem atividade antimicrobiana, antiviral, antiulcerogênica, anti-hepatotóxica, hipolipidêmica, antineoplásica, antialérgica e anti-inflamatória.

No estudo do efeito do extrato sobre os parâmetros fisiológicos e aspectos

macroscópicos dos órgãos linfóides, não houve mortalidade, nem qualquer sintoma de toxicidade sobre os animais estudados, bem como, não houve diferença significativa do número de leucócitos totais do sangue circulante entre os dias 0 e 6 dentro do mesmo grupo, nem diferença significativa do peso dos órgãos entre os grupos, no dia 6. Sendo assim, este protocolo revelou-se seguro para sua utilização em outros procedimentos de investigação.

O xileno foi utilizado como agente flogístico por causar irritação na orelha de camundongos, pela promoção de acúmulo de fluidos, característico da resposta inflamatória aguda (Okoli et al., 2007). Neste estudo, verificou-se o efeito sistêmico do EACN administrado por via oral sobre a inflamação tópica provocada por este agente.

A inflamação induzida pelo xileno induz a liberação de substâncias bioativas liberadas dos terminais periféricos de neurônios sensoriais que agem sobre células alvos periféricas, tais como mastócitos e outras células do sistema imune, produzindo inflamação neurogênica caracterizada por calor, rubor, edema e hipersensibilidade (Richardson & Vasko, 2002). Neurônios sensoriais são sensíveis à capsaicina, mediador cujo mecanismo está relacionado aos canais vanilóide, estando responsável pela despolarização e pela liberação direta de neuropeptídeos, como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP), pioneiros desse tipo de inflamação (Holzer, 1988).

Neste modelo de inflamação tópica, EACN não apresentou efeito antiinflamatório em nenhuma das concentrações utilizadas em relação aos grupos controles, inclusive EACN na concentração de 250 mg Kg⁻¹ diferiu significativamente das concentrações anteriores, demonstrando ser um potente indutor pró-inflamatório.

Rotelli et al. (2003), investigando o efeito de flavononas em modelos de inflamação aguda, verificaram que as flavononas hesperitina e hesperidina inibiram o edema induzido por xileno, em 44% e 45%, respectivamente. As flavononas presentes no EACN não inibiram o edema de orelha, demonstrando a ausência das mesmas ou concentrações muito

baixas não são suficientes para demonstrar o efeito.

Estudos realizados por Lou et al. (2008) avaliaram a atividade antiinflamatória do extrato de *Erigeron multiradiatus* e suas frações, tendo a fração butanólica induzido maior redução de edema de orelha provocado por xileno em camundongos, e que estava associado a presença de flavonóides glucuronídeos.

Além disso, o extrato aquoso das folhas de *Manihot esculenta*, apresentou efeito antiinflamatório ao reduzir o edema induzido por xileno de forma mais eficiente do que indometacina, a droga padrão utilizada. A presença de flavonóides, saponinas e óleos essenciais no extrato justificaram o efeito observado (Adeyem et al., 2008).

A presença de esteróides e terpenóides no extrato hexânico das folhas de *Aspilia africana*, parecem estar associadas ao potencial antiinflamatório avaliado em modelo de inflamação por xileno (Okoli et al., 2007).

O extrato aquoso de *Laggera alata* também apresentou atividade antiinflamatória em modelo de inflamação tópica induzido por xileno. Estudos fitoquímicos do extrato detectaram a presença de fenóis, dentre eles o ácido dicafeolquínico, que é conhecido por ser um agente antiinflamatório (Wu et al., 2006).

Neste estudo, verificou-se, que apesar de EACN apresentar várias substâncias com propriedades antiinflamatórias conhecidas, neste modelo experimental EACN mostrou-se pró-inflamatório nas concentrações utilizadas. As substâncias presentes avaliadas por estudo fitoquímico do EACN não inibiram o edema de orelha, demonstrando que a concentração das mesmas ou está muito baixa e não são suficientes para demonstrar efeito antiinflamatório ou apresentam-se estruturalmente diferentes e, portanto, efeitos biológicos diferentes.

Em conclusão, no modelo de inflamação induzida por xileno, os mediadores liberados neste processo não foram inibidos pelo extrato acetato de etila de *Cocos nucifera*. Outros protocolos deverão ser utilizados na avaliação do potencial biológico do EACN.

Referências bibliográficas

ADEYEMI, O.O.; YEMITAN, O.K.; AFOLABI, L. Inhibition of chemically induced inflammation and pain by orally and topically administered leaf extract of *Manihot esculenta* Crantz in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.6-11, 2008.

Di CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v.65, p.337-53, 1999.

ESQUENAZI, D. et al. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* LINN. (Palmae) husk fiber extract. **Research in Microbiology**, v.153, p.647-52, 2002.

HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v.24, p.739-68, 1988.

KOU, J.P. et al. Anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Radix Ophiopogon japonicas* and its two constituents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.28, p.1234-38, 2005.

LUO, P. et al. Anti-inflammatory activity of the extracts and fractions from *Erigeron multiradiatus* through bioassay-guided procedures. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.232-37, 2008.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2ª edição. Fortaleza. Imprensa universitária, UFC. p, 139. 1997.

MENDONÇA-FILHO, R.R. et al. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). **Research in Microbiology**, v.155, p.136-43, 2004.

OKOLI, C.O. et al. Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia Africana* C.D

Adams. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.219-25, 2007.

RICHARDSON, J.D., VASKO, M.R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.302, p.839-45, 2002.

RHIOUANI, H. et al. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, p.378-86, 2008.

ROTELLI, A.E. et al. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**, v.48, p.601-06, 2003.

WU, Y. et al. Effect of total phenolics from *Laggera alata* on acute and chronic inflammations models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, p.243-50, 2006.

**Atividade imunomoduladora do extrato acetato de etila de *Cocos nucifera* Linn.
(Palmae) *in vivo***

Silva, L. C. R.¹; Nunes-Pinheiro, D. C. S.^{1,2*}; Agostinho, M .S.²; Albuquerque. J. C.²,
Campello, C. C.²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Avenida Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Serrinha, CEP 60740-000, Fortaleza, CE, E-mail: csnpdiana@hotmail.com

²Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Veterinária/UECE, Avenida Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Serrinha, CEP 60740-000, Fortaleza, CE.

RESUMO

Objetivou-se investigar o efeito do extrato acetato de etila de *Cocos nucifera* (EACN) sobre a resposta imune *in vivo*. EACN foi obtido a partir da água da fibra da casca do coco verde e o teste fitoquímico indicou a presença de taninos condensados, flavononas, flavonóis, flavononóis, xantonas e esteróides. EACN foi administrado aos camundongos Swiss por via oral em dose única diária de 100 e 250 mg/Kg por cinco dias consecutivos para avaliação dos leucócitos do sangue periférico e peso relativo dos órgãos linfóides. Para avaliar a resposta imune, camundongos Swiss foram imunizados com Hemácias de Carneiro (HSBC) seguidos dos tratamentos que foram administrados por via oral em dose única diária de 0,2 mL de EACN 10 e 100 mg/Kg, NaCl 0,9% ou veículo ou Levamisol (10 mg/Kg) durante quinze dias consecutivos, ou dose única de Ciclosporina (5 mg/Kg). A resposta imune humoral foi avaliada pela titulação de anticorpos pelo teste de hemaglutinação. A resposta imune celular foi avaliada nos mesmos animais através da reação de hipersensibilidade retardada (DTH) desencadeada pelo desafio com HC injetadas no coxim plantar dos animais previamente sensibilizados, caracterizada pelo edema. Não foram observadas alterações significativas na contagem total dos leucócitos do sangue periférico e no peso relativo do timo e do baço. EACN inibiu a produção de anticorpos tanto na resposta primária quanto na secundária, contudo não alterou o edema provocado pela DTH quando comparada com grupos controles. Conclui-se que EACN apresentou efeito imunossupressor, neste protocolo, caracterizando um efeito imunomodulador sobre a resposta imune adquirida.

Palavras chaves: *Cocus nucifera*, Imunomodulação, Anticorpos, Resposta imune celular

ABSTRACT Immunomodulatory effect of ethyl acetate extract of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) *in vivo*

The aim of this study was to investigate the effect of ethyl acetate extract of *Cocos nucifera* (EACN) through immune response *in vivo*. EACN was obtained from coconut water fiber; the phytochemical test indicated the presence of condensed tannins, flavanones, flavonols, flavononols, xantons and steroids. EACN was administered to Swiss mice orally on single dose, 0.2 mL, of 100 and 250 mg/Kg for five consecutive days to the protocols of evaluation leukocytes peripheral blood and relative weights of lymphoid organs. To evaluate the immune response, mice were immunized with sheep red blood cells (SRBC) by followed treatments that were administered orally in single dose, 0.2 mL of EACN 10 and 100 mg/Kg, NaCl 0.9%, vehicle, Levamisole (10 mg/Kg) for 14 consecutives days or single dose of Cyclosporin (5 mg/Kg). The immune response was evaluated by antibodies titres while cellular immune response was evaluated through delayed hypersensibility (DTH). It was not observed significantive alteration on whole accounting leukocytes of peripheral blood, neither relative weight of thymus and spleen. EACN did not change the accounting total leukocytes on peripheral blood or alteration on relative weights organs. EACN inhibited the primary and secondary antibodies production and did not inhibit the edema that characterized the DTH ($p < 0.05$). In conclusion, EACN presents immunossupressor effect, in this protocol, like immunomodulatory effect on acquired immune response.

Key words: *Cocus nucifera*, Immunomodulation, Antibodies, Cellular immune response

1 INTRODUÇÃO

Cocos nucifera, planta típica do nordeste brasileiro, é muito utilizada pela população. É fonte de diversos trabalhos nas áreas de ciências biológicas e ciências veterinárias.

Estudos realizados por Esquenazi et al. (2002) demonstraram que o extrato acetato de etila da fibra da casca de *Cocos nucifera*, apresentava atividades antimicrobiana e antiviral. Estudos fitoquímicos detectaram a presença de catequinas, epicatequinas e taninos como constituintes do mesmo. Mendonça-Filho et al. (2004) utilizando este mesmo extrato demonstrou atividade leishmanicida *in vitro* e sugeriu seu efeito imunomodulador sobre os macrófagos ativados.

Devido a diversas situações por que passa o sistema imune em condições patológicas, alterando suas funções, pesquisadores buscam substâncias que possam modular mecanismos específicos ou inespecíficos de defesa, na tentativa de proporcionar melhores condições de vida ao indivíduo. A imunomodulação é um procedimento que interfere nas funções do organismo, alterando o sistema imune que pode ser estimulado ou suprimido. Sendo assim, a imunoestimulação resulta no aumento das respostas imunes, implicando na estimulação ou do sistema imune inato ou do sistema imune adquirido enquanto que a imunossupressão implica na redução das respostas imunes.

As plantas medicinais representam esta fonte de substâncias, tomando-se como base o conhecimento da população e validando seus efeitos através da pesquisa científica.

O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito do extrato acetato de etila de *Cocos nucifera* (EACN) sobre a resposta imune humoral e celular, *in vivo*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do Extrato Acetato de etila da água da casca de *Cocos nucifera*

Resíduos de cocos verdes foram prensados, triturados (Fortalmag, modelo UBRC) para obtenção da água da fibra da casca do coco verde (ACCV) que foi congelada a -10°C, a fim de evitar o processo de fermentação. Vinte litros de ACCV foram descongelados e filtrados à vácuo. O extrato acetato de etila de *Cocos nucifera* (EACN) foi obtido utilizando-se como substância extratora o acetato de etila numa proporção de 20%. Foram recuperados 14g de EACN.

2.2 Estudo fitoquímico do extrato acetato de etila de *Cocos nucifera* (EACN)

Testes fitoquímicos do EACN foram realizados para verificar a presença de heterosídeos cianogênicos, fenóis, taninos, antocianidinas, antocianinas, flavonóides, catequinas, flavanonas, flavonóis, flavanonóis, xantonas, esteróides, triterpenóides, saponinas, alcalóides de acordo com Matos (1997).

2.3 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, entre 2 e 4 meses, oriundos de colônias do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos na sala de experimentação animal do Laboratório de Imunologia e Bioquímica (LIBA/FAVET) da Universidade Estadual do Ceará em caixas plásticas sob condições adequadas de luz e temperatura, recebendo ração e água à vontade. Os animais foram manuseados de acordo com as normas éticas da experimentação animal. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará.

2.4 Efeito do EACN sobre a resposta imunológica induzida por hemácias de carneiro (HC)

Sessenta camundongos foram imunizados com 0,2 ml de HC a 20% (2×10^7 cel/ml) por via intraperitoneal (i.p). Uma hora após imunização com HC, todos os animais receberam 0,2 mL, por via oral dos tratamentos de acordo com o seguinte protocolo: Grupo I – animais receberam salina fisiológica (NaCl 0,9%); Grupo II - animais receberam DMSO 5% em salina; Grupo III - animais receberam EACN 10 mg/Kg, Grupo IV - animais receberam EACN 100 mg/Kg; Grupo V - animais receberam levamisol 10 mg/Kg, e Grupo VI - animais receberam somente uma dose inicial de ciclosporina A 5 mg/Kg no dia zero. Todos os tratamentos foram administrados durante 15 dias consecutivos por via oral, com o auxílio de uma sonda oro-gástrica. O grupo da ciclosporina A recebeu uma única dose antes da imunização inicial. No 15º dia, os animais receberam um reforço com hemácias de carneiro nas mesmas condições iniciais. Para avaliação do título de anticorpos, o sangue foi coletado através do plexo retro-orbital com o auxílio de pipeta Pasteur, nos dias 15 e 21 dias após a imunização para obtenção de soro imune (DAVIS & KUTTAN, 1999).

Os títulos de anticorpos específicos para HC foram determinados pelo método de hemaglutinação (MOUDGIL *et al.*, 1993). Uma alíquota do soro de cada animal foi diluída em série em placa e, adicionado HC a 5%. As placas foram levemente agitadas e incubadas por 4 h a 37°C. A reação de aglutinação foi observada ao microscópio óptico e o título de anticorpos de cada animal foi expresso como o inverso da maior diluição positiva.

Para avaliação da resposta imune celular, no 21º dia os camundongos foram desafiados com 20 µl de HC a 20% no coxim plantar da pata traseira

esquerda. Após 24, 48 e 72 horas do desafio, as patas esquerda e contra-lateral foram medidas com um paquímetro para a determinação do edema. A diferença entre as medidas das patas direita e esquerda refere-se à Reação de Hipersensibilidade Retardada (DTH) (DAVIS & KUTTAN, 1999).

2.5 Análise estatística

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett para confirmação da distribuição normal e homocedasticidade, respectivamente. As variáveis peso dos animais, peso relativo dos órgãos e resposta imune celular foram submetidas à ANOVA e comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Os leucócitos, as diferenças de peso dos órgãos e a resposta imune humoral não apresentaram homogeneidade de variância, mesmo após transformação dos dados, e foram analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. O nível de significância adotado foi de 5% e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

3 RESULTADOS

3.1 Estudo fitoquímico do extrato acetato de etila de *Cocos nucifera* (EACN)

O teste fitoquímico indicou a presença de taninos condensados, flavononas, flavonóis, flavononóis e xantonas. EACN também apresentou esteróides em baixa concentração.

3.2 Leucócitos totais e peso relativo do timo e do baço

Na Tabela 1 estão mostrados os resultados da contagem de leucócitos totais do sangue periférico antes e ao final dos tratamentos por EACN e do peso relativo dos órgãos dos animais tratados por EACN. O tratamento oral com EACN por cinco

dias consecutivos não provocou alteração significativa na contagem de leucócitos circulantes e nem no peso do baço e do timo.

Tabela 1. Leucócitos totais e peso relativo dos órgãos de animais tratados com EACN por 5 (cinco) dias consecutivos

Tratamentos	Leucócitos Totais/mm ³		Peso Relativo dos Órgãos	
	Dia 0	Dia 6	Baço	Timo
Salina	5160±820 ^b	4085±1235 ^b	0,36±0,06 ^a	0,41±0,09 ^a
EACN 100 mgKg ⁻¹	5525±389 ^{ab}	3390±1014 ^b	0,42±0,07 ^a	0,35±0,08 ^a
EACN 250 mgKg ⁻¹	7077±1660 ^a	6144±1993 ^a	0,44±0,08 ^a	0,40±0,04 ^a

Letras distintas representam diferenças significativas entre tratamentos (p<0,05)

3.3 Produção de anticorpos e da resposta imune retardada induzida por EACN

Na Tabela 2 estão mostrados os resultados da titulação de anticorpos e na tabela 3 os resultados da DTH após tratamento com EACN 10 e 100 mg/Kg. EACN, na dose de 100 mg/Kg inibiu a produção de anticorpos induzidos pela resposta imune secundária quando comparada com grupos controles. Ciclosporina comportou-se inibindo a resposta imune enquanto Levamisol alterou a produção de anticorpos. Ambos foram usados como drogas de referências.

Quanto à resposta imune celular (tabela 3), verificou-se que os diferentes tratamentos não induziram alterações significativas na DTH, mostrando que EACN não interfere na estimulação de linfócitos T.

Quanto ao aumento da resposta associada à ciclosporina, vale ressaltar que os animais receberam apenas uma dose de Ciclosporina no dia zero antes da imunização inicial, o que justifica o resultado apresentado na tabela 3.

Tabela 2 Efeito do pré-tratamento com EACN sobre o título de anticorpos específicos induzido por Hemácias de Carneiro

Tratamentos	Dose (mg/Kg/dia)	Título Anticorpos Primários	de	Título Anticorpos Secundários	de
Salina 0,9%	-	89,60±99,41 ^{Ba}		256,00±0,00 ^{Aa}	
DMSO 5%	-	118,40±119,48 ^{Aa}		174,40±109,42 ^{Abc}	
EACN	10	29,60±21,27 ^{Aa}		35,20±16,52 ^{Ad}	
EACN	100	75,40±97,32 ^{Aa}		97,60±88,75 ^{Ac}	
Levamisol	10	62,40±41,45 ^{Ba}		182,40±97,82 ^{Aab}	
Ciclosporina	5	14,40±26,14 ^{Ab}		12,20±20,41 ^{Ae}	

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas.

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (p<0,05).

Tabela 3 Efeito do pré-tratamento com EACN sobre a resposta imune retardada (DTH) induzida em animais previamente sensibilizados com hemácias de Carneiro

Tratamentos	Tempo 0	Tempo 24 h	Tempo 48 h	Tempo 72 h
Salina	0,0020±0,0516 ^{Ca}	0,1320±0,0925 ^{Aab}	0,0650±0,0682 ^{Bb}	0,0740±0,0347 ^{ABab}
DMSO 5%	-0,0290±0,0417 ^{Bab}	0,0633±0,0659 ^{Ab}	0,0811±0,0686 ^{Aab}	0,0511±0,0267 ^{Bb}
EACN 10	-0,0490±0,0528 ^{Bb}	0,0680±0,0457 ^{Ab}	0,0700±0,0439 ^{Ab}	0,0730±0,0216 ^{Aab}
EACN 100	-0,0044±0,0427 ^{Ba}	0,0667±0,0624 ^{Ab}	0,0678±0,0244 ^{Ab}	0,0689±0,0276 ^{Aab}
Levamisol	0,0022±0,0277 ^{Ca}	0,1389±0,0699 ^{Aa}	0,0611±0,0535 ^{Bb}	0,0722±0,0268 ^{Bab}
Ciclosporina	-0,0067±0,0194 ^{Ca}	0,0975±0,0440 ^{ABab}	0,1100±0,0239 ^{Aa}	0,0800±0,0207 ^{Ba}

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas. Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas ($p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, o efeito do EACN sobre a imunidade de camundongos foi avaliada pela administração por via oral aos camundongos por 14 dias consecutivos. O efeito do tratamento por cinco dias consecutivos não provocou alteração significativa na contagem de leucócitos circulantes e nem no peso do baço e do timo, parâmetros estes importantes para avaliação de interferência no sistema imune dos camundongos. Isto sugere que o tratamento com EACN não provocou esplenomegalia.

Os linfócitos T têm um papel crítico no desenvolvimento da resposta imune adquirida. Dentre eles, células T CD4+ têm funções regulatórias como células auxiliares que podem iniciar e potencializar reações imunes (Gergely, 1999). De acordo com esses dados, EACN reduziu o título de anticorpos e a DTH.

As hemácias de Carneiro são antígenos potentes, pois estimulam tanto a resposta mediada por Linfócitos T quanto por Linfócitos B através da cooperação entre T e B. De acordo com Benacerraf (1978), o aumento da resposta de anticorpos induzido por hemácias de carneiro em camundongos, indica o aumento da ação de macrófagos e de linfócitos B, no processo de síntese de anticorpos.

A Reação de Hipersensibilidade Retardada é caracterizada por um aumento de células inflamatórias não específicas, na qual o macrófago é o principal participante. Desenvolve-se uma reação do tipo IV, quando o antígeno ativa linfócitos T sensibilizados. Essas células geralmente são uma subpopulação de Linfócitos T auxiliar, Th1, podendo as células T citotóxicas estarem envolvidas. A ativação das células T resulta na secreção de várias citocinas, incluindo a IL-2, interferon- γ , fator da inibição da migração de macrófagos e fator de necrose tumoral-

β (ASKENASE & VAN LOVEREN, 1983).

Neste estudo EACN inibiu a produção de anticorpos induzida tanto na resposta primária quanto secundária, mas não alterou a reação com HC. Contudo esta inibição pode ter sido diretamente sobre a ativação das células B ou impedindo a cooperação entre T e B. Neste caso, a investigação deverá prosseguir, pois nestas condições EACN mostrou-se imunossupressor. Esta situação torna-se importante em casos em que há desregulação na produção de anticorpos.

Diversas plantas foram avaliadas e demonstraram efeito imunomodulador, utilizando com modelo antigênico Hemácias de Carneiro (HC). O extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus*, usado popularmente no tratamento de doenças reumáticas, apresentou efeito imunossupressor, inibindo a produção de anticorpos e reduzindo o edema da DTH (PINTO *et al.*, 2007). Foi proposto que o efeito imunossupressor do extrato *in vivo* atuou sobre as células T e/ou B, agindo sobre esta direta ou indiretamente. O balanço padrão de citocinas oriundas de Th1/Th2 parece não explicar o efeito inibitório do extrato *in vivo*. O estudo fitoquímico do extrato revelou a presença de polifenóis e alcalóides, que segundo Johnson *et al.* (2003) algumas plantas apresentam efeito imunossupressor com esses constituintes.

O extrato aquoso de *Clausena excavata* apresentou efeito imunoestimulante sobre os linfócitos B e sobre a resposta de macrófagos, enquanto a DTH sofreu redução significativa. O estudo fitoquímico revelou a presença de alcalóides carbazoles e cumarinas (MANOSROI *et al.*, 2005).

O extrato aquoso de *Tridax procumbens* apresentou efeito imunoestimulante por aumentar a resposta imune humoral e a resposta imune celular, induzida por hemácias de carneiro. A presença de triterpenóides e

sesquiterpenos parecem estar associadas a formação de complexos imunoestimulantes (TIWARI *et al.*, 2004).

O extrato metanólico da raiz *Curculigo orchioides* teve efeito imunoestimulante, com aumento da resposta imune humoral e celular induzidos por hemácias de carneiro, em camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida. O estudo fitoquímico do extrato relevou a presença de alcalóides, fenóis, taninos, saponinas e esteróides (BAFNA & MISHRA, 2006).

A fração acetato de etila do extrato de *Tetrastigma hemsleyanum* apresentou efeito imunoestimulante sobre a resposta imune humoral e celular, esta induzida por SRBC. O teste fitoquímico revelou a presença de flavanóides kaempferol, quercetina e *b*-sitosterol que são responsáveis pelas propriedades imunoestimulantes, antiinflamatórias, antivirais, antitumorais além de ativar a fagocitose pelo aumento da ação de macrófagos (XU *et al.*, 2008).

A suspensão aquosa da raiz de *Withania somnifera* foi investigada em procedimentos experimentais *in vitro* e *in vivo*, apresentando efeito anti-inflamatório por inibir a atividade do complemento, impedindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios. O efeito imunossupressor foi considerado por impedir a proliferação de linfócitos T, a resposta imune humoral e a resposta imune celular induzida por hemácias de carneiro (RASOOL & VARALAKSHMI, 2006).

A fração metanólica bioativa de *Sphaeranthus indicus* produziu um aumento da resposta imune humoral e da resposta de hipersensibilidade retardada (DTH), evidenciadas pelo aumento da produção de anticorpos e do edema de pata, induzidos por hemácias de carneiro, em animais imunossuprimidos com ciclofosfamida. A imunoestimulação do extrato deveu-se também a uma resposta

exacerbada de macrófagos, importantíssimo como célula apresentadora de antígeno, juntamente com linfócitos T e B. O estudo fitoquímico do extrato revelou a presença de alcalóides, fenóis e flavonóides (BAFNA & MISHRA, 2006).

Verificou-se, portanto, que este modelo experimental é bastante utilizado para avaliar precocemente os efeitos imunomoduladores de extratos oriundos de diversas plantas utilizadas popularmente e que necessitam de comprovação científica.

Neste estudo, EACN mostrou-se imunossupressor nas concentrações utilizadas. No entanto, outros protocolos deverão ser utilizados para comprovar este efeito apresentado.

Referências bibliográficas

- ASKENASE, P.W., VAN LOVEREN, M., Delayed type hypersensitivity: activation of mast cells by antigen specific T-cell factors initiates cascade of cellular interactions. **Immunology Today** , v. 4, p. 259–264, 1983.
- BAFNA, A.R., MISHRA, S.H. Immunoestimulatory effect of methanol extract of *Curculigo orchioides* on immunosuppressed mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 1-4, 2006.
- BAFNA, A.R., MISHRA, S.H. Protective effect of bioactive fraction of *Sphaeranthus indicus* Linn. against cyclophosphamide induced suppression of humoral immunity in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 426-429, 2006.
- BENACERRAF, B. A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I region specific Ir genes in macrophages and B lymphocytes. **Journal of Immunology**. v. 120. P, 1809–1812, 1978.
- DAVIS, L. and KUTTAN, G. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 71, p. 193-200. 2000.
- ESQUENAZI, D. et al. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from

- Cocos nucifera* LINN. (Palmae) husk fiber extract. **Research in Microbiology**. v. 153, p. 647-652. 2002.
- GERGELY, P. Drug-induced lymphopenia: focus on CD4+ and CD8+ cells. **Drug Safety** v.21, p. 91–100.1999.
- JOHNSON, V.J., He, Q., OSUCHOWSKI, M.F., SHARMA, R.P. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: III Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses. **Planta Medica**, v. 69, p. 44–49, 2003.
- MANOSROI, A., SARAPHANCHOTIWITTHAYA, A., MANOSROI, J. In vivo immunomodulating activity of wood extracts from *Clausena excavata* Burm. f. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p. 5-9, 2005.
- MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2ª edição. Fortaleza. Imprensa universitária, UFC. p, 139. 1997.
- MENDONÇA-FILHO, R.R. et al. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). **Research in Microbiology** v. 155, p.136-143, 2004.
- MOUDGIL, K.D. In: TALWAR, G.P., GUPTA, S.K., editors. **A handbook of practical and clinical immunology**. New Delhi: CBS publishers, 1993, pp.194.
- PINTO, A.C., REGO, G.C.G., SIQUEIRA, A.M., CARDOSO, C.C., REIS, P.A., MARQUES, E.A., COELHO, M.G.P., SABINO, K.C.C. Immunosuppressive effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.435-439, 2007.
- RASOOL, M., VARALAKSHMI, P. Immunomodulatory role of *Withania somnifera* root powder on experimental induced inflammation: An *in vivo* and *in vitro* study. **Vascular Pharmacology**, v.44, p. 406-410, 2006.
- TIWARI, U., RASTOGI, B., SINGH, P., SARAF, D.K., VYAS, S.P. Immunomodulatory effects of aqueous extract of *Tridax procumbens* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.92, p.113-119, 2004.
- XU, C., DING, G., FU, J., MENG, J., ZHANG, R., LOU, X. Immunoregulatory Effects of Ethyl-acetate Fraction of Extracts from *Tetrastigma Hemsleyanum* Diels et. Gilg on Immune Functions of ICR Mice. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 21, p.325-331, 2008.

CONCLUSÕES

- 1 – EACN não apresentou atividade tóxica nos animais, não induziu diferença significativa na contagem total de leucócitos, não alterou o peso dos órgãos e nem induziu alteração macroscópica nos mesmos.
- 2 – EACN mostrou-se pró-inflamatório nas concentrações utilizadas no modelo de inflamação tópica induzido por xileno.
- 3 – EACN apresentou efeito imunossupressor, interferindo na produção de anticorpos sistêmicos.
- 4 – EACN não alterou significativamente a resposta imune celular avaliada pela reação de hipersensibilidade tardia.

PERSPECTIVAS

Este trabalho fornece subsídios para o isolamento das substâncias do extrato a fim de verificar quais dos seus constituintes causem efeito pró-inflamatório e imunossupressor, já que é sabido na literatura que a maior parte dos flavonóides apresentam características antiinflamatórias e imunoestimulantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular**. Revinter, Rio de Janeiro, 2008, pp.1-6.
- ABREU, L.F., FARIA, J.A.F. Influência da temperatura e do ácido ascórbico sobre a estabilidade físico-química e atividade enzimática da água de coco (*Cocos nucifera* L.) acondicionada assepticamente. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, p. 226-232, 2007.
- ADEYEMI, O.O., YEMITAN, O.K., AFOLABI, L. Inhibition of chemically induced inflammation and pain by orally and topically administered leaf extract of *Manihot esculenta* Crantz in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p. 6-11. 2008.
- AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry**, v. 43, n.6, p.255-1260, 1996.
- ASKENASE, P.W., VAN LOVEREN, M., Delayed type hypersensitivity: activation of mast cells by antigen specific T-cell factors initiates cascade of cellular interactions. **Immunology Today** , v. 4, p. 259–264, 1983.
- BAFNA, A.R., MISHRA, S.H. Immunoestimulatory effect of methanol extract of *Curculigo orchoides* on immunosuppressed mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 1-4, 2006.
- BAFNA, A.R., MISHRA, S.H. Protective effect of bioactive fraction of *Sphaeranthus indicus* Linn. against cyclophosphamide induced suppression of humoral immunity in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 426-429, 2006.
- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C. Immunobiology of dendritic cells, **Annuary Review of Immunology**. v. 18, p. 767. 2000.
- BENACERRAF, B. A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I region specific Ir genes in macrophages and B lymphocytes. **Journal of Immunology**. v. 120. P, 1809–1812, 1978.
- BERG, M.E.V.D. **Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático**. 2ª Ed. Rev. E aum-Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993.
- BYEON, S.E., CHUNG, J.Y., LEE, Y.G., KIM, B.H., KIM, K.H., CHO, J.Y. *In vitro and in vivo* anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from inner bark of *Tabebuia avellaneda*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 119, p. 145-152. 2008.
- CASTARDO, J.C., PRUDENTE, A.S., FERREIRA, J., GUIMARÃES, C.L., MONACHE, F.D., CECHINEL-FILHO, V., OTUKI, M.F., CABRINI, D.A. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw

- oedema. **Journal of Ethnopharmacology**. v, 118. P, 405-411. 2008.
- CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. **American Journal Clinical Nutrition**. v. 66, p. 460-463. 1997.
- CHATTOPADHYAY, D., ARUNACHALAM, G., MANDAL, A.B., SUR,T.K., MANDAL,S.C., BHATTACHARYA, S.K. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v, 82. P, 229-237. 2002.
- COSENTINO, M., BOMBELLI, R., CARCANO, E., LUINI, A., MARINO, F., F, CREMAB., DAJAS, F., LECCHINI, S. Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C.infusion: A study on human leukocytes. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 116. P, 501-507. 2008.
- COYLE, A. J., GUTIERREZ-RAMOS, J. C. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. **Nature Immunology** v. 2, p. 203. 2001.
- DAVIS, L. and KUTTAN, G. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 71, p. 193-200. 2000.
- DEFRANCO, A. L., WEISS, A. Lymphocyte activation and effector function. **Current Opinion of Immunology**. v. 10, p. 243–367. 1998.
- DELVES, P. J., ROITT, I. M. The immune system (in two parts). **New England Journal of Medicine**. v. 343, p. 37–49, 108–117. 2000.
- Di CARLO, G., MASCOLO, N., IZZO, A.A., CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**. v. 65, p. 337-353. 1999.
- DI ROSA, M., GIROUND, J.P., WILLOUGBBY, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathology**, v. 104, p. 15-29, 1971.
- DUTTON, R. W., BRADLEY L. M., & SWAIN, S. L. T cell memory. **Annual Review of Immunology**. v. 16, p. 201- 223. 1998.
- DUTTA, R.C. Peptide immunomodulators versus infection: an analysis. **Immunology Letters**, 2002, pp.1-9.
- EFFROS, R.B., CAI, Z., LINTON, P.J. CD8 T cells and aging. **Critical Review of Immunology**. v. 23, p. 45-64. 2003.
- ERDEMOGLU, N., AKKOL, E.K., YESILADA, E., CALIS, I., Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive principles from a folk remedy, *Rhododendron ponticum* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 119, p. 172-178. 2008.

- ESQUENAZI, D., WIGG, M.D., MIRANDA, M.M.F.S., RODRIGUES, H.M., TOSTES, J.B.F., ROZENTAL, S., DA SILVA, A.J.R., ALVIANO, C.S. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* LINN. (Palmae) husk fiber extract. **Research in Microbiology**. v. 153, p. 647-652. 2002.
- FENG, Q., REN, Y., WANG, Y., MA, H., XU, J., ZHOU, C., YIN, Z., LUO, L. Anti-inflammatory effect of SQC-B-CD on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 118, p. 51-58. 2008.
- FOY, T. M., ARUFFO, A., BAJORATH, J., BUHLMAN, J. E. & NOELLE, R. J. Immune regulation by CD 40 and its ligand. **Annual Review of Immunology**. v. 14, p. 591-617. 1996.
- FROELICH, C.J., DIXIT, V. M., YANG, X. Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases. **Immunology Today**. v. 19, p. 30-36. 1998.
- FUJIKI, H., SUGANUNA, M., OKABE, S., SUEOKA, N. Cancer inhibition by green tea. **Mutagenic Research**, v. 402, p. 307-310, 1998.
- GERGELY, P. Drug-induced lymphopenia: focus on CD4+ and CD8+ cells. **Drug Safety** v.21, p. 91-100. 1999.
- Gerloni, M., Zanetti, M. CD4 T cells in tumor immunity. **Seminars in Immunopathology**. v. 27, p. 37-48. 2005.
- GRAKOU, A. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. **Science**. v. 285, p. 221-227. 1999.
- HARLOW, E.D., LANE, D. **Antibodies a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, USA. p.37-52. 1988.
- HERBARIUM SAÚDE, 2002. **A Fitoterapia na história**, Curitiba, ano v, nº 22, 6 p.
- HOLLAND, S.M., VIZI, E.S., Immunomodulation. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 2, p. 425-427. 2002.
- HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience** 24, 739-768, 1988.
- JANEWAY, C.A.J., MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review Immunology**. p. 20. v. 197-216. 2002
- JANEWAY, C., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. Artmed editora, São Paulo, 5 ed. 2002.
- JOHNSON, V.J., He, Q., OSUCHOWSKI, M.F., SHARMA, R.P. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: III Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses.

Planta Medica, v. 69, p. 44–49, 2003.

JOYEX, M., LOBSTEIN, A., ANTON, R., MORTIER, F. Comparative antiliperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from *Ginkgo* and some flavonoids. **Planta Medicinal**. v. 61, p. 126-129. 1995.

KAILEH, M., BERGHE, W.V., BOONE, E., ESSAWI, T., HAEGEMAN, G. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 113, p. 510-516. 2007.

KAMRADT, T., MITCHISON, N. A. Tolerance and autoimmunity. **New England Journal of Medicine**. v. 344, p. 655–664. 2001.

KIM, H.G., YOON, D.H., LEE, W.H., HAN, S.K., SHRESTHA, B., KIM, C.H., LIM, M.H., CHANG, W., LIM, S., CHOIS, S., SONG, W.O., SUNG, J.M., HWANG, K.C., KIM, T.W. Phellinus linteus inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF- κ B and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage. **Journal of Ethnopharmacology**. v.114, p.307-315. 2007.

KOSCHEK, P.R., ALVIANO, D.S., ALVIANO, C.S., GATTASS, C.R. The husk fiber of *Cocos nucifera* L. (Palmae) is a source of anti-neoplastic activity. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**. v. 40, p. 1339-1343, 2007.

KOU, J.P., SUN, Y., LIN, Y.Y., CHENG, Z.H., ZHENG, W., YU, B.Y., XU, Q. Anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Radix Ophiopogon japonicas* and its two constituents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 28, p. 1234-1238. 2005.

LEE, J., KIM, I.S., KIM, J., KIM, J.S., KIM, D., YUN, C. Suppressive effects of *Houttuynia cordata* thumb (Saururaceae) extract on TH2 immune response. **Journal of Ethnopharmacology** . v.117, p. 34–40. 2008.

LENARDO, M., CHAN, F. K.M, HORNUNG, F. Mature T lymphocyte apoptosis-immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. **Annual Review of Immunology**. v. 17. p. 221-253. 1999.

LI, Y., WU, Y., JIA, Z., QI, J. Interaction between COX-2 and iNOS aggravates vascular lesion and antagonistic effect of ginsenoside. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 119, p. 305-311. 2008.

LIM, H., LEE, J.G., LEE, S.H., KIM, Y.S., KIM, H.P. Anti-inflammatory activity of phylligenin, a lignin from fruits of *Forsythia koreana*, and its cellular mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 118, p. 113-117. 2008.

Lin, Y.L., Lee, S.S., Hou, S.M., Chiang, B.L. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induces gene expression changes in human dendritic cells and promotes T helper 1

- immune response in BALB/c mice. **Molecular Pharmacology**. v. 70, p. 637–644. 2006.
- LUO, P., ZHANG, Z., YI, T., ZHANG, H., LIU, X., MO, Z. Anti-inflammatory activity of the extracts and fractions from *Erigeron multiradiatus* through bioassay-guided procedures. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 119, p. 232-237. 2008.
- MAKARE, N., BODHANKAR, S., RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 78, p. 133-137. 2001.
- MANOSROI, A., SARAPHANCHOTIWITTHAYA, A., MANOSROI, J. In vivo immunomodulating activity of wood extracts from *Clausena excavata* Burm. f. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p. 5-9, 2005.
- MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2ª edição. Fortaleza. Imprensa universitária, UFC. p, 139. 1997.
- MCHEYZER-WILLIAMS, L.J., MCHEYZER-WILLIAMS, M.G: Antigen-specific memory B cell development. **Annual Review of Immunology**. v. 23. p. 487-513. 2005.
- MENDONÇA-FILHO,R.R., RODRIGUES, I.A., ALVIANO, D.S., SANTOS, A.L.S., SOARES,R.M.A., ALVIANO, C.S., LOPES, A.H.C.S., ROSA, M.S. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). **Research in Microbiology** v. 155, p.136-143, 2004.
- MOSMANN. T.R.. CHERWINSKI. H.. BOND. M.W.. MARTIN. GIELDLIN, M.A. & COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins **J. Immunol.** v. 136(7).p. 2348-57. 1986.
- MOSMANN, T.R. & COFFMAN, R.L. Th 1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann. Rev. Immunol.** v. 7. p. 145-73. 1989.
- MOUDGIL, K.D. In: TALWAR, G.P., GUPTA, S.K., editors. **A handbook of practical and clinical immunology**. New Delhi: CBS publishers, 1993,pp.194.
- MURTAUGH, M.P., FOSS, D.L. Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 87, p. 109-121. 2002.
- MURUGANANDAN, S., SRINIVASAN, K., CHANDRA, S., TANDAN, S.K., LAL, J., RAVIPRAKASHM V. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. **Fitoterapia**. v. 72, p. 369-375. 2001.
- NAZIR, N., KOUL, S., QURISHI, M.A., TANEJA, S.C., AHMAD, S.F., BANI, S., QAZI, G.N. Immunomodulatory effect of bergenin and norbergenin against adjuvant-induced arthritis - A flow cytometric study. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 112, p. 401-405. 2007.

- NGUEMFO, E.L., DIMO, T., AZEBAZE, A.G.B., ASONGALEM, E.A., ALAOUI, K., DONGMO, A.B., CHERRAH, Y., KAMTCHOUING, P. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of the stem bark extracts from *Allanblackia monticola* STANER L.C. (Guttiferae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 114, p. 417-424. 2007.
- NUNES-PINHEIRO, D.C.S., LEITE, A.K.R.M, FARIAS, V.M., BRAGA, L.T., LOPES, C.A.P. Atividade imunomoduladora das plantas medicinais: perspectivas em medicina veterinária. **Ciência Animal**. v. 13, p. 23-32. 2003.
- OKOLI, C.O., AKAH, P.A., NWAFOR, S.V., ANISIOBI, A.I., IBEGBUNAM, I.N., EROJIKWE, O. Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia Africana* C.D Adams. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p. 219-225, 2007.
- OPPENHEIM, J. J., FELDMAN, M.: **Cytokine reference: a compendium of cytokines and other mediators of host defense**, London, Academic Press. 2000.
- PANTHONG, A., NORKAEW, P., KANJANAPOTHI, D., TAESOTIKUL, T., ANANTACHOKE, N., REUTRAKUL, V. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities of the extract of gamboges from *Garcinia hanburyi* Hook f. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 335-340, 2007.
- PARKER, D.C. T cell-dependent B cell activation. **Annual Review of Immunology**. v. 11, p. 331-360. 1993.
- PARKIN, J., COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**. V. 357, p.1777-1789. 2001.
- PINET, V., VERGELLI, M., MARTIN, R. Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. **Nature**. v. 375, p. 603. 1995.
- PINTO, A.C., REGO, G.C.G., SIQUEIRA, A.M., CARDOSO, C.C., REIS, P.A., MARQUES, E.A., COELHO, M.G.P., SABINO, K.C.C. Immunosuppressive effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.435-439, 2007.
- RASOOL, M., VARALAKSHMI, P. Immunomodulatory role of *Withania somnifera* root powder on experimental induced inflammation: An *in vivo* and *in vitro* study. **Vascular Pharmacology**, v.44, p. 406-410, 2006.
- RAVETCH, J. V., CLYNES, R. A. Divergent roles for Fc receptors and complement *in vivo*. **Annual Review of Immunology**. v. 16, p. 421-432. 1998.
- RICHARDSON, J.D., VASKO, M.R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 302, 839-845, 2002.
- RHIOUANI, H., EL-HILALY, J., ISRAILI, Z.H., LYOUSSI, B. Acute and sub-chronic

- toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 378-386. 2008.
- RHULE, A., RASE, B., SMITH, J.R., SHEPHERD, D.M. Toll-like receptor ligand-induced activation of murine DC2.4 cells is attenuated by *Panax notoginseng* **Journal of Ethnopharmacology**. v.116. p, 179-186. 2008.
- ROITT, I.M. **Imunologia**. Atheneu. Editora, Rio de Janeiro, 5ª edição, 1999, pp.1
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia**. Manole, São Paulo, 6 ed, p. 1-8. 2003.
- ROMAGNANI, S. The Th1/Th2 paradigm. **Immunology Today**. v. 18, p. 263. 1997.
- ROTELLI, A.E., GUARDIA, T., JUÁREZ, A.O., DE LA ROCHA, N.E., PELZER, L.E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological research**. V.48, p.601-606. 2003.
- SHINDE, U. A., PHADKE, A. S., NAIR, A. M., MUNGANTIWAR, A A, DIKSHIT, V.J., SARAF, M.N. Preliminary studies on the immunomodulatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. **Fitoterapia**. v. 70, p. 333-339. 1999.
- SILVA, B. P., PARENTE, J. P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. **Fitoterapia**. v.72, p. 887-893. 2001.
- SIMÕES, C.M.O., MENTZ, L.A., SCHENKEL, E.P., IRGANG, B.E., STERHMANN, J.R. **Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**. 5ª Ed. Porto Alegre. Ed. Universidade, UFRGS, 173p, 1998.
- SINGH, N., MISHRA, P.K., KAPIL, A., ARYA, K.R., MAURYA, R., DUBE, A. Efficacy of *Desmodium gangeticum* and its fractions against experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology** v.98, p. 83-88, 2005.
- SRIVASTAVA, P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. **Annual Review Immunology**. v. 20, p. 395. 2002.
- STITES, D. P , TERR, A. I. **Basic and Clinical Immunology**, Appleton & Lange, 7nd. Edition, New York, p. 870. 1995.
- TILNEY, N. L.; STROM, T.B.; PAUL, L.C. **Transplantation Biology- Cellular and Molecular Aspects**. Lippincott- Raven , 1st Edition. 1996.
- TIWARI, U., RASTOGI, B., SINGH, P., SARAF, D.K., VYASB, S.P. Immunomodulatory effects of aqueous extract of *Tridax procumbens* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.92, p.113-119, 2004.
- TIZARD, I.R. **Imunologia básica – uma introdução**. Roca Ltda, São Paulo, 5ª edição,

1998, 147-159.

TURNER, R.A. Screening methods in pharmacology. **New York: Academic Press**, vol.1, p. 58-100, 1965.

VACCA, A., FELLI, M.P., MARTINOTTI, S., MECO, D., GULINO, A. Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhance elements. **Journal Experimental Medicine**. v. 175, p. 637-46. 1992.

VILLANDANGOS, J. A., Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them, **Molecular Immunology**. v. 38, p. 329. 2001.

WANG, G., CHEN, Y., WANG, T., LEE, C., CHEN, K., LEE, T. Flavonoids with iNOS inhibitory activity from *Pogonatherum crinitum*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 118, p.71-78. 2008.

WU, Y., ZHOU, C., SONG, L., LI, X., SHI, S., MO, J., CHEN, H., BAI, H., WU, X., ZHAO, J., ZHANG, R., HAO, X., SUN, H., ZHAO, Y. Effect of total phenolics from *Laggera alata* on acute and chronic inflammations models. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 108, p. 243-250. 2006.

XU, C., DING, G., FU, J., MENG, J., ZHANG, R., LOU, X. Immunoregulatory Effects of Ethyl-acetate Fraction of Extracts from *Tetragium Hemsleyanum* Diels et. Gilg on Immune Functions of ICR Mice. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 21, p.325-331, 2008.

YANG, G. Y. J., LIAO, J., KIM, K., YURKOW, F. J. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 611-616, 1998.

YEH, C., LIN, C., WANG, S., HUNG, C., YEH, M., LIU, C., KAO, S. Protective and immunomodulatory effect of Gingyo-san in a murine model of acute lung inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, p. 418-426. 2007.

YIN, Y., GONG, F., WU, X., SUN, Y., LI, Y., CHEN, T., XU, Q. Antiinflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.120. p, 1-6. 2008.

ZENG, S., WANG, D., CAO, Y., AN, N., ZENG, F., HAN, C., SONG, Y., DENG, X. Immunopotential of Caffeoyl Glycoside from *Picrorhiza scrophulariiflora* on activation and cytokines secretion of immunocyte in vitro. **International of immunopharmacology**. v. 8, p, 1707-1712, 2008.

ZHOU, M., WANG, H., SUOLANGJIBA., KOU, J., YU, B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aquilaria sinensis* (LOUR) Gilg. Leaves extract. **Journal of**

Ethnopharmacology, v. 117, p. 345-350. 2008.

ZHU, X.L., CHEN, A.F., LIN, Z.B. *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance the function of immunological effector cells in immunosuppressed mice. **Journal of Ethnopharmacology** , v.111, p. 219-226, 2007.

ZINKERNAGEL, R. M., DOHERTY P. The discovery of MHC restriction. **Immunology Today**. v. 18, p. 14-17. 1997.

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](#)